



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**PAPEL DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9
HUMANA NA MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO
DE CÉLULAS TUMORAIS**

ANA CAROLINA BAPTISTA MORENO MARTIN

SÃO CARLOS
2011

**PAPEL DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9
HUMANA NA MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO
DE CÉLULAS TUMORAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**PAPEL DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9
HUMANA NA MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO
DE CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

ANA CAROLINA BAPTISTA MORENO MARTIN

SÃO CARLOS
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M379pd

Martin, Ana Carolina Baptista Moreno.

Papel do domínio desintegrina da ADAM9 humana na modulação da migração e invasão de células tumorais / Ana Carolina Baptista Moreno Martin. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

87 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biologia molecular. 2. Desintegrina. 3. Integrina. 4. Metástase. 5. Células - migração. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**PAPEL DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9 HUMANA
NA MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE CÉLULAS
TUMORAIS.**

Dissertação de Mestrado de Ana Carolina Baptista Moreno Martin

Banca Examinadora

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo



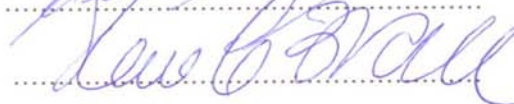
Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti



Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos



Profa. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo



Orientadora
Profa. Dra. Heloísa S. S. de Araújo

Co-Orientadora
Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

Life is short, enjoy it!
Carpe Diem!

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre me apoiou e estaria muito feliz de estar presente em mais uma conquista minha, ao meu pai, ou melhor pãe, meus irmãos, Fernando e Patricia, e minha madrasta Darlene.

Além dos meus amigos, essenciais em minha vida, Bruna e Diogo.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer minha família, em especial minha mãe quem me incentivou desde pequena a querer descobrir o porque de tudo, e conseqüentemente me inspirou a ir atrás do que gostava, a pesquisa. Meu pai que sempre me apoiou e também me inspirou, e mesmo sem entender muito o que eu estava fazendo, brincava: “Alguém tem que gostar!”. A Darlene, que sempre escutou minhas histórias e sempre estava lá quando eu precisava. Meus irmãos, Patricia e Fernando pelas brincadeiras, pelo apoio e a segurança que sempre me passaram. Não posso esquecer dos meus avós, Vó Ana, Vó Dirce e Vô Antonio, que tem o coração do tamanho do universo e nunca deixaram de me dar força e exemplos de vida.

A minha querida chefe, a eterna chefe-mor, Helo. Que me aceitou no laboratório há seis anos e criamos além de uma ótima relação profissional, uma relação pessoal, nos tornamos próximas e a quem devo muito a oportunidade de poder ter aprendido o máximo do lab. E mesmo agüentando meu jeito não muito calmo de ser, confia em mim, e espero que cada dia que passe nossa relação só cresça.

A Márcia, minha chefinha! Sempre serei sua escravinha e com o maior prazer do mundo. Temos uma relação que vai muito além do profissional, somos amigas, irmãs! Devo praticamente tudo que sei a ela. E quando mais precisei, ela estava lá. Obrigada por tudo! Inclusive por ter tido seu filho, João, a coisa mais fofa do mundo, uma das minhas maiores alegrias, que com seu carinho inocente me deixa irradiante de felicidade quando escuto um: “Caiol!”.

Aos meus queridos amigos Bruna e Diogo, que sempre, mas sempre, me apoiaram. Nunca me deixaram desistir e a quem tenho um imenso carinho e admiração. Não vivo sem! As novas amizades que surgiram durante esses anos, Charles, companheiro eterno; Elaine minha amiga/irmã/mãe que compartilhamos muitas coincidências e nos tornamos muito próximas, e aos meus amigos Rondex e Eduardo que mesmo longe um dos outros mantivemos nossa amizade.

A minha segunda família, todos os amigos do Camping Araçari.

E a pessoa mais nova em minha vida e que mais me agüenta bem de pertinho, João G. Moço, obrigada por tudo, te adoro.

Sem deixar de esquecer das pessoas que convivem comigo todos os dias, ao pessoal do LBBM. Cynthia/Tintão/Nordeste, te adoro você é o espírito mais evoluído que conheço, um dia chego lá, e obrigado por sempre me acompanhar para mais uma brejinha. Livia, ou melhor Broa, a pessoa mais animada, Tks! Minha escravinha Ana, um doce de pessoa e quem acredito ter um grande potencial. A Kelli e Carmen por nossos anos de amizade. E a todos os outros integrantes, inclusive os anexos (rs), Rita, Guilherme (Sazón), Uliana, Araceli, Verônica, Patty, Patricia (loca), Dani, Grazi, Natalia´s, Bete, Zé Roberto e Silvia.

Ao meus queridos amigos, Dani (companheira de laje junto ao Charles), professora Keico e seus alunos (Leo, Fábio, Fabinho e Val) que me sempre que podíamos estávamos confraternizando e trocando idéias sobre tudo e mais um pouco. Carinna minha amiga e professora, que sempre que possível saíamos para fugir de nossos mundos. João Gu, Renan e Juliana, que mesmo distantes nossa amizade nunca mudou. E a Cris, que me ajudou na reta final da dissertação!

Agradeço finalmente a Capes e CNPq pelo apoio financeiro e a todas as pessoas que participaram de mais uma etapa da minha vida.

Obrigada!

RESUMO

A metástase é a maior causa de morte no câncer, desta forma estudos que visam compreender os mecanismos nela envolvidos são importantes para o entendimento deste processo. A migração e invasão celular participam do processo metastático, portanto, estudos de moléculas que impeçam a migração podem fornecer as bases para o desenvolvimento de fármacos anti-metastáticos. Com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos na metástase, o domínio desintegrina de uma ADAM (A *Desintegrin And Metalloprotease*) humana, a **ADAM9D** foi clonada em vetor bacteriano pGEX-4T-1 e expresso em células *E. coli* AD494(DE3) de forma solúvel e ativa. Ensaio celulares nas linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231) e próstata (DU-145) foram realizados utilizando a ADAM9D no intuito de verificar suas funções e interações com ligantes. A ADAM9D é capaz de interagir com as integrinas $\beta 1$, $\alpha \beta 5$, $\alpha \beta 3$ e $\alpha 2$ nas duas linhagens celulares e com a subunidade $\alpha 6$ somente na linhagem DU-145. A ADAM9D inibiu a adesão ao colágeno tipo I na linhagem MDA-MB-231, entretanto, não teve a mesma capacidade na linhagem DU-145. No ensaio de proliferação celular a ADAM9D não apresentou atividade em nenhuma das linhagens celulares testadas (Fibroblastos humanos, MDA-MB-231 e DU-145). Nas células MDA-MB-231 a ADAM9D inibiu a invasão e migração em ensaios *transwell* e de *wound healing*, além de inibir a expressão das metalopeptidases de matriz, MMP2 e MMP-9. A ADAM9D, nas células de câncer de próstata, inibiu a invasão e a migração em ensaio de *wound healing*. Entretanto, no ensaio de migração *transwell* a ADAM9D provocou um aumento da migração celular e um aumento na expressão das MMP-2 e MMP-9 no ensaio *wound healing*. Portanto, este estudo foi capaz de fornecer mais informações sobre as funções do domínio desintegrina, e sobre seu papel na migração e invasão de células tumorais de câncer de mama e de próstata.

Palavras-chaves: ADAM. Desintegrina. Integrina. Migração. Invasão. Metástase.

ABSTRACT

Cancer metastasis is the major cause of death, consequently studies to understand the molecular mechanisms involved in this process are essential to the knowledge of this disease. Cell migration and invasion are part of the metastatic process; therefore, molecules that are able to prevent cell migration can be used as model to develop new anti-metastasis drugs. The aim of this project was to study the mechanisms involved on metastasis, then the disintegrin domain of a human ADAM9 (A Disintegrin and Metalloprotease), ADAM9D, was cloned in the pGEX-4T-1 plasmid and was expressed in *E. coli* AD494(DE3) in a soluble and active form. Assays were performed using mama and prostate cancer cells (MDA-MB-231 and DU-145 respectively) with ADAM9D to verify its functions and the interactions with its ligands. ADAM9D was able to bind to different integrins, $\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 2$ in both cell lines, but only with $\alpha 6$ in DU-145 cells. ADAM9D inhibited cell adhesion to collagen type I in MDA-MB-231 cell, however it did not have the same effect in DU-145 cells. During the proliferation assay ADAM9D did not affect the proliferation in all cell lines tested (MDA-MB-231, DU-145 and human fibroblasts). ADAM9D decreased cell invasion and migration in the transwell and wound healing assays, MMP-2 and MMP-9 had lower expression. ADAM9D decreased cell invasion and migration (wound healing assay), although in the transwell migration assay, ADAM9D increased cell migration and MMP-2/-9 expression. Therefore, this project provides more information about the disintegrin domain of ADAM9 and its role in cell invasion and migration of prostate and mama cancer cells.

Key words: ADAM. Disintegrin. Integrin. Migration. Invasion. Metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos envolvidos na progressão tumoral.	18
(0) Nicho pré-metastático; (1) células adquirem propriedades invasivas; (2) Degradação da membrana basal e remodelamento da matriz extracelular; (3) Invasão tumoral; (4) Intravasamento; (5) Transporte das células tumorais via vasos sanguíneos neoformados; (6) (7) Extravasamento e dormência celular; (8) Crescimento do tumor secundário; (7) Morte celular de algumas células por <i>anoikis</i> ; (9) Angiogênese.	18
Fonte: Modificado de GEIGER; PEEPER, 2009.	18
Figura 2 – Diferenças encontradas nos estágios das transições no processo metastático.	20
Figura 3 - Fases da migração celular.	21
Figura 4 – Esquema dos tipos de migração celular, características de cada um e em quais tumores podem estar presentes.	23
Figura 5 – Esquema simplificado da estrutura de uma integrina e as combinações possíveis das duas subunidades, cadeia α e cadeia β	25
Figura 6 – Estados de afinidade das integrinas.	27
Figura 7 – Resumo da sinalização FAK-Src em células, normal e tumoral.	28
Figura 10 – Extração de RNA das células de câncer de próstata da linhagem DU-145.	51
Figura 11 - RT-PCR do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D).	51
Figura 12 - Amplificação por PCR do cDNA codificante para o domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D).	52
Figura 13 – Análise de restrição confirmando a clonagem do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D) no vetor pGEX-4T-1 (<i>GE Healthcare</i>).	52
Figura 14 – Ensaio de expressão da proteína de interesse em SDS-PAGE (15%).	53
Figura 15 – Purificação e clivagem do domínio desintegrina da ADAM9D.	54
Figura 16 – A ADAM9D se liga às células DU-145 e MDA-MB-231 principalmente através da integrina $\beta 1$	55
Figura 17 – ADAM9D inibiu a adesão nas células MDA-MB231 nas concentrações de 10, 100 e 1000nM. Nas células DU-145, a ADAM9D induziu a adesão na concentração de 10nM.	56
Figura 18 – Porcentagem das integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 2$ e β presentes da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.	57
Figura 19 – Porcentagem das integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 2$ e β presentes da linhagem de câncer de próstata DU-145.	58
Figura 20 – A ADAM9D não promove a proliferação celular na linhagem de câncer mama MDA-MB-231, nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.	59
Figura 21 – A ADAM9D não promove a proliferação celular na linhagem de câncer de próstata DU-145, nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.	60
Figura 22 – A ADAM9D não promove a proliferação celular nos fibroblastos humanos (FH), nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h).	

Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.....	61
Figura 24 – Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231.....	63
Figura 25 – Imagens representativas do ensaio de <i>Wound Healing</i> para linhagem MDA-MB-231.....	64
Figura 26 – Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231 pelo método de <i>wound healing</i>	65
Figura 27 - Imagens representativas do ensaio de <i>Wound Healing</i> para linhagem DU-145....	66
Figura 28 – Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231.....	67
Figura 29 – Atividade de MMP por zimografia dos sobrenadantes de cultura de células da linhagem MDA-MB-231, 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle).	67
Figura 30 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de <i>Wound Healing</i> da linhagem MDA-MB-231.	68
Figura 31 – Atividade de MMPs por zimografia dos sobrenadante da cultura das células da linhagem DU-145, 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle).	68
Figura 32 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de <i>Wound Healing</i> para a linhagem DU-145.....	69
Figura 33 – Atividade de MMPs por zimografia dos sobrenadante da cultura das células da linhagem DU-145 no ensaio de migração <i>trans-well</i> , 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle).	70
Figura 34 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de migração <i>trans-well</i> na linhagem DU-145.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas integrinas e seus ligantes	26
Tabela 2 – Alguns membros da família das ADAMs.....	31
Tabela 3 – Componentes das reações de RT-PCR e PCR utilizadas para a amplificação do RNA e do cDNA codificante para o domínio desintegrina da ADAM9.	41
Tabela 4 – Componentes da reação utilizada para a ligação do inserto codificante para o domínio desintegrina da ADAM9 humana (ADAM9D) ao vetor pGEX-4T-1 (<i>GE Healthcare</i>).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM9D - Domínio desintegrina da ADAM9
ADAMs – *A Disintegrin And Metalloprotease*
APP- *Amyloid Precursor Protein*
BSA - *Bovine Serum Albumin*
cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
CMFDA - *5-chloromethylfluoresceina diacetato*
DEPC - *Dimetil pirocarbonato*
DMEM - Meio Dulbecco's modificado
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DO – Densidade Ótica
ECD – Ácido glutâmico/Cisteína-Ácido/Aspártico
EGF - *Epidermal Growth Factor*
PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor*
EGF-like - *Epidermal Growth Factor-like*
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*
FAK - *Focal Adhesion Kinase*)
FBS – *Fetal Bovine Serum*
FGF2 - *Fibroblast Growth Factor 2*
FITC - Fluoresceína isotiocianato
GAGs – Glicosaminoglicanos
GSH – L-Glutationa Reduzida
GST - Glutationa-S-transferase
HB-EGF - *Heparin-Binding Protein*),
HPX - domínio **hemopexina**
HUVECs - células endoteliais de cordão umbilical humano
IGF-1 - *Insulin Growth Factor*
IGFBP- *Insulin Growth Factor Binding-Protein*
IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo
MDC - *Metalloprotease/Disintegrin/Cystein-rich*
MEC – Matriz Extracelular

MET – *Mesenchymal Epithelial Transition*

MMP – Metalopeptidases de Matriz

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NP - *Non-Proteinase type*, sem atividade proteolítica

P - *Proteinase type*, com atividade proteolítica

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PKC – *Proteína Kinase C*

RGD – *Arginina/Glicina/Ácido Aspártico*

RNA – *Ácido ribonucleico*

RT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SVMPs – *Snake Venom Metalloproteases*

TACE - *TNF α Converting Enzyme*

TGF- α - *Transforming Growth Factor α*

TIMPs - *Tissue Inhibitors of Metalloproteases*

TNF - *Tumor Necrosis Factor*

U - *Unidade*

VAP1 - *Vascular Apoptosis-Inducing Protein 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 METÁSTASE	18
1.2 TIPOS DE MIGRAÇÃO CELULAR	21
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	23
1.4 INTEGRINAS	25
1.5 METALOPEPTIDASES DE MATRIZ (MMPs)	28
1.6 ADAMS (A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE)	30
1.7 FUNÇÕES DAS ADAMS	34
1.8 ADAM9	36
2.OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 CLONAGEM DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9 (ADAM9D)	39
3.1.1 EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR E PCR	39
3.1.2 CLONAGEM DA ADAM9D NO VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-4T-1	41
3.1.3 PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES	41
3.1.4 PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO	42
3.1.5 EXPRESSÃO PILOTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADAM9D EM E. COLI	43
3.2 EXPRESSÃO DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9 (ADAM9D)	43
3.3 PURIFICAÇÃO DA ADAM9D	44
3.3.1 SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DA ADAM9D	44
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	45
3.5 LINHAGENS E CULTIVOS CELULARES:	45
3.6 ENSAIO DE COMPETIÇÃO COM ANTICORPOS	45
3.7 INIBIÇÃO DA ADESÃO	46
3.8 CITOMETRIA DE FLUXO	46
3.9 PROLIFERAÇÃO CELULAR	46
3.10 ENSAIOS DE INVASÃO E MIGRAÇÃO CELULAR	47
3.10.1 INVASÃO CELULAR	47
3.10.2 MIGRAÇÃO CELULAR	48
3.10.3 MIGRAÇÃO CELULAR – WOUND HEALING:	48

3.11 ANÁLISE DE METALOPEPTIDASES DE MATRIZ (MMP) - ZIMOGRÁFIA	49
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA:	50
4. RESULTADOS	51
4.1 CLONAGEM DO DOMÍNIO DESINTEGRINA DA ADAM9 (ADAM9D)	51
4.1.1 EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA AMPLIFICAÇÃO DO CDNA CODIFICANTE PARA A ADAM9D	51
4.1.2 CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DA ADAM9D NO VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-4T-1 POR ANÁLISE DE RESTRIÇÃO	52
4.1.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADAM9D EM E. COLI	53
4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ADAM9D	53
4.1.1 SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DA ADAM9D	54
4.3 COMPETIÇÃO COM ANTICORPOS	54
4.4 INIBIÇÃO DA ADESÃO	55
4.5 CITOMETRIA DE FLUXO	56
4.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR	58
4.7 INVASÃO CELULAR	61
4.8 MIGRAÇÃO CELULAR –TRANSWELL	62
4.9 MIGRAÇÃO CELULAR - WOUND HEALING	63
4.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE METALOPEPTIDASES DE MATRIZ POR ZIMOGRÁFIA	67
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	77
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metástase

A metástase é considerada a maior causa de morte por câncer e pode ser descrita como uma cascata de eventos (PERRET; CREPIN, 2008). Células normais se transformam em células tumorais devido a mutações em genes que regulam vias essenciais, gerando células com uma proliferação descontrolada. Essas células transformadas proliferam intensamente resultando em um tumor primário que interage com células de seu microambiente tumoral, como células endoteliais, fibroblastos e macrófagos, formando uma estrutura complexa, junto com a indução da formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos (JOYCE; POLLARD, 2009). Formada esta estrutura as células tumorais invadem os tecidos vizinhos, intravasam nos novos vasos formados, e posteriormente extravasam para a disseminação em outros tecidos, os sítios secundários (figura 1). Durante o processo de metástase, as células devem ser capazes de sobreviver e atravessar barreiras presentes em seu microambiente, em seguida são capazes de popular um novo tecido devido a existência de um ambiente pré-metastático (KALLURI; ZEISBERG, 2006; GEIGER; PEEPER, 2009; BROOKS *et al.*, 2010; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010).

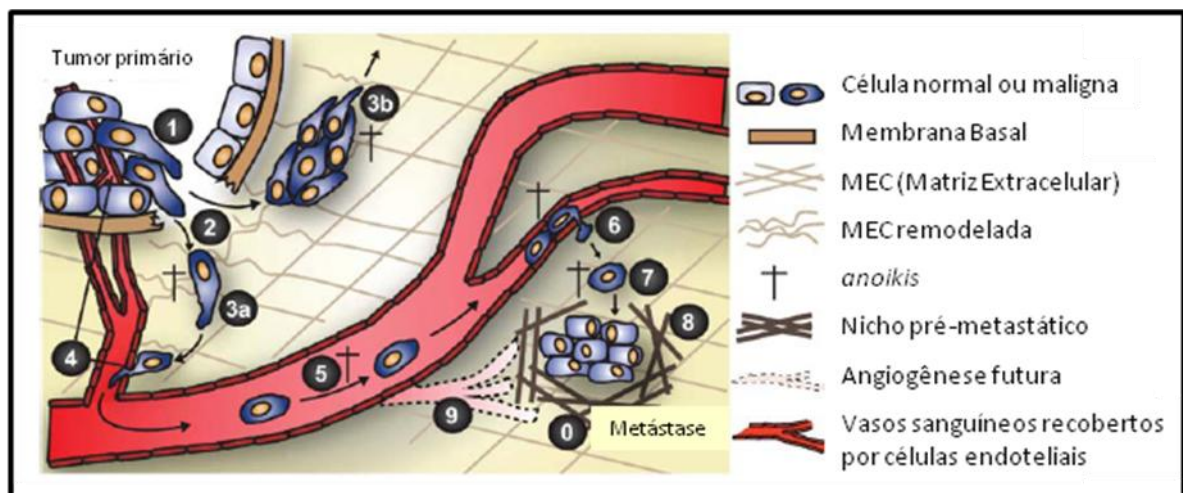


Figura 1 – Processos envolvidos na progressão tumoral.

(0) Nicho pré-metastático; (1) células adquirem propriedades invasivas; (2) Degradação da membrana basal e remodelamento da matriz extracelular; (3) Invasão tumoral; (4) Intravasamento; (5) Transporte das células tumorais via vasos sanguíneos neoformados; (6) (7) Extravasamento e dormência celular; (8) Crescimento do tumor secundário; (7) Morte celular de algumas células por *anoikis*; (9) Angiogênese.

Fonte: Modificado de GEIGER; PEEPER, 2009.

Durante a formação deste microambiente tumoral e anteriormente às células tumorais invadirem os tecidos vizinhos, estas passam por um processo conhecido como **EMT** (*Epithelial-Mesenchymal Transition*). Na EMT as células com características epiteliais perdem suas propriedades transformando-se em células com características mesenquimais (figura 2). Essas mudanças podem ser resumidas em:

- Morfologia: de uma simetria basolateral com polaridade para uma assimetria;
- Características físicas: adesões célula-célula e célula-matriz para motilidade celular e maior invasividade;
- Junções intercelulares: Junções *gap* e desmossomos para adesões focais e junções *gap* transientes;
- Marcadores moleculares: expressão de genes epiteliais, como E-caderina, para redução deste e aumento da expressão de genes mesenquimais, como N-caderinas, MMPs (**M**etalloproteases de **M**atriz) e vimentina;
- Organização do citoesqueleto: microtúbulos longitudinais para formação de fibras de estresse.

Todas essas transformações estão presentes em tumores epiteliais e ocorrem para facilitar a migração e invasão das células tumorais nos tecidos vizinhos, e posteriormente estas células irão invadir os novos vasos sanguíneos e linfáticos formados para sua disseminação em tecidos secundários. As células ainda podem sofrer este mesmo processo, mas de forma incompleta, conhecido como **EMT incompleto**, em que as células não necessariamente adquirem todas as características esperadas ou se infiltram de maneiras alternativas como a migração coletiva, discutida posteriormente (GEHO *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006).

Depois desse processo as células se aderem aos vasos e extravasam para o novo tecido, onde podem ficar dormentes por muito tempo para depois proliferarem, com formação de novos vasos e remodelamento da matriz. Durante todo o estabelecimento da metástase as células estão sujeitas a morte por *anoikis* (morte celular induzida por perda de adesão ou adesão inapropriada), ou por apoptose (morte celular programada), já que estas células devem ultrapassar todas as barreiras encontradas durante o percurso da metástase (GEIGER; PEEPER, 2009; BROOKS *et al.*, 2010). Somente 0,05% das células circulantes são capazes de chegar ao sítio secundário e proliferar para a formação da metástase (PERRET; CREPIN, 2008).

Durante a formação do sítio secundário as células normalmente sofrem o processo inverso do **EMT**, o **MET** (*Mesenchymal-Epithelial Transition*). Após as células migrarem até novos sítios, as células podem adquirir características epiteliais novamente, neste processo há mudanças no ambiente, ocorrendo uma redução de sinais como citocinas e interações com a MEC (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006).

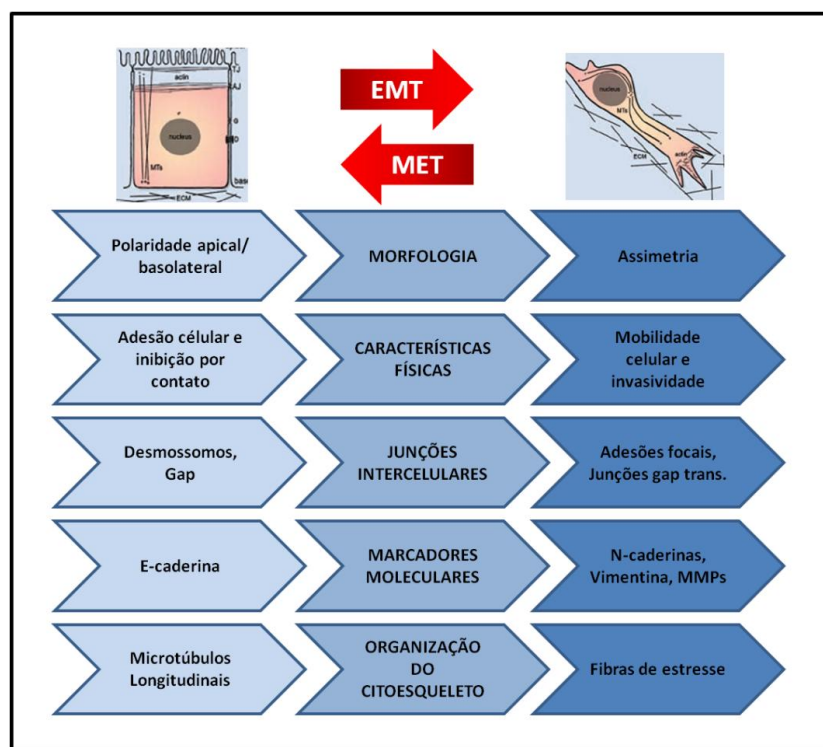


Figura 2 – Diferenças encontradas nos estágios das transições no processo metastático. Células epiteliais perdem duas características de adesões célula-célula, expressão de E-caderina, polaridade basolateral, microtúbulos longitudinais para características mesenquimais, em que as células aumentam sua motilidade, pelo aumento de expressão de MMPs, N-caderinas, formação de fibras de estresse e adesões focais, adquirem uma morfologia assimétrica e podem sofrer o processo inverso, ao chegar no seu sítio secundário. Fonte: Modificado de CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN.

A migração celular é de grande importância para as fases do processo metastático. Portanto, a capacidade das células tumorais adquirirem características migratórias é de grande importância nos tumores, pois para as células povoarem novos sítios, elas precisam se soltar de seus tumores primários e migrar sobre tecidos vizinhos, como descrito anteriormente (GEIGER; PEEPER, 2009). O processo dinâmico de migração celular ocorre em alguns passos: polarização da célula em resposta a estímulos externos, formação de uma protusão na frente de migração, adesão a outras células ou a MEC através de integrinas ou receptores de adesão, respectivamente, e posterior retração da cauda da célula, causando o movimento do

corpo celular para frente de migração (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005; ULRICH; HEISENBERG, 2009). Este processo está esquematizado na figura 3.

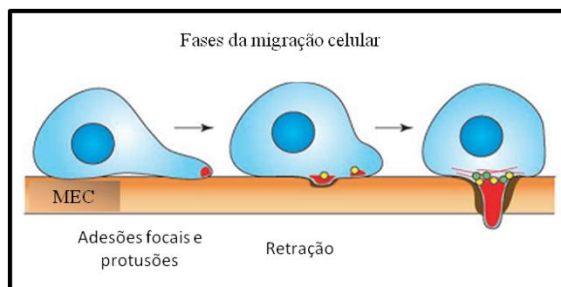


Figura 3 - Fases da migração celular.

Polarização da célula, posterior protusão e adesão em outras células ou a MEC. Retração da cauda e consequente migração. Fonte: Modificado de YAMAGUCHI *et al.*, 2005.

1.2 Tipos de migração celular

Além do processo EMT e MET, as células, durante a progressão tumoral, podem migrar por diferentes processos devido as alterações gênicas, fatores de crescimento, citocinas, interações célula-célula e fragmentos de matriz extracelular gerados pelas MMPs. Os tumores são formados por células que apresentam diferentes funções, portanto, possuem uma heterogeneidade, e isso os tornam capazes de possuir diferentes estratégias de migração e invasão celular (Figura 4) (FRIEDL; WOLF, 2003; SAHAI, 2005). Diferenças de atividade de proteases, adesão mediadas por integrinas e caderinas, polaridade celular e configuração do citoesqueleto são características que irão definir, além de fatores externos, os tipos de migração celular (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010).

Existem basicamente duas formas de migração celular, a migração individual e migração coletiva (FRIEDL; WOLF, 2003; SAHAI, 2005; FRIEDL; WOLF, 2009; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010):

Migração individual: este tipo de migração pode estar presente no estroma, na medula óssea ou ainda, em células que se separaram de um tumor ou um compartimento celular devido à perda de contatos célula-célula, como as E-caderinas. Posteriormente, as células migram de seu tumor primário através dos tecidos até a adesão em um sítio secundário (FRIEDL; WOLF, 2003; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010).

- Migração mesenquimal é o tipo de migração mais estudado e estima-se que cerca de 30% dos tumores apresentem a transição EMT, descrito acima (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006). As células possuem uma morfologia tipo-fibroblasto, de adesão

dependente de integrinas, expressam MMPs e estão presentes principalmente em tumores de tecido conectivo (FRIEDL; WOLF, 2003).

- Migração amebóide envolve uma adesão mais fraca às proteínas da MEC como o colágeno, devido a menor expressão de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$, permitindo as células migrarem sem a necessidade da degradação da MEC, espalhando-se a partir de pequenos tumores primários. São mais frequentes em linfomas e carcinomas de rim e pulmão (FRIEDL; WOLF, 2003).

Migração em cadeia: ocorre em mioblastos e melanomas. Caracterizada por *clusters* de células que migram uma em seguida da outra, formando estruturas semelhantes a cadeias de células, e está relacionada a uma forma particular do mecanismo de penetração, conferindo uma alta capacidade metastática (FRIEDL; WOLF, 2003).

Migração e invasão coletiva: este processo está presente durante o desenvolvimento embrionário, formação dos dutos das glândulas mamárias e em alguns tumores. É caracterizado por um movimento de *clusters* ou “folhas” de células tumorais que migram em conjunto. Neste tipo de migração as células interagem com a MEC através de suas integrinas e há a necessidade da degradação da MEC por MMPs, portanto, mecanicamente este tipo de migração está relacionado à EMT. Entretanto, não há perda das adesões célula-célula, responsável por manter a estrutura e as características deste tipo de migração, formando um grupo de células heterogêneas, mas com a habilidade de funcionar como uma única célula, aumentando as chances de sobrevivência. Está presente em tumores bem diferenciados de mama e de próstata (FRIEDL; WOLF, 2003; SAHAI, 2005; ILINA; FRIEDL, 2009).

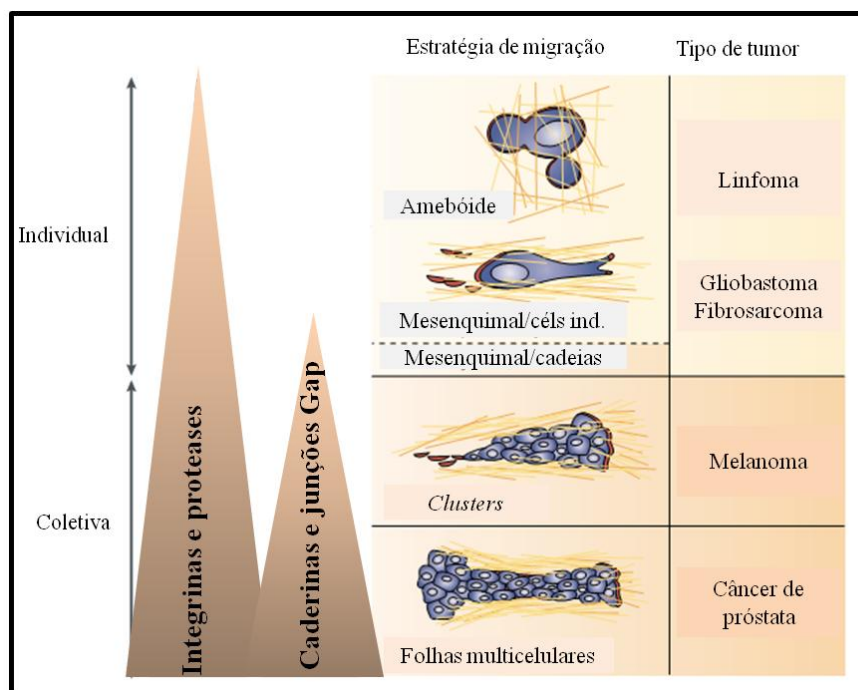


Figura 4 – Esquema dos tipos de migração celular, características de cada um e em quais tumores podem estar presentes.

As células podem migrar de forma individual ou coletiva. Na forma amebóide as células interagem menos com a MEC, não possuem interações célula-célula e não há degradação da matriz. Na forma coletiva, as células migram em *clusters*, há degradação da matriz, interações célula-célula e interações célula-matriz via integrinas. Fonte: Modificado de FRIEDL; WOLF, 2003.

As células podem alterar seu tipo de migração dependendo da situação fisiológica em que se encontram. Portanto, o microambiente tumoral pode causar mudanças na migração celular, tornando-se um grande desafio desenvolver estratégias que bloqueiem a disseminação das células tumorais do sítio primário para sítios secundários (SAHAI, 2005).

1.3 Matriz Extracelular (MEC)

Evolutivamente, a matriz extracelular (MEC) se desenvolveu com o surgimento de organismos multicelulares e é responsável por fornecer suporte aos tecidos e órgãos (TANZER, 2006). A MEC é o componente não celular dos tecidos, e é composta basicamente de água, proteínas e polissacarídeos, entretanto sua composição é tecido-dependente. A adesão a MEC ocorre através de receptores que acoplam componentes do citoesqueleto, esta interação da célula com a MEC está envolvida na migração celular (BERRIER; YAMADA, 2007; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

Os dois maiores componentes da MEC são os proteoglicanos e as proteínas fibrosas, além dos glicosaminoglicanos (GAGs) e componentes de não matriz, como os fatores de crescimento. Os proteoglicanos preenchem a maior parte do espaço extracelular intersticial e são responsáveis pelo tamponamento, hidratação e as propriedades de força e resistência associadas a MEC. A parte protéica é composta basicamente por colágeno, elastinas, fibronectina e laminina. O colágeno é a proteína mais abundante na MEC, cerca de 30% da massa total de proteínas, e tem como função fornecer força de tensão, regular a adesão celular, auxiliar a migração, direção e desenvolvimento dos tecidos. O colágeno é secretado e organizado pelos fibroblastos e pode estar associado à elastina, fornecendo elasticidade ao tecido. Outra proteína que compõe a MEC é a fibronectina, envolvida no direcionamento da organização da MEC além de mediar a adesão e migração celular (KALLURI; ZEISBERG, 2006; BERRIER; YAMADA, 2007; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

Durante o processo tumoral há uma perda da organização da MEC e um aumento de sua rigidez, além de uma maior deposição e remodelamento da MEC pelos fibroblastos. Fatores de crescimento induzem a ativação dos fibroblastos e a inflamação do tecido, sendo estes os responsáveis pela deposição de MEC e secreção de mais fatores de crescimento e MMPs (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

Portanto, os fibroblastos são de grande importância na formação dos tumores devido à deposição e remodelamento da MEC por MMPs. Para que isso ocorra, estas células passam por um processo de ativação devido fatores de crescimento como EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) promovendo sinais oncogênicos, facilitando a angiogênese e a progressão tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

As interações entre células ou entre células e a matriz extracelular (MEC) são importantes em processos de adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. Estes processos por sua vez, possuem funções tanto em condições fisiológicas normais, quanto em situações patológicas como câncer e formação de metástases. As interações célula-célula ou célula-MEC são mediadas por moléculas específicas, localizadas nas membranas celulares. Várias classes de moléculas de adesão da superfície celular já foram identificadas e caracterizadas. Dentre os principais representantes destas classes de moléculas estão (1) os membros da super família das imunoglobulinas, (2) as caderinas, (3) as integrinas, (4) as selectinas, (5) as proteoglicanas da superfície celular e (6) as ADAMs. Estas últimas formam um grupo de moléculas adesivas ligadas à membrana celular (BLOBEL *et al.*, 1992;

WOLFSBERG *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 1995; HORWITZ; HUNTER, 1996; BLOBEL, 1997; BLACK; WHITE, 1998; WHITE, 2003).

1.4 Integrinas

As integrinas pertencem à superfamília de receptores de adesão celular que reconhecem a MEC e ligantes da superfície celular. São receptores de membrana e sua estrutura é caracterizada pela presença de duas **cadeias heterodiméricas**, uma **cadeia α** e uma **cadeia β** . Já foram descritas 18 cadeias α e 8 cadeias β , que podem se combinar e formar 24 dímeros, apresentando propriedades de ligação diferentes (figura 5 e tabela 1). Na sua estrutura existe um sítio de ligação RGD, entretanto, não somente ligantes RGD podem interagir com as integrinas, outros ligantes como o ECD também possuem essa capacidade. Portanto, as integrinas funcionam como uma conexão entre a MEC e o citoesqueleto, regulando diferentes processos biológicos: sobrevivência celular, proliferação, migração e diferenciação celular (BERRIER; YAMADA, 2007; TAKADA; YE; SIMON, 2007).

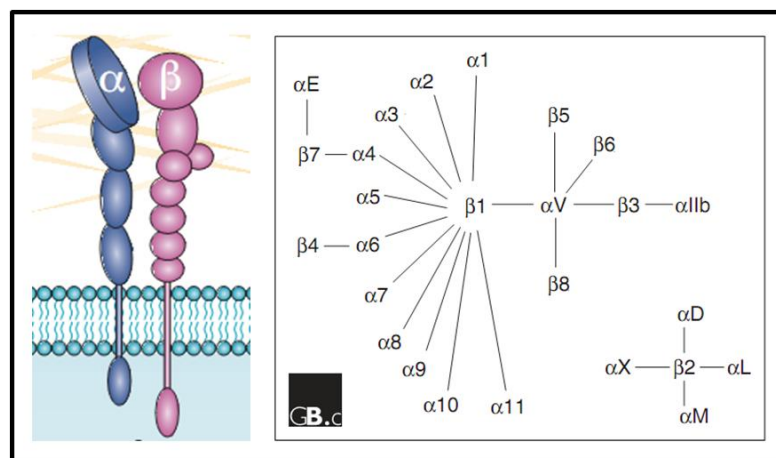


Figura 5 – Esquema simplificado da estrutura de uma integrina e as combinações possíveis das duas subunidades, cadeia α e cadeia β .

Fonte: Modificado de TAKADA *et al.*, 2007 e DESGROSELLIER; CHERESH, 2010.

Tabela 1 – Algumas integrinas e seus ligantes

Integrinas	Ligantes
$\alpha 2\beta 1$	Laminina , colágeno, E-caderina
$\alpha v\beta 3$	Fibrinogênio, vitronectina, fibronectina,
$\alpha v\beta 5$	Osteopontina e vitronectina
$\alpha 6\beta 4$	Laminina
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospodina

Fonte: Modificado de TAKADA *et al.*, 2007.

Estas moléculas contribuem com a progressão tumoral e apresentam diferentes perfis nos tumores. Integrinas como $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ apresentam expressão alterada em tumores, contribuindo na adesão e migração celular, entre outros. Normalmente esta expressão alterada está associada a uma menor sobrevida dos pacientes. Tumores de mama apresentam um aumento na expressão de $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha v\beta 3$, este perfil de integrina pode ser associado a um maior tamanho do tumor, menor sobrevida do paciente e aumento da metástase óssea. Em tumores de próstata, a integrina $\alpha v\beta 3$ aumenta a metástase óssea. Já em melanomas a integrinas expressas são $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ e o fenótipo observado é a metástase em linfonodos (HOOD; CHERESH, 2002; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Estes receptores apresentam estados de baixa e alta afinidade (figura 6). Normalmente as integrinas se apresentam no estado de baixa afinidade, onde seus domínios extracelulares se encontram dobrados impedindo a ligação destes com seus ligantes. No estado de alta afinidade estes domínios se apresentam estendidos e expostos. Os domínios transmembranas das duas subunidades apresentam um papel na ativação, estando entrelaçados quando as integrinas estão em seu estado de baixa afinidade, e dissociados quando a integrina está ativada. Já o domínio citoplasmático está associado com a afinidade especialmente de proteínas intracelulares como as talinas (MOSER *et al.*, 2009).

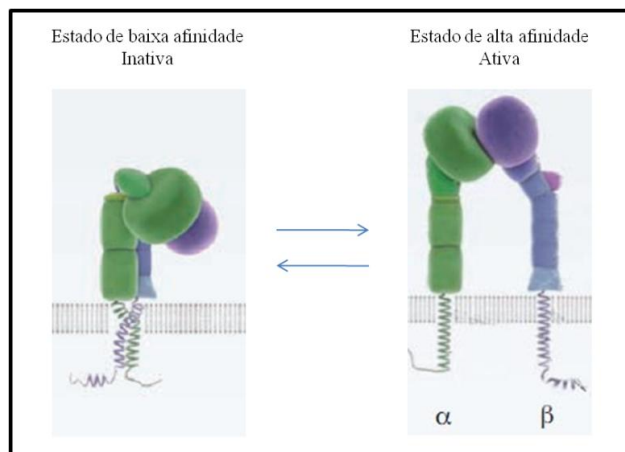


Figura 6 – Estados de afinidade das integrinas.

Do lado esquerdo a integrina se encontra em seu estado de baixa afinidade e do lado direito em seu estado de alta afinidade, podendo desencadear diferentes sinalizações intracelulares acarretando em diferentes respostas celulares, como migração, proliferação e diferenciação celular. Fonte: Modificado de MOSER *et al.*; 2009.

Existem dois tipos de sinalização nas integrinas, o *inside-out* e o *outside-in*. O estado de afinidade das integrinas é altamente regulado pela sua estrutura heterodimérica e por sinais intracelulares. Esta é a sinalização conhecida como *inside-out*, no qual as integrinas são ativadas por proteínas intracelulares como a proteína G e receptores acoplados, que promovem a fosforilação do domínio citoplasmático da subunidade β . Outras proteínas como a talina também participam deste tipo de sinalização, durante esse processo ocorre uma dissociação das subunidades, definindo a afinidade com seus ligantes. A sinalização *outside-in* ocorre quando ligantes interagem com as integrinas, formando *clusters*, ou aglomerados de integrinas, que induzem mudanças conformacionais e ativam sinais intracelulares, regulando a formação de adesões focais e o processo de migração celular (YAMADA, 1997; MIRANTI; BRUGGE, 2002; TAKADA; YE; SIMON, 2007).

As integrinas são, portanto, moduladores entre a MEC e componentes do citoesqueleto, interagindo com diferentes moléculas estruturais e de sinalização, como, talina, paxilina, vinculina, actina, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) e Src (BERRIER; YAMADA, 2007). Estímulos às integrinas como componentes da MEC e fatores de crescimento solúveis resultam em autofosforilação da FAK. A fosforilação da FAK cria um sítio de alta afinidade para a Src, formando um complexo FAK-Src estável. Neste complexo a Src ativada fosforila a FAK em vários resíduos de tirosina, criando sítios de ligação de alta afinidade. Estes sítios de ligação acarretam na fosforilação de vários substratos associados à FAK-Src, como Rho GTPases e Rac, que possuem uma importante função na reorganização do citoesqueleto e da

migração celular, respectivamente (figura 7). A ativação desta via regula o comportamento de células normais e também contribui com a progressão tumoral (MCLEAN *et al.*, 2005; MITRA; SCHLAEPFER, 2006; ULRICH; HEISENBERG, 2009; GUARINO, 2010).

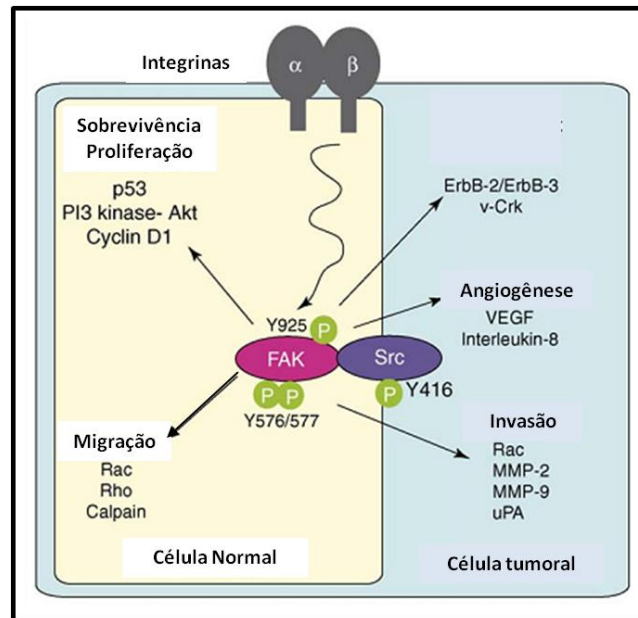


Figura 7 – Resumo da sinalização FAK-Src em células, normal e tumoral.

A FAK influencia a sobrevivência e a proliferação celular de sinais kinase-dependente. A migração celular envolve a ativação de Rho-GTPases e calpaina pelo complexo FAK-Src. Em células tumorais, ocorre um aumento de oncogenes como Erb-2, estímulos para a angiogênese, invasão e migração celular dependente de integrinas via ativação do complexo FAK-Src. Fonte: Modificado de MITRA; SCHLAEPFER, 2006.

1.5 Metalopeptidases de Matriz (MMPs)

As metalopeptidases de matriz (MMPs) participam de processos como a organogênese, inflamação e carcinogênese. Desde sua descoberta em 1962, esta família de proteases se tornou alvo de estudo para o entendimento e tratamento do câncer, já que sua expressão se encontra alterada nesta condição (FORGET; DESROSIERS; BELIVEAU, 1999).

As MMPs pertencem à subfamília das proteases dependentes de cálcio e zinco e a superfamília das metzincinas. São caracterizadas por possuírem o motivo de ligação ao zinco, HExxHxxGxxH e uma metionina conservada na região N-terminal. Nos humanos existem 24 genes de MMPs mas somente 23 proteínas, pois a MMP-23 é codificada por dois genes idênticos no cromossomo 1. Todas as MMPs possuem um **peptídeo sinal**, responsável por direcionar à via secretora, um **pró-domínio** que mantém a atividade catalítica em um estado

de latência e um domínio **catalítico**. Com exceção da MMP-7/-23 e -26, as MMPs possuem na sua região N-terminal um domínio **hemopexina** (HPX)-*like*, que está ligado ao domínio catalítico através de uma região chamada **hinge**. As MMPs de membrana possuem após a região HPX um domínio **transmembrana** e uma pequena sequência intracelular. Os vários domínios deste grupo de proteínas estão envolvidos em interações com outras moléculas, portanto, afetam ou determinam a especificidade por substratos e sua ativação (HADLER-OLSEN *et al.*, 2010; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

As MMPs são produzidas em uma forma inativa, as pro-MMPs. O processo de ativação requer uma mudança conformacional da pro-MMP, onde há um deslocamento do pró-domínio, permitindo a exposição do domínio catalítico. Esta ativação pode ocorrer pela remoção proteolítica do pró-domínio (através da furina, uma serino protease) ou por uma ativação alostérica, na qual o pró-domínio é deslocado do domínio catalítico, sem que ocorra uma clivagem da enzima. As MMPs podem ser ativadas intra ou extracelularmente, e apesar delas possuírem o pró-domínio que as direciona a via secretora, algumas podem ser encontradas intracelularmente (HADLER-OLSEN *et al.*, 2010)

Suas funções são principalmente o remodelamento da MEC, liberação de fatores de crescimento associados à matriz e a degradação de moléculas de adesão. Algumas MMPs possuem funções antagônicas, como a MMP-8 que possui um efeito protetor na metástase, diminuindo o potencial metastático de células tumorais, e a MMP-9 que atua como um promotor da invasão. Portanto, as MMPs representam uma das principais mediadoras das alterações no microambiente tumoral, entre elas estão as MMP-2 e MMP-9 (MMPs secretadas). Durante a metástase as MMPs participam da proliferação, sobrevivência celular, migração celular e angiogênese. A migração celular está relacionada com a atividade proteolítica das MMPs, que regula as interações célula-célula e célula MEC. A superexpressão de MMPs ocorre no processo de EMT, pois as células precisam degradar a MEC para sua migração e para a formação de novos vasos. Existe uma interação das MMPs com as integrinas, tal interação provoca um aumento na expressão local das MMPs, o que evidencia a função destas proteases na progressão tumoral (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2010; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

1.6 ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease)

Uma família de proteínas, chamada ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), também é de grande importância no processo metastático, durante a invasão de novos tecidos e interações com a MEC. O termo ADAM é usado para descrever a presença de domínios desintegrina e metaloprotease. As ADAMs entretanto, são proteínas multi-modulares, ou seja, apresentam vários domínios com funções e estruturas específicas. Uma ADAM típica apresenta um **pró-domínio**, domínio de reconhecimento da **furina** e domínios **metaloprotease**, **desintegrina** ou **desintegrina-like**, **rico em cisteína**, **EGF-like** (*Epidermal Growth Factor-like*), **transmembrana** e **citoplasmático** (vide figura 8) (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).

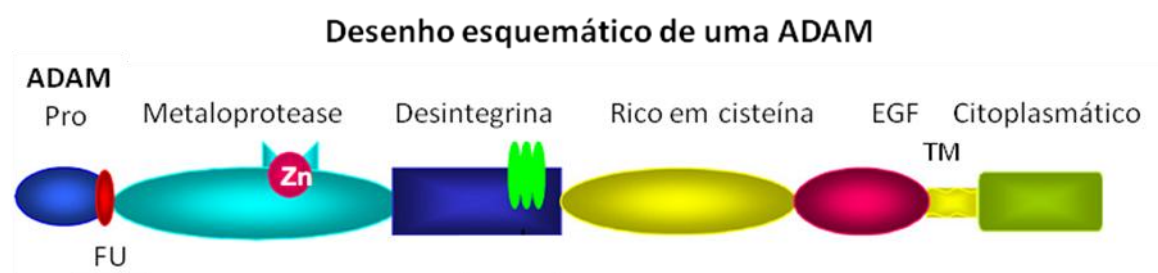


Figura 8 – Esquema da estrutura de uma ADAM com seus diferentes domínios.

Pro: pró-domínio, FU: sítio de reconhecimento de furina, Metaloprotease: domínio metaloprotease, Desintegrina: domínio desintegrina, Rico em Cisteína: domínio rico em cisteína, EGF: domínio *Epidermal Growth Factor-like*, TM: domínio transmembrana, Citoplasmático: domínio citoplasmático. Fonte: Modificado de ROCKS *et al.*, 2008.

As ADAMs são membros da superfamília das proteases dependentes de zinco, que por sua vez, é dividida de acordo com a estrutura primária de seus sítios catalíticos e inclui os subgrupos das gluzincinas, metzincinas, inuzincinas, carboxipeptidases e DD carboxipeptidases (HOOPER, 1994). As ADAMs pertencem ao subgrupo das metzincinas, o qual é também dividido em serralisinas, astacinas, matrixinas e adamalinas. As matrixinas são as metalopeptidases de matriz ou MMPs, as quais foram descritas anteriormente (CHANG; WERB, 2001). As ADAMs também são chamadas de MDCs (*Metalloprotease/Disintegrin/Cystein-rich*) e recebem, seguido ao nome, um número que representa a ordem de sua descoberta. Em humanos, foram identificados até o presente momento cerca de 19 genes que codificam para ADAMs (vide tabela 2) e mais de 30 membros já foram descritos, fato possível por estes genes sofrerem *splicing* alternativo,

permitindo a formação de mais de um tipo de ADAM por um mesmo gene. As ADAMs são encontradas também em outras espécies, incluindo *C. elegans*, *Drosophila* e *Xenopus*, mas não estão presentes em *E. coli*, *S. cerevisiae*, ou em plantas (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; REISS; LUDWIG; SAFTIG, 2006; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).

Tabela 2 – Alguns membros da família das ADAMs

ADAM	Outros nomes	Tipo	Funções	Integrinas	Localização
ADAM1	Fertilin- α , PH-30 α	NP	Fusão espermatozóide-óvulo	$\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Espermatozóide
ADAM2	Fertilin- β , PH-30 β	NP	Fusão espermatozóide-óvulo	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Espermatozóide
ADAM3	CYRN, tMDC	NP		$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Espermatozóide
ADAM8	MS2	P	Infiltração de neutrófilos		Macrófagos e neutrófilos
ADAM9	MDC9, MCMP, Meltrin- γ	P	Clivagem de HB-EGF e APP, digestão de fibronectina e gelatina	$\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha v\beta 5$	Vários tecidos
ADAM11	MDC	NP			Cérebro
ADAM12	Meltrin- α , MCMP, MLTN	P	Disgestão de colágeno IV, fibronectina e gelatina	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Osteoblastos, condrócitos
ADAM15	Metargidin, MDC15	P	Digestão de colágeno IV e gelatina	$\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Osteoclastos, condrócitos, células endoteliais
ADAM17	TACE, c5VP	P	Clivagem de TNF- α , APP e TGF- β	$\alpha 5\beta 1$	Macrófagos e vários tecidos
ADAM19	Meltrin- β	P	Formação de neurônios	$\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$	Testículos
ADAM23	MDC3	NP		$\alpha v\beta 3$	Cérebro e coração
ADAM24	Testinase-1	NP	Fusão espermatozóide-óvulo		Testículos
ADAM28	E-MDC II, MDC-Lm, MDC-Ls	P	Digestão de IGFBP	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha 9\beta 1$	Testículos, pulmão, linfócitos
ADAM33		P	Clivagem de APP e cadeia β da insulina	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$	Pulmão

Legenda: APP (*Amyloid precursor protein*), HB-EGF (*Heparin-binding protein*), IGFBP-3 (*Insulin Growth Factor Binding-Protein 3*), NP (*Non-Proteinase type*, sem atividade proteolítica), P (*Proteinase type*, com atividade proteolítica), TGF (*Transforming Growth Factor*), TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Fonte: Modificado de MOCHIZUKI, 2007.

Há evidências de que cada um dos domínios tenha um papel funcional, e não apenas estrutural, em pelo menos uma das ADAMs identificadas até o momento (BLOBEL *et al.*, 1992; YUAN; PRIMAKOFF; MYLES, 1997; CHO *et al.*, 1998; IZUMI *et al.*, 1998; LOECHEL *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998; IBA *et al.*, 1999; ROGHANI *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 2001). Muitas ADAMs são proteínas transmembrana do tipo I e se ancoram

devido à presença do domínio transmembrana próximo a região C-terminal. Algumas ADAMs, entretanto, apresentam também uma forma alternativa solúvel e secretada gerada por *splicing* alternativo. Como exemplos destas ADAMs temos a 9, 11, 12, 17 e 28 (EMI *et al.*, 1993; GILPIN *et al.*, 1998; CERRETTI *et al.*, 1999; ROBERTS *et al.*, 1999; ROGHANI *et al.*, 1999; MAZZOCCA *et al.*, 2005).

Dados obtidos até o momento indicam que as ADAMs são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e em seguida, transportadas para o Complexo de Golgi para maturação (LUM; REID; BLOBEL, 1998; ROGHANI *et al.*, 1999). A maturação envolve a remoção do pró-domínio da estrutura da ADAM pela clivagem de proteases, como a furina, o que torna o domínio metaloprotease ativo (DUFFY *et al.*, 2003; SEALS; COURTNEIDGE, 2003). A seguir, serão descritas de forma resumida as principais funções identificadas até o momento dos diferentes domínios presentes nas ADAMs.

Pró-domínio

A região N-terminal das ADAMs possui uma seqüência sinal que direciona para a via secretória e um pró-domínio que possui função na maturação, pois sua presença mantém o domínio metaloprotease inativo. A ativação do domínio metaloprotease se dá pelo mecanismo de *cystein-switch* (VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990; BECKER *et al.*, 1995) no qual um resíduo conservado de cisteína, presente no pró-domínio, coordena o íon zinco (Zn^{2+}) do sítio ativo e o mantém inativo. Após a remoção do pró-domínio e a conseqüente liberação do sítio ativo, o domínio metaloprotease torna-se ativo e é capaz de realizar suas funções catalíticas. Outra suposta função do pró-domínio seria o de chaperona, ou seja, o pró-domínio poderia servir para fornecer estruturalmente a configuração apropriada para a proteína como um todo ou especificamente para o domínio metaloprotease (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Domínio Metaloprotease

O domínio metaloprotease é responsável pelo processamento hidrolítico dos substratos das ADAMs. Ele possui um sítio ativo que contém um íon Zn^{2+} e moléculas de água, os quais são necessários para o mecanismo catalítico. Três resíduos conservados de histidina e um de metionina coordenam o íon Zn^{2+} do sítio ativo. O resíduo de metionina faz parte de um motivo denominado *Met turn* que rodeia o motivo consenso HExxHxxGxxH. Os inibidores do domínio metaloprotease das ADAMs podem ser divididos em quatro classes: os inibidores

que agem por denaturação, os quelantes de zinco, as moléculas pequenas inibidoras do mecanismo de catálise e os inibidores protéicos chamados TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteases*). Estes últimos são reguladores endógenos das metalopeptidases de matriz (MMPs) (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Domínio desintegrina

O domínio desintegrina das ADAMs é único entre as moléculas de adesão da superfície celular (BLOBEL *et al.*, 1992) e está estruturalmente relacionado com as metalopeptidases de venenos de serpente (SVMPs). O nome desintegrina é utilizado para descrever a função deste domínio, na ligação com as integrinas. Nos venenos de serpente as desintegrinas ligam-se às integrinas das plaquetas impedindo que as mesmas interajam com seus ligantes naturais, tais como o fibrinogênio, inibindo a agregação plaquetária no sítio do ferimento e contribuindo para o efeito hemorrágico típico da picada de serpente (BJARNASON; FOX, 1994; 1995). O domínio desintegrina das ADAMs consiste de aproximadamente 90 aminoácidos (SEALS; COURTNEIDGE, 2003). O domínio desintegrina da ADAM15 possui uma seqüência RGD que pode se associar com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_1$ (NATH *et al.*, 1999; ETO *et al.*, 2002). Contudo, a maioria das ADAMs não possui a seqüência adesiva RGD e ainda assim as mesmas são capazes de manter associação com as integrinas da superfície celular (ETO *et al.*, 2002), como a ADAM9 que possui a seqüência ECD e se liga a integrinas como $\alpha_v\beta_5$ (ETO *et al.*, 2002; KARADAG; ZHOU; CROUCHER, 2006). Entretanto, as bases estruturais e os detalhes da ligação entre ADAMs e integrinas ainda não estão completamente elucidadas, bem como os efeitos biológicos resultantes desta ligação.

Domínio rico em cisteína e EGF-like

As funções destes domínios nas ADAMs ainda não estão bem esclarecidas. Estes domínios possuem 160 aminoácidos com 10 a 14 resíduos de cisteína (domínio rico em cisteína) e 40 aminoácidos com 6 resíduos de cisteína (*EGF-like*). Tais domínios podem ser importantes para a interação das ADAMs com outras proteínas tais como chaperonas envolvidas na biossíntese e/ou outras proteínas da superfície celular (MILLA *et al.*, 1999; REDDY *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2000). O domínio rico em cisteína pode também complementar a capacidade de ligação do domínio desintegrina e talvez propicie especificidade às interações mediadas por este domínio (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Este domínio pode ser responsável pelas interações célula-MEC, pois em algumas linhagens celulares os peptídeos ECD e RGD, presentes no domínio desintegrina, não influenciaram a adesão destas a MEC, evidenciando o papel do domínio rico em cisteína no processo de adesão celular (ZIGRINO *et al.*, 2007)

Domínio citoplasmático

A porção citosólica das ADAMs varia em tamanho de 40 a 250 aminoácidos e está localizado intracelularmente. Devido ao seu considerável tamanho e estrutura, o domínio citoplasmático pode transmitir sinais entre o meio externo e o meio interno da célula. Tais sinais podem levar a regulação da atividade de metaloprotease, a regulação da sinalização celular e/ou o controle de sua maturação e localização intracelular. Os motivos mais comuns dentro do domínio citoplasmático são sítios de ligação PxxP para proteínas que contêm domínios de ligação SH3. Várias ADAMs possuem sítios potenciais para fosforilação para serina-treonina e/ou tirosina quinases, o que pode não somente regular sua função, como também servir como adaptadoras de outras proteínas importantes na sinalização celular (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

1.7 Funções das ADAMs

Devido à presença dos domínios descritos acima, as ADAMs apresentam funções variadas e de grande importância fisiológica. A ADAM melhor caracterizada até o momento é a TACE (TNF α *Converting Enzyme*) ou ADAM17 (BLACK, 2002). O TNF α é uma citocina e como tal, possui importantes funções no desenvolvimento e em processos inflamatórios, além de ser recrutado em resposta a infecções por microorganismos ou a estados patológicos como, artrite reumatóide e câncer. A ADAM17 também participa da liberação por clivagem de várias outras proteínas ancoradas à membrana celular, incluindo TGF α , receptores de TNF p55 e p75, receptor de interleucina-1 tipo II, VCAM, fractalcinas e proteína amilóide precursora (BLACK *et al.*, 1997; BUXBAUM *et al.*, 1998; PESCHON *et al.*, 1998; GARTON *et al.*, 2001; TSOU; HASKELL; CHARO, 2001). A clivagem destas proteínas de membrana mediada pela ADAM17 ocorre tanto de maneira constitutiva como induzida pela ação de ésteres de forbol (DOEDENS; MAHIMKAR; BLACK, 2003). Além da ADAM17, outras ADAMs como a ADAM9 e 10 também são capazes de clivar TNF- α *in vitro* (LUNN *et*

al., 1997; ROSENDAHL *et al.*, 1997; AMOUR *et al.*, 2000). Desta forma, o estudo dos mecanismos de clivagem de citocinas pelas ADAMs é de grande importância terapêutica.

Outra função importante das ADAMs está relacionada ao processamento de fatores de crescimento e seus receptores. A produção de fatores de crescimento em resposta a diferentes estímulos é muitas vezes controlada em nível transcricional, porém, muitos destes fatores são produzidos em formas precursoras ancoradas a membrana ou a MEC, o que possibilita outra forma de regulação, através de sua clivagem. A clivagem destes fatores de crescimento é muitas vezes realizada por ADAMs. Muitos ligantes para receptores de EGF (*Epidermal Growth Factor*) são liberados da superfície celular em resposta a diferentes estímulos. Um destes ligantes é o ligante de heparina (HB-EGF), o qual ativa o receptor de EGF (MASSAGUE; PANDIELLA, 1993). O HB-EGF é composto de um peptídeo sinal, uma região de ligação a heparina, um domínio EGF-like, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. A forma ancorada à membrana do HB-EGF é ativa e sua ligação com a integrina $\alpha_3\beta_1$ transmite um sinal que inibe a proliferação celular (RAAB; KLAGSBRUN, 1997). O HB-EGF também é processado em resposta a ativação da proteína quinase C (PKC) por ésteres de forbol, gerando uma forma solúvel mitogenicamente ativa (GECHTMAN *et al.*, 1999). A ativação do receptor HB-EGF dependente do ligante HB-EGF também ocorre quando uma proteína G acoplada a seu receptor é ativada e este processo é mediado por metalopeptidases (PRENZEL *et al.*, 1999) tais como a ADAM9. O domínio citoplasmático da ADAM9 se associa e é fosforilado pela PKC (IZUMI *et al.*, 1998). As ADAMs10 (YAN; SHIRAKABE; WERB, 2002) e 12 (ASAKURA *et al.*, 2002) também parecem participar da regulação da clivagem do HB-EGF em diferentes linhagens celulares.

Os fatores de crescimento são também produzidos por células tumorais que são muitas vezes móveis e invasivas, o que contribui com sua tumorigenicidade. Devido ao papel das ADAMs na regulação da clivagem dos fatores de crescimento em células normais, é coerente postular que as mesmas possam estar envolvidas nestes processos também em células tumorais. A ADAM9 tem sua expressão aumentada em um grande número de carcinomas humanos (O'SHEA *et al.*, 2003), da mesma forma que as ADAMs 10 (YAVARI *et al.*, 1998) e 12 (WU; CROUCHER; MCKIE, 1997; IBA *et al.*, 2000). Além disso, devido ao papel das ADAMs em processos celulares migratórios (dada sua função no remodelamento da MEC, vide abaixo) é plausível cogitar que as mesmas estejam envolvidas em processos de formação de metástases. Maiores estudos nestas áreas são necessários para elucidar completamente de que maneira as ADAMs participam destes processos.

As ADAMs também desempenham importantes funções na degradação dos componentes da MEC. As ADAMs 10 (MILLICHIP *et al.*, 1998) e 15 (MARTIN *et al.*, 2002) são capazes de clivar colágeno tipo IV *in vitro* e células que expressam a ADAM13 são capazes de degradar fibronectina (ALFANDARI *et al.*, 2001). Estes processos produzem efeitos importantes na migração celular (SEALS; COURTNEIDGE, 2003). A clivagem de outras moléculas tais como proteínas ligantes de fatores de crescimento semelhantes à insulina, as IGFBP, é também mediada por ADAMs. A forma solúvel da ADAM12 (ADAM12-S) se liga e processa as IGFbps 3 e 5 (LOECHEL *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2000). Esta regulação é importante em doenças ligadas ao baixo nível de IGF característico de pacientes com osteoartrite e diabetes, bem como aos altos níveis de IGF-1 observados em alguns tumores (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Algumas ADAMs, como as ADAM9 e 10, desempenham funções de α -secretases. A acumulação do peptídeo β -amilóide no córtex cerebral é característica na patogênese da doença de Alzheimer (GANDY; PETANCESKA, 2000). Os peptídeos β -amilóide são formados pelo processamento da proteína precursora amilóide (APP) pela ação de β e γ -secretases. Uma via alternativa na secreção de APP é através da atividade de α -secretases (APP α) e a degradação da APP por estas enzimas elimina os efeitos nocivos da formação do peptídeo β -amilóide. A expressão aumentada de ADAM9 (KOIKE *et al.*, 1999; HOTODA *et al.*, 2002; ASAI *et al.*, 2003) e ADAM10 (LAMMICH *et al.*, 1999) em células da linhagem COS-7 e HEK, respectivamente, aumenta a produção de APP α , sugerindo um papel de α -secretases para estas moléculas.

1.8 ADAM9

A ADAM9 é também conhecida como MDC9 (indicando a presença dos domínios Metaloprotease, Desintegrina e rico em Cisteína 9) ou meltrin γ . É uma proteína de cerca de 84kDa e pode estar ancorada à membrana celular ou estar presente em uma forma solúvel (MAZZOCCA *et al.*, 2005; FRY; TOKER, 2010). Estudos mostraram que esta proteína é altamente expressa em tumores humanos e em diferentes tecidos, como por exemplo, em carcinoma de mama (O'SHEA *et al.*, 2003), de próstata (FRITZSCHE *et al.*, 2008) e de pulmão (SHINTANI *et al.*, 2004) sugerindo-se uma correlação entre a expressão da ADAM9 e a progressão tumoral, por aumentar a malignidade dos tumores e aumentar a invasão de alguns tipos de células tumorais (SHINTANI *et al.*, 2004; MAZZOCCA *et al.*, 2005). A

ADAM9 possui uma seqüência ECD em seu domínio desintegrina-*like*. Este motivo participa da interação deste domínio com receptores de membrana, as integrinas, como $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$, $\alpha_6\beta_1$ entre outras (NATH *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2001; MAZZOCCA *et al.*, 2005; KARADAG; ZHOU; CROUCHER, 2006; COMINETTI *et al.*, 2009). Entretanto, autores como (TAKEDA *et al.*, 2006), através da análise estrutural de uma metaloprotease de veneno de serpente, a VAP1, realçaram o papel da região hipervariável presente no domínio rico em cisteína na interação com ligantes, uma vez que o domínio desintegrina parece estar “empacotado” no domínio rico em cisteína, onde também há uma ponte de dissulfeto que estabiliza a estrutura tornando o domínio desintegrina inacessível para se ligar a outras proteínas.

Um trabalho recente de (XU *et al.*, 2010) mostrou a importância da ADAM9 na progressão tumoral, pois quando esta é silenciada de forma estável há uma redução significativa da invasão das células de carcinoma adenóide cístico *in vitro* e *in vivo*. Experimentos realizados em nosso laboratório também mostraram a redução importante da invasão celular quando a ADAM9 foi silenciada em células tumorais de mama MDA-MB-231 (dados não publicados).

Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão das funções e especificidade desta proteína e para seu uso como ferramenta para desenho de novos fármacos com atividade anti-tumoral e anti-metastática.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar o papel da ADAM9D, uma desintegrina humana recombinante produzida anteriormente em nosso laboratório (COMINETTI *et al.*, 2009) nos processos de migração e invasão tumoral. Para tanto, foram determinados parâmetros quantitativos e qualitativos que identifiquem os diferentes tipos de interação integrina-desintegrina em cultura de células tumorais e não tumorais, além de determinar os efeitos desta desintegrina na adesão, proliferação, migração, invasão e expressão de metalopeptidases de matriz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D)

3.1.1 EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR E PCR

Para a extração de RNA total e posterior amplificação do cDNA dos diferentes domínios da ADAM9, células de câncer de próstata da linhagem DU-145 foram plaqueadas em placas de 3,5cm de diâmetro (1×10^5 células/placa). Em cada placa 1ml de Trizol® foi adicionado e incubado por 5min, as células foram lisadas e coletadas com o auxílio de um “*scraper*”. O lisado foi transferido para tubos de 1,0ml e estes foram incubados por 5min em temperatura ambiente. Adicionaram-se 200µL de clorofórmio ao homogeneizado e os tubos foram vigorosamente agitados por 15seg e incubados por 3min. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 15min, 12000x g a 4°C e a fase superior foi transferida para um novo tubo no qual foi adicionado 1mL de isopropanol e incubado durante 10min. Este tubo foi novamente centrifugado (12000x g a 4°C por 10min), o sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol 75% foi adicionado a fase inferior e agitado com auxílio de vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5min 7500rpm a 4°C e o precipitado foi deixado em estufa a 37°C. O RNA foi ressuspensionado em água DEPC e incubado 10min a 55°C.

Após quantificação, o RNA extraído foi utilizado para amplificação por uma reação de RT-PCR (transcriptase reversa seguida de PCR) para o domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D). A seqüência do *primer* forward foi: 5’CAT GGA TCC GCT CCC TCC TGT GGT AAT AAG TTG3’ e a do *primer* reverse foi: 5’GTC GCT CGA G TT A AT ATC CAT TCT GAA TAA AAA CAT CTG3’ (figura 9). O cDNA foi utilizado para uma reação de PCR em termociclador (*Perkin Elmer*). As análises dos produtos de RT-PCR e do PCR foram realizadas em gel de agarose (1%) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e os reagentes utilizados nas reações estão descritos na tabela 3.

	<u>Bam HI</u>														
CAT	GGA	TCC	<u>GCT CCC TCC TGT GGT AAT AAG TTG (Forward ADAM9D)</u>												
1318	GCT	CCC	TCC	TGT	GGT	AAT	AAG	TTG	GTG	GAC	GCT	GGG	GAA	GAG	TGT
1	A	P	S	C	G	N	K	L	V	D	A	G	E	E	C
1364	GAC	TGT	GGT	ACT	CCA	AAG	GAA	TGT	GAA	TTG	GAC	CCT	TGC	TGC	GAA
16	D	C	G	T	P	K	E	C	E	L	D	P	C	C	E
1409	GGA	AGT	ACC	TGT	AAG	CTT	AAA	TCA	TTT	GCT	GAG	TGT	GCA	TAT	GGT
31	G	S	T	C	K	L	K	S	F	A	E	C	A	Y	G
1454	GAC	TGT	TGT	AAA	GAC	TGT	CGG	TTC	CTT	CCA	GGA	GGT	ACT	TTA	TGC
46	D	C	C	K	D	C	R	F	L	P	G	G	T	L	C
1499	CGA	GGA	AAA	ACC	AGT	GAG	TGT	GAT	GTT	CCA	GAG	TAC	TGC	AAT	GGT
61	R	G	K	T	S	E	C	D	V	P	E	Y	C	N	G
	<u>(Reverse ADAM9 D) GT CTA CAA AAA TAA GTC TTA CCT ATA ATT</u>														
1544	TCT	TCT	CAG	TTC	TGT	CAG	CCA	GAT	GTT	TTT	ATT	CAG	AAT	GGA	TAT
76	S	S	Q	F	C	Q	P	D	V	F	I	Q	N	G	Y
1589	CCT	TGC	CAG	AAT	AAC	AAA	GCC	TAT	TGC	TAC	AAC	GGC	ATG	TGC	CAG
91	P	C	Q	N	N	K	A	Y	C	Y	N	G	M	C	Q
1634	TAT	TAT	GAT	GCT	CAA	TGT	CAA	GTC	ATC	TTT	GGC	TCA	AAA	GCC	AAG
106	Y	Y	D	A	Q	C	Q	V	I	F	G	S	K	A	K
1679	GCT	GCC	CCC	AAA	GAT	TGT	TTC	ATT	GAA	GTG	AAT	TCT	AAA	GGT	GAC
121	A	A	P	K	D	C	F	I	E	V	N	S	K	G	D
1724	AGA	TTT	GGC	AAT	TGT	GGT	TTC	TCT	GGC	AAT	GAA	TAC	AAG	AAG	TGT
136	R	F	G	N	C	G	F	S	G	N	E	Y	K	K	C
1769	GCC	ACT	GGG	AAT	GCT	TTG	TGT	GGA	AAG	CTT	CAG	TGT	GAG	AAT	GTA
151	A	T	G	N	A	L	C	G	K	L	Q	C	E	N	V
1814	CAA	GAG	ATA	CCT	GTA	TTT	GGA	ATT	GTG	CCT	GCT	ATT	ATT	CAA	ACG
166	Q	E	I	P	V	F	G	I	V	P	A	I	I	Q	T
1859	CCT	AGT	CGA	GGC	ACC	AAA	TGT	TGG	GGT	GTG	GAT	TTC	CAG	CTA	GGA
181	P	S	R	G	T	K	C	W	G	V	D	F	Q	L	G
1904	TCA	GAT	GTT	CCA	GAT	CCT	GGG	ATG	GTT	AAC	GAA	GGC	ACA	AAA	TGT
196	S	D	V	P	D	P	G	M	V	N	E	G	T	K	C
1949	GGT	GCT	GGA	AAG	ATC	TGT	AGA	AAC	TTC	CAG	TGT	GTA	GAT	GCT	TCT
211	G	A	G	K	I	C	R	N	F	Q	C	V	D	A	S
1994	GTT	CTG	AAT	TAT	GAC										
226	V	L	N	Y	D										

Figura 9 – Sequência de nucleotídeos dos domínios desintegrina, em verde, e rico em cisteína, em azul, da ADAM9 humana.

O domínio desintegrina apresenta duas seqüências ECD, representadas em laranja. Os primers utilizados para a amplificação do cDNA codificante para o domínio estão representados em vermelho, com as seqüências-alvo das enzimas de restrição em rosa. Os números em preto representam a ordem de nucleotídeos a partir da seqüência original que codifica a ADAM9 (Acesso no Gen Bank: NM_003816) e o número de aminoácidos dos domínios estão em verde.

Tabela 3 – Componentes das reações de RT-PCR e PCR utilizadas para a amplificação do RNA e do cDNA codificante para o domínio desintegrina da ADAM9.

RT-PCR		PCR	
Reagentes	Volume (µL)	Reagentes	Volume (µL)
Água DEPC	21	Tampão da enzima* [10X]	2,5
Reaction Mix 2x	25	dNTP mix (10mM)	1
Primer forward	1	MgCl ₂ (50mM)	0,75
Primer reverse	1	Primer Forward (10µM)	1
Transcriptase reversa	1	Primer Reverse (10µM) ADAM9D	1
molde	1	DNA molde (100ng/µL)	1
		Platinum Taq mix** (unidades)	0,5
		Água livre de nucleases	17,25
Volume final	50	Volume final	25

3.1.2 CLONAGEM DA ADAM9D NO VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-4T-1

O produto obtido a partir da reação de PCR que codifica a ADAM9D foi processado com as enzimas de restrição específicas, *Bam* HI e *Xho* I. O mesmo foi inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1 (*GE Healthcare*) que permite a expressão da proteína de interesse em fusão com a proteína Glutathiona-S-transferase (GST) que facilita sua expressão de forma solúvel no citoplasma de *Escherichia coli*. O vetor foi também tratado com as mesmas enzimas. Após purificação para eliminação de contaminantes indesejáveis, tanto o DNA do plasmídeo, quanto o DNA do inserto foram submetidos à reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*), *overnight* a 16°C. A reação de ligação está descrita na tabela 4.

O construto pGEX-4T-1 foi propagado em células de *E. coli* linhagem DH5α tornadas competentes conforme descrito no próximo item.

Tabela 4 – Componentes da reação utilizada para a ligação do inserto codificante para o domínio desintegrina da ADAM9 humana (ADAM9D) ao vetor pGEX-4T-1 (*GE Healthcare*).

Reagente	Volume (µL)
	ADAM9
DNA vetor (200ng/µL)	1
DNA inserto ADAM9	1,5
Tampão DNA ligase [10X]*	1
T4 DNA Ligase (<i>Invitrogen</i>) (3U/µL)	0,5
Água livre de nucleases	6
Volume final	10

*Tampão otimizado fornecido juntamente com a enzima.

3.1.3 Preparação e transformação de células competentes

Culturas de *E. coli* da linhagem DH5 α e AD494(DE3) foram tornadas “competentes” para o recebimento dos plasmídeos através do tratamento com solução estéril de CaCl₂ 50mM. A linhagem contendo o genótipo DE3 possuem uma cópia cromossomal do gene que codifica a RNA polimerase do fago T7, sob controle do promotor *lacUV5*, que é induzível por IPTG (STUDIER; MOFFATT, 1986). Assim, a adição de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) às culturas destas linhagens induz a expressão da T7 RNA polimerase que por sua vez irá transcrever a seqüência alvo de DNA inserida no plasmídeo e que está sob controle de um promotor do mesmo tipo.

Para a produção de células competentes, as culturas foram crescidas a 37°C em 250rpm até alcançar a D.O. _{600nm} = 0,4 - 0,6. A cultura, então, foi centrifugada a 5000rpm por 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 3mL de CaCl₂ 50mM estéril e mantido no gelo por 30min. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 5000 x g por 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 600 μ L de CaCl₂ 50mM estéril. As células foram armazenadas a 4°C e utilizadas dentro de 48h. Para a transformação, 100 μ L de células competentes de *E. coli* foram incubadas com 10 μ L da reação de ligação vetor-inserto (pGEX-4T-1ADAM9D) na proporção de 1:3 e mantidas no gelo por 30min. Após este tempo, os tubos foram transferidos rapidamente para um banho a 42°C e incubados por aproximadamente 30seg e, em seguida, resfriados no gelo por 2min. Após adição de 400 μ L de meio LB, as células foram incubadas a 37°C, por 1h, sob agitação 250rpm e, em seguida, inoculadas em placas contendo LB-ágar adicionado de carbenicilina (concentração final de 50 μ g/mL), sendo então incubadas em uma estufa a 37°C *overnight*.

3.1.4 Preparação de DNA plasmidial e análise de restrição

Para confirmar a transformação das linhagens bacterianas, o DNA plasmidial de cada colônia obtida foi isolado através do *kit* FastPlasmid Mini (Eppendorf). Em seguida, o DNA foi digerido por 3h a 37°C com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I e o produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%.

3.1.5 Expressão piloto da proteína recombinante ADAM9D em *E. coli*

Culturas de *E. coli* AD494(DE3) transformadas com o vetor de expressão, pGEX-4T-1-ADAM9D, foram crescidas a 37°C em 10mL de meio LB estéril, contendo os antibióticos carbenicilina (50µg/µL) e canamicina (30µg/ml) sob agitação de 250rpm, até atingir a fase *log* de crescimento D.O. _{600nm} = 0,6 - 0,8. Em seguida, uma alíquota representando o tempo zero (T0) de indução foi retirada e armazenada para uso posterior. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG, na concentração final de 0,5mM, durante 3h a 37° C e agitação de 250rpm. Ao final da indução, uma alíquota da cultura representando o tempo de três horas de indução (T3) foi retirada e armazenada. As duas alíquotas foram centrifugadas por 1min a 13000x g, os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados celulares foram ressuspensos em 100µL de água estéril. Uma quantidade de 10µL de cada amostra foi misturada a 10µL de tampão de amostra [Tris-HCl 0,125M pH 6,8 - SDS 4% (w/v) - Glicerol 20% (v/v) - β-mercaptoetanol 0,1 M - Azul de Bromofenol 0,02% (w/v)] para gel de poliacrilamida (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970).

3.2 Expressão do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D)

Uma colônia de *E. coli* da linhagem AD494(DE3) transformada com o plasmídeo recombinante pGEX-4T-1ADAM9D foi crescida *overnight* a 37°C sob agitação constante de 250rpm em 15mL de meio LB seletivo contendo carbenicilina (50µg/µL) e canamicina (30µg/mL). No dia seguinte, 2,5mL deste inóculo foi adicionado a 4 frascos contendo 250mL de meio LB (diluição 1:100) cada um. As culturas foram incubadas nas mesmas condições acima até a D.O. _{600nm} = 1. Em seguida, foi adicionado à cultura o agente IPTG (0,5mM) e a mesma foi incubada *overnigh* a 25°C, sob agitação de 250rpm. Decorrido o tempo de indução, a cultura foi centrifugada (Sorvall RC 5C Plus) a 10.000x g a 4°C por 15min. O precipitado celular foi ressuspensado em 20mL de tampão PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, pH 7.3). As células mantidas a 4°C foram lisadas com auxílio de sonificador (Sonics & Materials) ajustado para uma amplitude 20 *hertz*, por 5 vezes de 1min/cada com intervalo de 1min. Em seguida, a amostra sonicada foi centrifugada a 13.000 x g a 4°C por 15min conforme Cominetti *et al.* (2009).

3.3 Purificação da ADAM9D

O sobrenadante proveniente da expressão em *E. coli* da linhagem AD494(DE3) foi aplicado em uma coluna (10cm x 1,5cm) contendo 4mL da resina de Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) com auxílio de uma bomba peristáltica (GE Healthcare) em um fluxo de 2mL/min. A clivagem foi realizada com a amostra ligada à resina, assim, após a passagem do sobrenadante e de 10 volumes de PBS, a resina foi desempacotada da coluna. Para a remoção da GST foi utilizada a protease trombina (GE Healthcare), para tal a resina foi incubada com 50U de trombina durante 4h em temperatura ambiente sob leve agitação. Após a clivagem, a resina foi re-empacotada e lavada com dois volumes de PBS. As frações eluídas com PBS foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE. A proteína de fusão foi liberada da resina após eluição com 5 volumes de um tampão contendo GSH (Tris-HCl 50mM, GSH 20mM, pH 8.0) e também analisada em SDS-PAGE. As amostras eluídas após clivagem com trombina que ainda apresentaram GST contaminante foram reunidas e aplicadas novamente na resina para sua eliminação.

Para eliminar quaisquer vestígios de trombina na amostra, uma cromatografia de afinidade utilizando uma coluna contendo resina Benzamidine FF (2mL) (Ge Healthcare) foi realizada. Para tal, a coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação (Na_2HPO_4 20mM, NaCl 150mM, pH 7,5) com auxílio de uma bomba peristáltica (GE Healthcare) em fluxo de 2mL/min. Em seguida, a amostra contendo a ADAM9D clivada, foi aplicada à coluna e lavada com 2 volumes de tampão de ligação, seguido da passagem de 2 volumes de tampão de lavagem (Na_2HPO_4 20mM, NaCl 1M, pH 7,5). A eluição da trombina foi realizada pela passagem de 2 volumes de Hidroclorato de Guanidina 6M. As amostras foram coletadas em tubos de 1,5mL e imediatamente analisadas em SDS-PAGE. A coluna foi re-equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação e em seguida, armazenada em uma solução contendo ácido acético 0,1M:Etanol 20% em temperatura de 4°C.

3.3.1 Sequenciamento N-terminal da ADAM9D

Após a purificação da ADAM9D, a partir do sobrenadante correspondente a um ensaio de expressão, e sua respectiva clivagem com trombina, a mesma foi transferida para uma membrana de PVDF e esta foi utilizada para o sequenciamento da região N-terminal (8 aminoácidos) em sequenciador *Shimadzu* (PPSQ-20).

3.4 Determinação da concentração protéica

A concentração protéica das amostras foi determinada com auxílio do kit *BCA Protein Assay* (Pierce) utilizando a proteína BSA como padrão.

3.5 Linhagens e cultivos celulares:

As linhagens celulares utilizadas neste projeto foram células MDA-MB-231 (câncer de mama), DU-145 (câncer de próstata) e fibroblastos humanos (FH). As células foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂ em estufa de cultura de células e em meio apropriado adicionado 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*). As células MDA-MB-231 foram cedidas pelo Dr. Michel Crépin do laboratório de hemostase, endotélio e angiogênese do INSERM-França Unidade 533, os FH foram comprados no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ - <http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>) células DU-145 foram cedidas Professora Verônica Morandi (UERJ).

3.6 Ensaio de Competição com anticorpos

Neste ensaio as células DU-145 e MDA-MB-231 foram contadas e marcadas com 12,5µM de CMFDA (*5-chloromethylfluoresceina diacetato*), por 30 min a 37°C. Decorrido este tempo, as células foram lavadas com tampão de adesão (HEPES 20mM, pH 7,35, contendo NaCl 150mM, KCl 5mM, MgSO₄ 1mM e MnCl₂ 1mM) para retirar o excesso de fluoróforo. Em seguida, as células marcadas (1x10⁵ células/poço) foram incubadas por 1h a 37°C com os anticorpos bloqueadores anti-β1 (R&D Systems – MAB17781), anti-α2 (R&D Systems MAB1233), anti-α6 (R&D Systems – MAB13501), anti-αvβ5 (R&D Systems – MAB2528), anti-α4 (Sigma – I6528), anti-αvβ3 (Chemicon – MAB1976), todos na concentração de 10µg/mL. Como controle, as células foram incubadas com PBS, em substituição aos anticorpos. Após a incubação, as células incubadas com os anticorpos ou PBS foram plaqueadas sobre os poços cobertos com ADAM9D (10µg), por 30min a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com tampão de adesão para remover as células não aderidas e em seguida as células foram lisadas pela adição de Triton X-100 0,5%. A placa foi lida em um fluorímetro (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) com filtros de 485nm de excitação e 530nm de emissão.

3.7 Inibição da Adesão

No dia anterior ao ensaio, 10µg de colágeno (colágeno tipo I diluído em ácido acético 0,1%) foi utilizado como *coating* em placas de 96 poços, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, o excesso do *coating* foi retirado e os poços foram bloqueados com BSA 1% em tampão de adesão, por 2 horas a temperatura ambiente. As células MDA-MB-213 e DU-145 foram contadas e marcadas como descrito no item anterior. Em seguida, as células foram lavadas e 1x10⁵ células/poço foram incubadas por 30min a 37°C com PBS (controle) ou com diferentes concentrações de ADAM9D (10nM a 2000nM). Após a incubação, as células foram plaqueadas aos poços recobertos com os ligantes, e incubadas por 30min a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com tampão de adesão, e posteriormente, as células que aderiram foram lisadas com Triton X-100 a 0,5%. A leitura da fluorescência foi realizada em fluorímetro (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) com filtros de 485nm de excitação e 530nm de emissão.

3.8 Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo, células de câncer de próstata da linhagem DU-145 e células de câncer de mama MDA-MB-231 foram soltas manualmente da garrafa de cultura com auxílio de um *scraper*, contadas (1x10⁵/tubo) e incubadas por 40min a 4°C com anticorpos específicos contra as integrinas αvβ3 (MAB 1976, Chemicon), αvβ5 (MAB 2528, R&D Systems), α2 (MAB 1233, R&D Systems), α4 (I6528, Sigma), α6 (MAB 13501, R&D Systems) e β1 (MAB 17781, R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram lavadas com 1mL de tampão FACS (PBS, 2% FBS) e centrifugadas a 1.300rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 45min a 4°C com 100µL de tampão FACS adicionado do anticorpo secundário (*Goat anti-mouse* IgG, BD Biosciences) marcado com o fluoróforo FITC (Fluoresceína isotiocianato; 2,5µL/tubo). Em seguida, as células foram lavadas como descrito anteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com tampão de fixação (tampão FACS adicionado de formaldeído 1%), *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as células foram analisadas no citômetro (FACSCalibur – BD Biosciences).

3.9 Proliferação celular

A ADAM9D foi testada com relação à sua capacidade de promover proliferação celular, de acordo com o protocolo descrito por Mosman (1983) utilizando o MTT [3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Para tal, as diferentes linhagens celulares utilizadas no experimento foram preparadas na concentração de 5×10^4 células/100 μ L em meio apropriado adicionado de 10% de FBS e plaqueadas em placas de 96 poços estéreis (Corning). As células foram mantidas por 2h a 37°C e 5% CO₂ em estufa de cultura de células. Decorrido o tempo de incubação, as diferentes concentrações de ADAM9D (10 a 1000nM) foram adicionadas em meio completo (com a presença de FBS). As células foram incubadas por 24, 48h e 72h nas mesmas condições descritas acima e a medida da proliferação celular induzida pela ADAM9D foi realizada em comparação aos poços aonde PBS foi adicionado no lugar da proteína de interesse e ao controle negativo (células na ausência de FBS). Após o tempo de incubação, foi adicionado 50 μ L/poço de uma solução de 2,5mg/mL de MTT. O MTT é muito utilizado em ensaios para determinação da proliferação e viabilidade celular e se baseia na atividade da desidrogenase mitocondrial que é capaz de reduzir esta substância e formar cristais de formazan (de coloração violeta) os quais, após solubilizados podem ser medidos espectrofotometricamente. As placas foram então mantidas durante 4h a 37°C. A densidade óptica foi medida em um leitor de placa (Dynex) em comprimento de onda de 570nm.

3.10 Ensaios de invasão e migração celular

3.10.1 Invasão Celular

Ensaios de invasão em matrigel foram realizados com o *kit BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences) que apresenta membranas com poros de 8 μ m em placas de 6 poços. Brevemente, $1,25 \times 10^5$ células da linhagem de câncer de próstata DU-145 e da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 em 1mL de meio apropriado sem soro foram semeadas na parte superior dos poços da câmara de invasão na presença ou ausência (controle) da ADAM9D (1 μ M) ou dos anticorpos anti- α v β 3 e anti-v β 5 (10 μ g/mL) para a linhagem de DU-145. Nos poços inferiores foram adicionados 2,5mL de meio apropriado adicionado de 10% de FBS, o qual agiu como quimioatraente indutor da invasão. As placas foram incubadas por 22h (37°C, 5% CO₂) e em seguida, as células que não invadiram pelo matrigel foram removidas da superfície da membrana com auxílio de um cotonete. As células invasoras, que penetraram pelos poros e migraram para a superfície interna do matrigel foram fixadas em metanol (100%) e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina (1%) diluído em borato de sódio (1%). A membrana foi recortada da câmara e montada em uma lâmina histológica com auxílio de óleo de imersão. Foram escolhidos e fotografados 10

campos aleatórios em cada lâmina e a área recoberta pelas células nestes campos foi medida com auxílio do software Image J. E a análise foi feita em porcentagem, comparando-se com o controle positivo.

3.10.2 Migração Celular

Para o ensaio de migração *trans-well* insertos com poros de 8µm (12 poços por placa) (BD Biosciences) foram utilizados para verificar a migração celular na presença ou ausência da ADAM9D. As diferentes linhagens celulares foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) na parte superior dos insertos e atraídas pela presença do quimioatraente na parte inferior da placa (FBS), o controle negativo são as células plaqueadas no inserto sem quimioatraente no poço. As placas foram incubadas por 22h (37°C, 5% CO₂) e as células invasoras foram fixadas e coradas como descrito acima, assim como a montagem da lâmina. Foram escolhidos e fotografados 10 campos aleatórios em cada lâmina e sua análise foi realizada pela contagem das células dos diferentes campos de cada tratamento.

3.10.3 Migração celular – Wound Healing:

Para o ensaio de migração utilizando o método de *wound healing*, (WANG *et al.*; 2010) as células DU-145 (em meio RPMI completo) e as células MDA-MB-231 (em meio DMEM completo) foram plaqueadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas em estufa até a confluência de 100%. Com o auxílio de uma ponteira de micropipeta foram realizados riscos nas placas e as mesmas foram então lavadas 3 vezes com meio de cultura apropriado, para a remoção das células que se soltaram. Posteriormente, as células foram incubadas com meio novo completo contendo ou não a ADAM9D (100 - 2000nM). Fotos das riscas foram realizadas nos tempos de 0h, 24h e 48h para análise da migração. A área do fechamento da risca foi calculado com auxílio do *software* ImageJ nos diferentes tempos e sua porcentagem foi calculada com a seguinte fórmula (YUE *et al.*, 2010):

$$\% \text{ Fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100)$$

O cálculo da porcentagem do fechamento da risca se refere à diferença da área no tempo zero com o tempo de 24h dividido pelo tempo zero multiplicado por 100. Os dados foram analisados com o auxílio do *software* GraphPad Prism 4.

3.11 Análise de Metalopeptidases de Matriz (MMP) - Zimografia

A atividade de MMPs foi verificada pela técnica de zimografia, adaptado de Cleutjens *et al.* (1995) e Hu & Beeton (2010). Células da linhagem MDA-MB-231 e DU-145 foram plaqueadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas em estufa até a confluência de 100%. Posteriormente, foram realizados riscos nos poços como descrito no item 3.9.3 e incubadas em meio sem FBS com a ADAM9D nas concentrações de 100nM e 1000nM ou PBS (37°C, 5% CO₂). Após 22h de incubação, o sobrenadante das células foi retirado, e as células foram lavadas 2 vezes com 1mL de PBS. Em seguida, as células foram lisadas com tampão de lise (0,2% de Triton X-100 em 0,2M de Tris-HCl, pH 7.4) e incubadas por 5min a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o sobrenadante e o lisado celular foram centrifugados por 10min a 4°C, 1300rpm. A concentração protéica foi determinada como descrito no item 3.4.

Para a linhagem MDA-MDA-231, 10µg do sobrenadante, e para a linhagem DU-145, 120µg de sobrenadante, foram adicionados a 10µL de tampão de amostra sem agente redutor β-mercaptoetanol para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e gelatina (concentração final de 1mg/mL).

Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes por 20min em tampão de lavagem (2,5% de Triton X-100), e depois incubado por 18h com o tampão de incubação (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ mM e NaN₃ 0,02%). O gel foi então corado por 30min com *Comassie Brilliant Blue* (Sigma) e descorado (10% metanol, 10% ácido acético e 80% água) para visualização das bandas, indicando a atividade das MMPs. Os géis foram fotografados e as bandas foram quantificadas com relação sua intensidade com o auxílio do *software GeneTools* v3.06 (Syngene, Cambridge, UK), e os valores são expressos em unidades arbitrárias. O lisado celular não foi utilizado, pois não apresentou expressão das MMPs em diferentes concentrações testadas.

Esta mesma técnica foi também utilizada para quantificar as MMPs do sobrenadante dos insertos do ensaio de migração celular – *transwell* da linhagem DU-145, item 3.10.2.

3.12 Análise estatística:

Para a análise estatística foi obtida a média e o erro padrão para cada grupo em todos os experimentos. A comparação entre os grupos foi feita usando análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, com auxílio do programa GraphPad Prism 4.

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D)

4.1.1 Extração de RNA, RT-PCR e amplificação do cDNA Amplificação do cDNA codificante para a ADAM9D

O RNA extraído das células de câncer de próstata da linhagem DU-145 para a realização da RT-PCR está apresentado na figura 10 e os produtos de RT-PCR e PCR para o domínio desintegrina da ADAM9 estão indicados na figura 11 e 12, respectivamente.

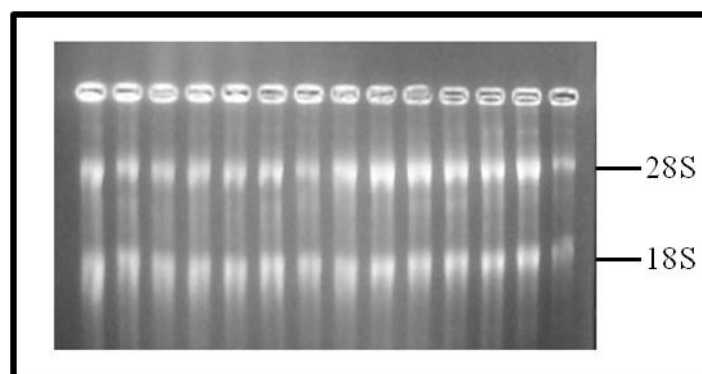


Figura 10 – Extração de RNA das células de câncer de próstata da linhagem DU-145.

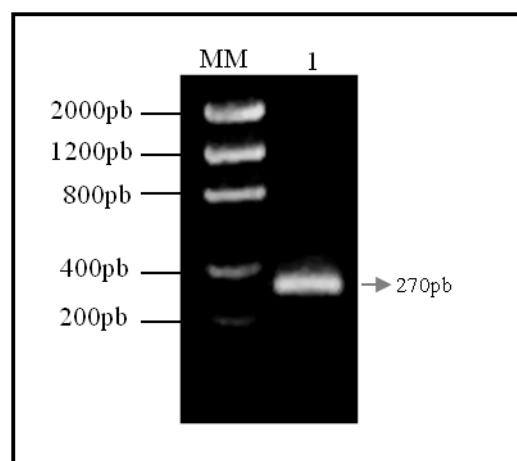


Figura 11 - RT-PCR do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D).
MM: Marcador de massa molecular (Low Mass DNA Ladder – Invitrogen); Linha 1: ADAM9D (270pb).

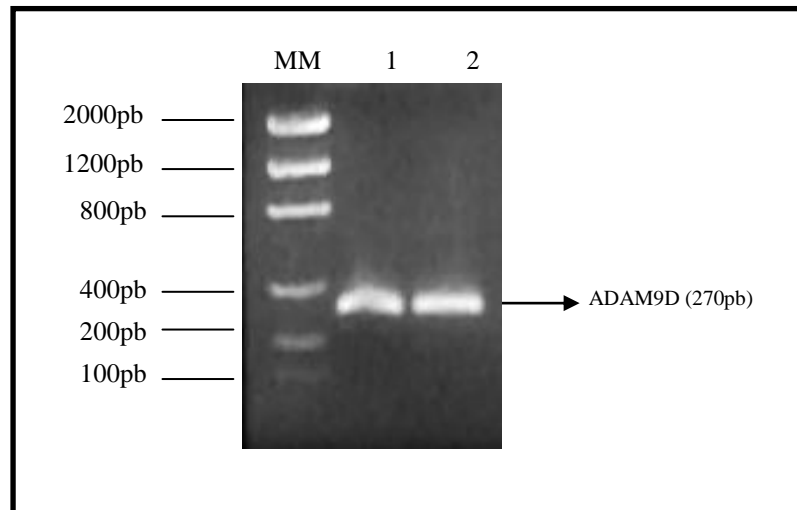


Figura 12 - Amplificação por PCR do cDNA codificante para o domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D).

MM = Marcador de massa molecular (*Low Mass DNA Ladder – Invitrogen*). Linha 1 e 2 = ADAM9D.

4.1.2 Confirmação da clonagem da ADAM9D no vetor de expressão pGEX-4T-1 por análise de restrição

A clonagem da ADAM9D no vetor pGEX-4T-1 foi confirmada por análise de restrição com as enzimas *Bam* HI e *Xho*I e seu resultado foi analisado em gel de agarose 1%, (figura 13).

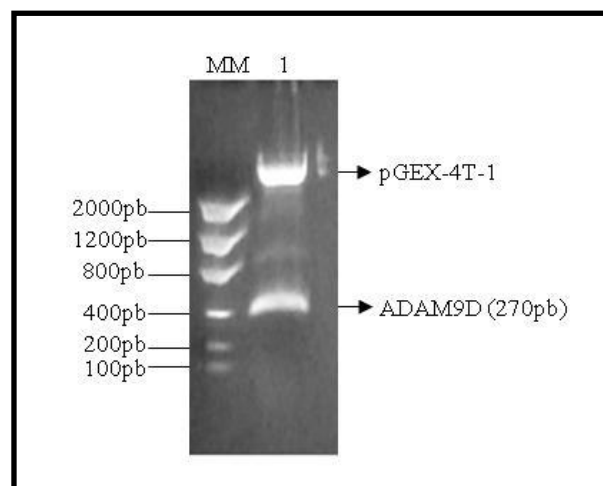


Figura 13 – Análise de restrição confirmando a clonagem do domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D) no vetor pGEX-4T-1 (*GE Healthcare*).

MM: Marcador de massa molecular (*Low mass DNA ladder – Invitrogen*), Linha 1: Vetor pGEX-4T-1 tratado com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I mostrando a liberação do inserto correspondente à ADAM9D.

4.1.3 Expressão da proteína recombinante ADAM9D em *E. coli*

Foram realizadas expressões de pequena e larga escala, assim como a verificação da solubilidade da proteína recombinante ADAM9D. Após análise dos resultados em SDS-PAGE foi possível evidenciar a expressão da proteína de interesse na sua forma solúvel (figura 14, setas).

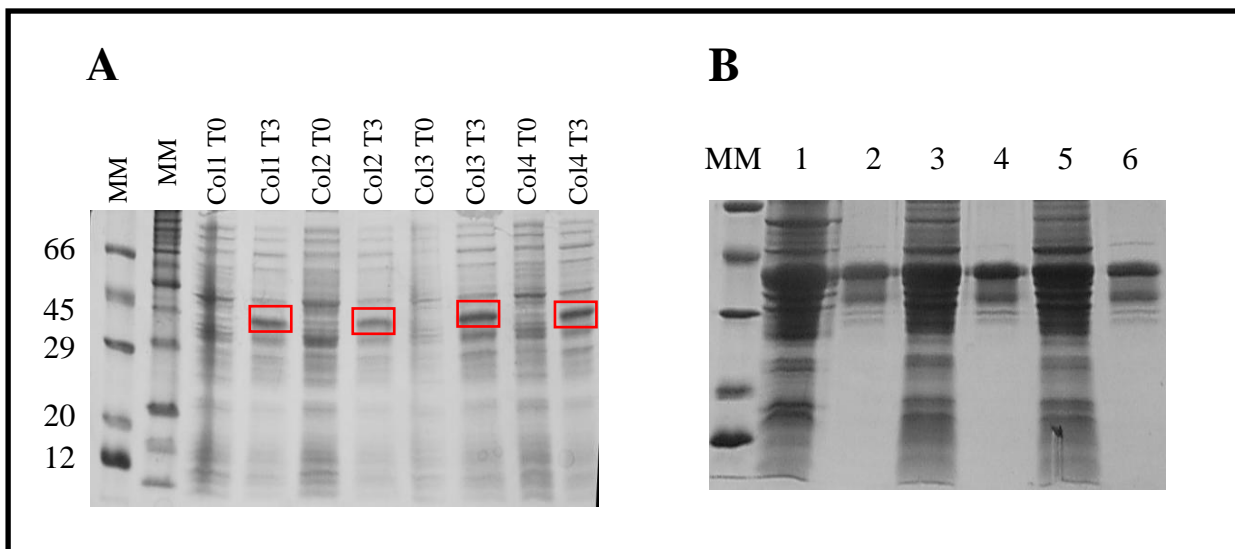


Figura 14 – Ensaio de expressão da proteína de interesse em SDS-PAGE (15%).

A = ensaio piloto de expressão da proteína ADAM9D utilizando quatro colônias transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX-4T-1ADAM9D transformado na linhagem de *E. coli* AD494(DE3). As setas indicam a proteína expressa após 3h de indução (T3). B = ensaio de solubilidade da proteína ADAM9D. MM, marcador de massa molecular, Linha 1 = fração correspondente ao material precipitado da colônia 1 após centrifugação, Linha 2 = fração correspondente ao material solúvel da colônia 1 após adsorção em resina de Glutathiona-Sepharose 4B. Linhas 3 a 6 = idem ao descrito para a colônia 1, mas para colônias 2 e 3.

4.2 Expressão e purificação da ADAM9D

A ADAM9D foi obtida como descrito nos itens 3.2 e 3.3 e a figura 15 representa as etapas de sua purificação, mostrando sua pureza.

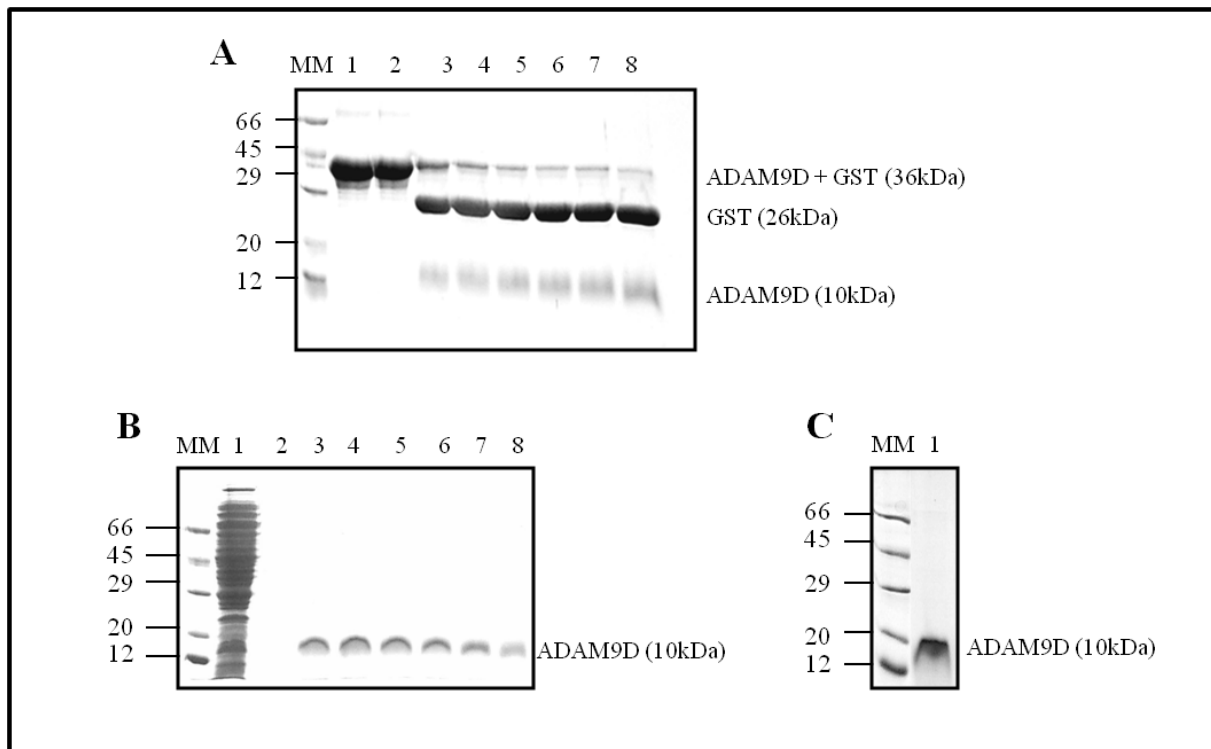


Figura 15 – Purificação e clivagem do domínio desintegrina da ADAM9D.

A = Expressão e liberação da proteína ADAM9D do peptídeo de fusão (GST) por trombina em SDS-PAGE (15%), MM, marcador de massa molecular; Linhas 1 e 2, ADAM9D + GST; Linhas 3 a 8, clivagem da ADAM9D + GST com trombina em diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h, respectivamente). B = Eluição das amostras da coluna de Benzamidina-Sepharose, utilizada para eliminação da trombina (SDS-PAGE 15%); MM, marcador de massa molecular; Linha 1, proteínas que não aderiram a resina; Linha 2, PBS; Linhas 3 a 8, amostras contendo ADAM9D (tampão de lavagem). C = ADAM9D após concentração. MM = marcador de massa molecular (SDS-PAGE 15%); Linha 1, ADAM9D concentrada.

4.1.1 Sequenciamento N-terminal da ADAM9D

O sequenciamento N-terminal da ADAM9D (10 aminoácidos) foi realizado com sucesso, sendo que a seqüência obtida foi idêntica com a seqüência de aminoácidos esperada para a ADAM9D (Gly-Ser-Ala-Pro-Ser-Cys-Gly-Asn), confirmando, portanto, o sucesso na clonagem e expressão da proteína de interesse.

4.3 Competição com anticorpos

A incubação das células das linhagens tumorais MDA-MB-231 e DU-145 com os anticorpos específicos para diferentes integrinas impediu a ligação das mesmas com a ADAM9D, quando comparadas com o controle (células + PBS), plaqueadas sobre ADAM9D imobilizada na placa.

Portanto, verificou-se a capacidade de ligação da ADAM9D nas células MDA-MB-231 e DU-145 em maior intensidade pela subunidade $\beta 1$ e pelas integrinas $\alpha \nu \beta 3$ e $\alpha \nu \beta 5$. Nas

células MDA-MB-231 a ADAM9D também interagiu através da subunidade $\alpha 2$ e nas células DU-145, da subunidade $\alpha 6$, também em menor intensidade, como mostrado na figura 16.

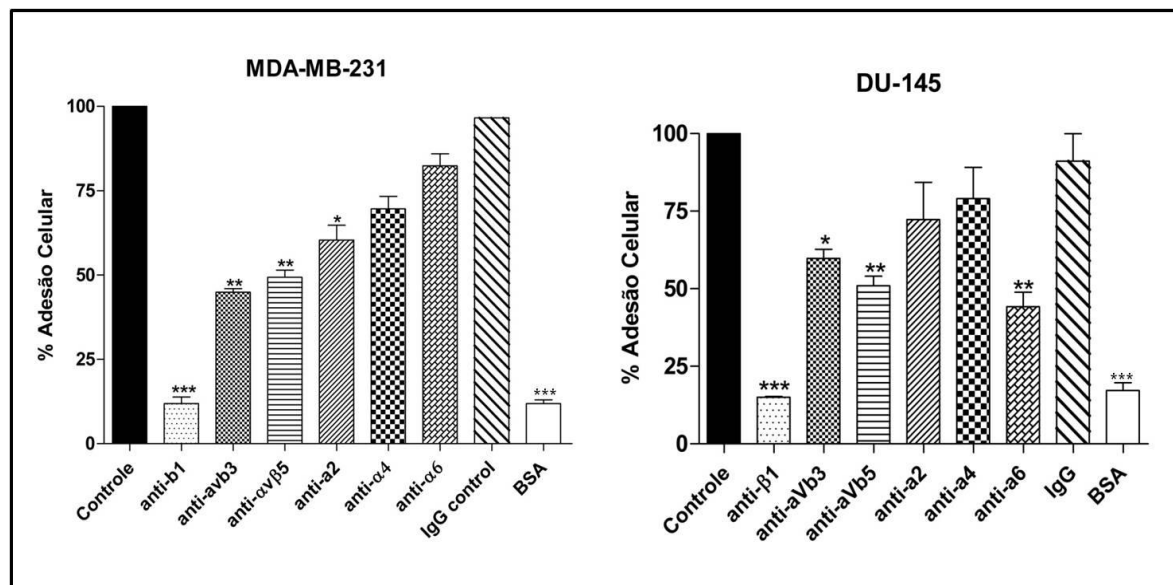


Figura 16 – A ADAM9D se liga às células DU-145 e MDA-MB-231 principalmente através da integrina $\beta 1$.

Como controle negativo, as células foram incubadas com PBS em substituição aos anticorpos e em seguida plaqueadas sobre a ADAM9D imobilizada. As barras representam o a média e o desvio padrão de três experimentos isolados, em triplicata, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.4 Inibição da Adesão

As células da linhagem MDA-MB-231 ao serem incubadas com a ADAM9D não foram capazes de ligar ao *coating* de colágeno tipo I em todas as concentrações utilizadas (10, 100 e 1000nM). Portanto, a ADAM9D foi capaz de inibir a adesão das células de câncer de mama ao um dos componentes da MEC (figura 17). Na concentração de 10nM houve uma redução de 25% e nas concentrações de 100 e 1000nM a redução foi de cerca de 35% com relação ao controle, em que as células não foram incubadas com a ADAM9D.

Entretanto, no caso das células da linhagem DU-145, depois de incubadas com a ADAM9D, houve um aumento significativo da adesão destas células na concentração de 10nM. As concentrações de 100nM, 500nM e 1000nM não inibiram a adesão (figura 17).

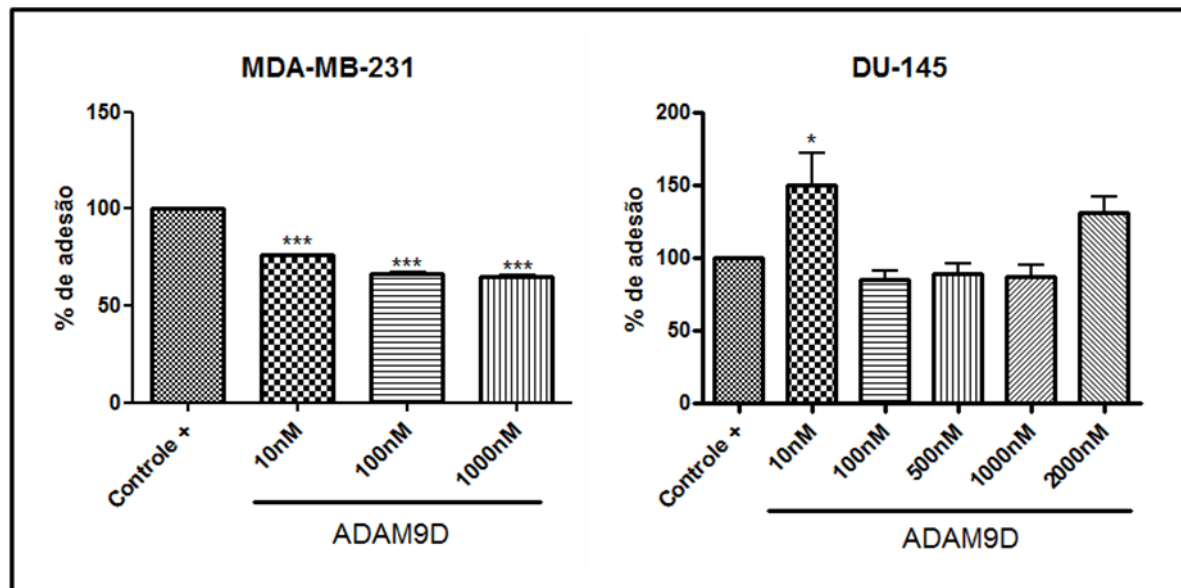


Figura 17 – ADAM9D inibiu a adesão nas células MDA-MB231 nas concentrações de 10, 100 e 1000nM. Nas células DU-145, a ADAM9D induziu a adesão na concentração de 10nM. As células marcadas com CMFDA e incubadas com PBS ou ADAM9D nas diferentes concentrações foram adicionadas sobre colágeno tipo I (10 μ g). Os poços foram lavados e as células aderidas foram quantificadas com auxílio de fluorímetro. As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos isolados, em triplicata, *** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.5 Citometria de Fluxo

Com a citometria de fluxo foi possível realizar um *screening* das integrinas presentes nas linhagens tumorais de mama e próstata. Foi verificado que as células MDA-MB-231 possuem uma grande quantidade das subunidades $\alpha 2$ e $\beta 1$, e uma menor quantidade das integrinas $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$ (figura 18), justificando-se a menor adesão desta linhagem celular quando incubada com os anticorpos anti- $\alpha 2$ e anti- $\beta 1$. Mesmo estando as integrinas $\alpha \nu \beta 3$ e $\alpha \nu \beta 5$ presentes em menor quantidade, sua interação com a ADAM9D mostrou-se eficaz o suficiente para uma diminuição na adesão à ADAM9D plaqueada, quando as células foram previamente incubadas com tais anticorpos. Além disso, esta linhagem apresentaram quantidades ainda menores de $\alpha 6$.

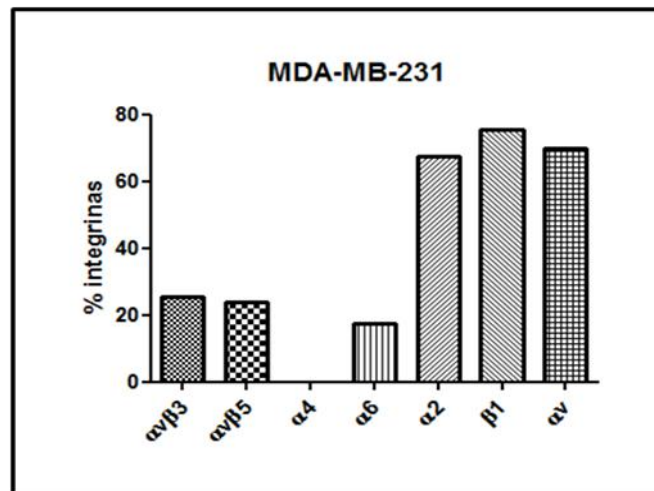


Figura 18 – Porcentagem das integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 2$ e β presentes da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

As células foram incubadas com os diferentes anticorpos para as integrinas $\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$. Depois do tempo de incubação foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário marcado com FITC e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo.

Já na linhagem DU-145 (Figura 19) as integrinas que se apresentaram em maior quantidade foram: $\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha 6$, $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$. Além das subunidades $\alpha 2$ e $\beta 1$, outras integrinas também como a $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ e $\alpha 6$ foram capazes de inibir a adesão a ADAM9D ao colágeno no tipo I como mostrado no experimento de competição com anticorpos (item 4.4). Estes dados confirmam a presença destas integrinas, e em conjunto com os resultados obtidos com o ensaio de competição com anticorpos pode-se verificar a interação da ADAM9D com as integrinas, fato de grande importância nas interações célula-célula e célula MEC.

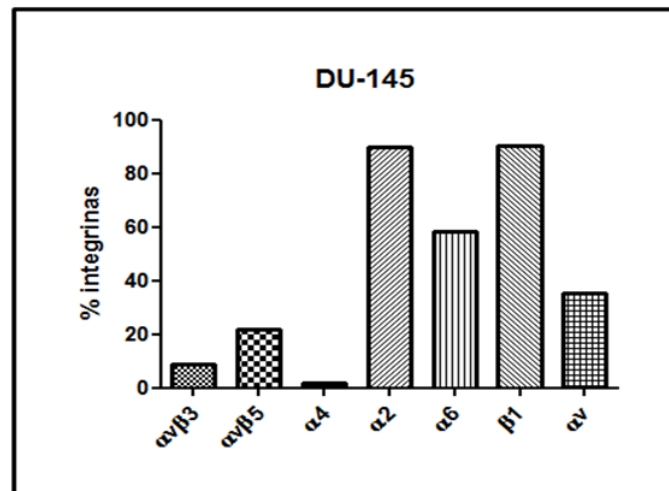


Figura 19 – Porcentagem das integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 2$ e β presentes da linhagem de câncer de próstata DU-145.

As células foram incubadas com os diferentes anticorpos para as integrinas $\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$. Depois do tempo de incubação foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário marcado com FITC e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo.

4.6 Proliferação celular

A ADAM9D foi testada quanto a seus efeitos na proliferação celular, utilizando o ensaio do MTT. Diferentes concentrações de ADAM9D (1nM a 1000nM) foram incubadas com diferentes linhagens celulares (MDA-MB-231, DU-145 e FH) e os efeitos na proliferação celular foram determinados comparando-se as células tratadas com ADAM9D ao controle positivo (células tratadas com PBS) em diferentes tempos, 24h, 48 e 72h (figuras 20, 21 e 22). Cabe-se ressaltar que o controle negativo utilizado neste experimento são as células incubadas em meio sem soro (meio incompleto).

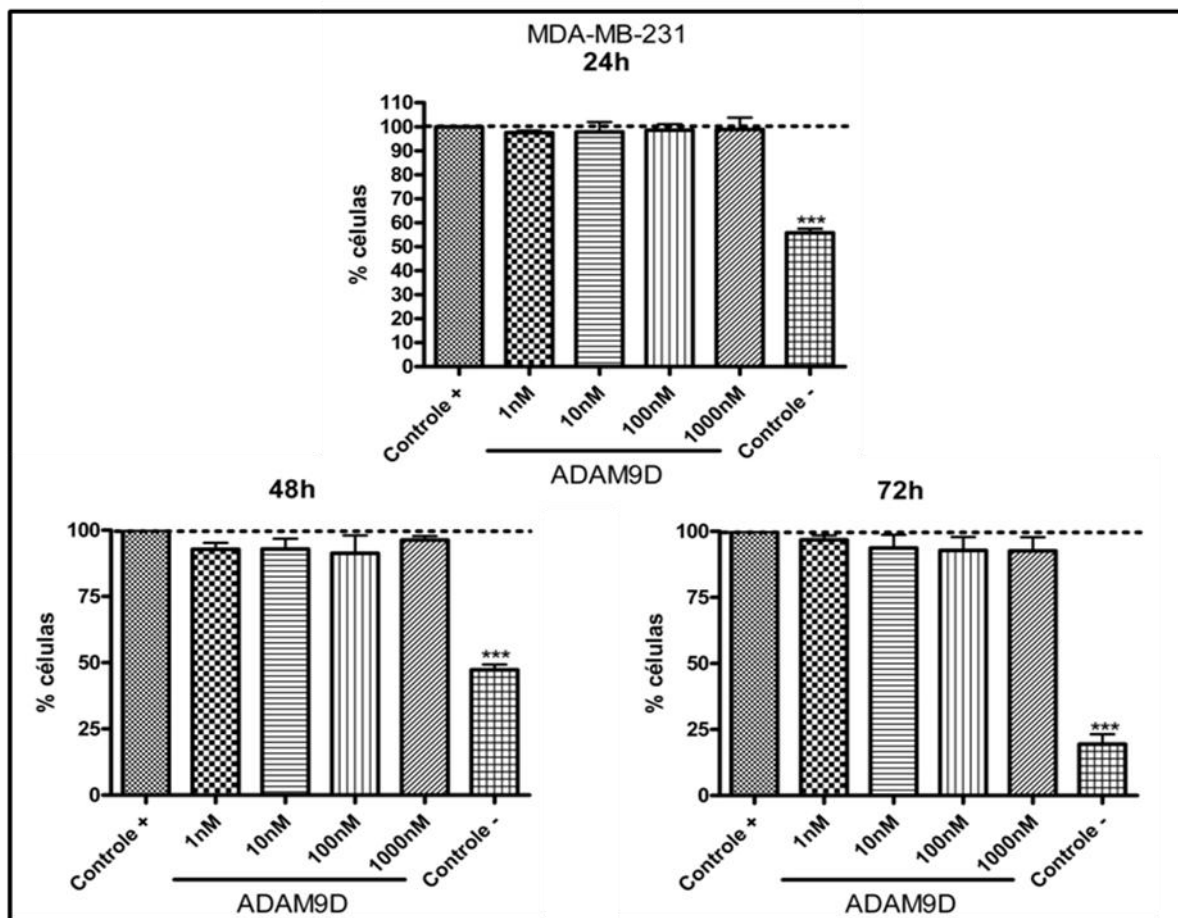


Figura 20 – A ADAM9D não promove a proliferação celular na linhagem de câncer mama MDA-MB-231, nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.

As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. *** $p < 0,001$.

A ADAM9D não foi capaz de induzir nem de reduzir de forma significativa a proliferação em todas as linhagens celulares testadas, nos diferentes tempos e concentrações utilizados (figuras 20, 21 e 22).

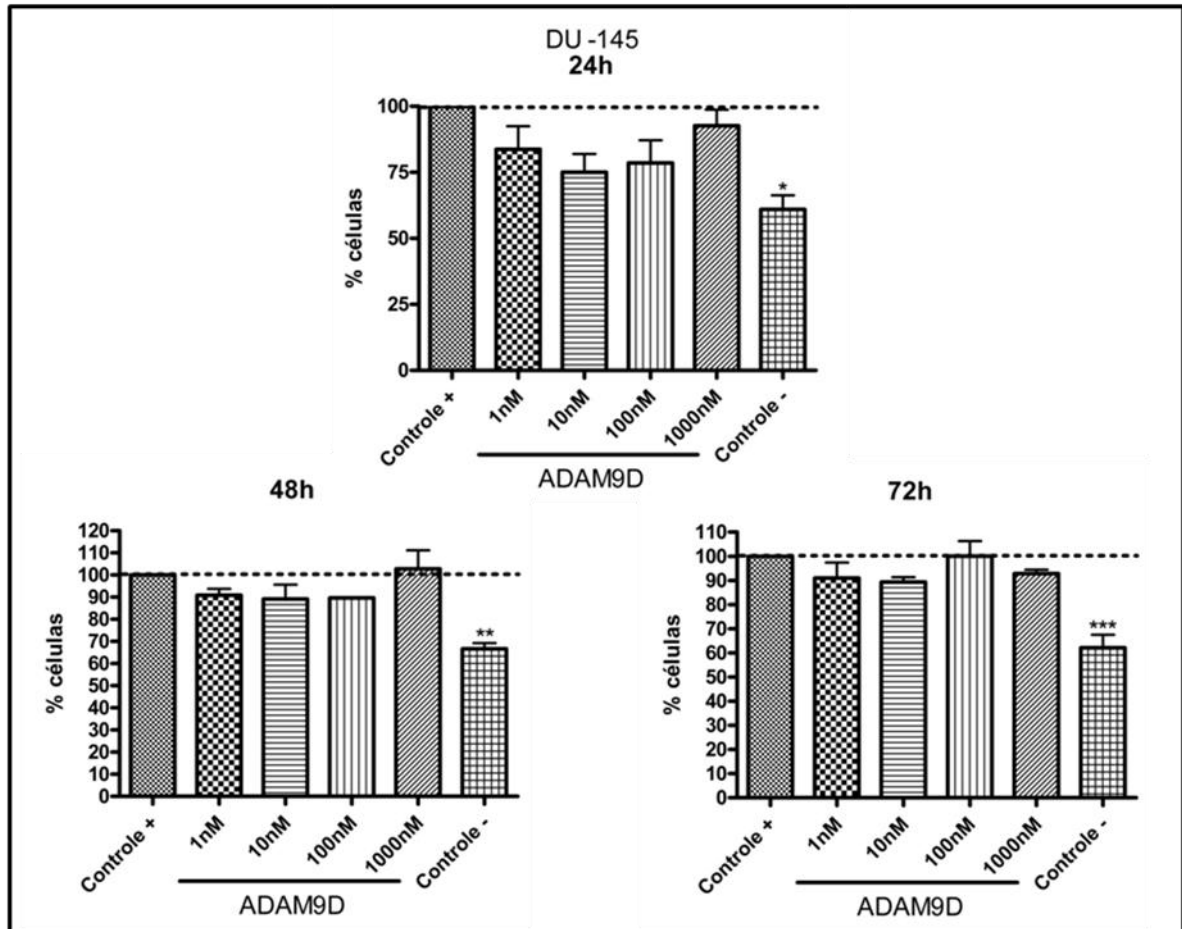


Figura 21 – A ADAM9D não promove a proliferação celular na linhagem de câncer de próstata DU-145, nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.

As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

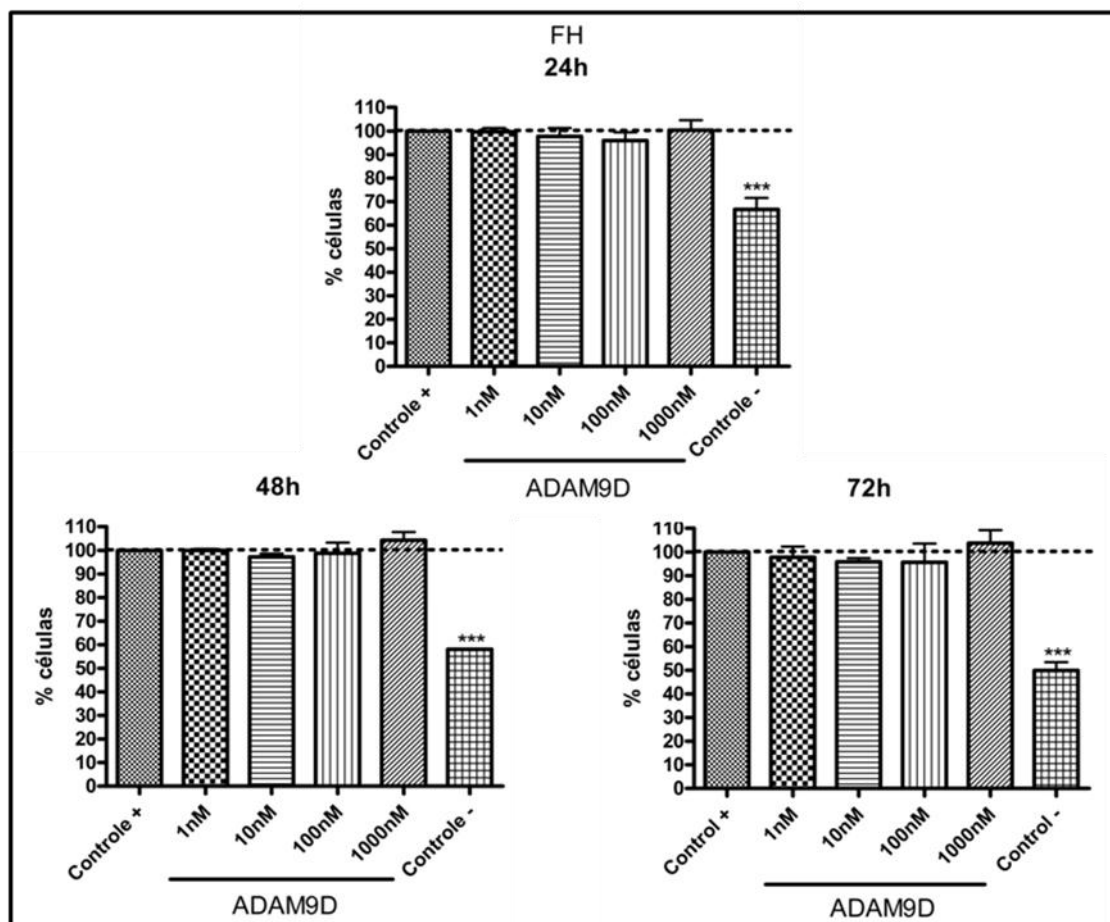


Figura 22 – A ADAM9D não promove a proliferação celular nos fibroblastos humanos (FH), nas diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). Controle positivo são as células incubadas em meio com soro e o controle negativo são as células incubadas em meio sem soro.

As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. *** $p < 0,001$.

4.7 Invasão celular

A ADAM9D foi capaz de inibir a invasão das células MDA-MB-231 e DU-145 no matrigel. Seu efeito foi comparado ao efeito dos anticorpos bloqueadores anti- $\alpha\beta 5$ e anti- $\alpha\beta 3$ na linhagem DU-145 (figura 23). Estes resultados sugerem a capacidade da ADAM9D em inibir a invasão destas células no matrigel através da interação com as integrinas.

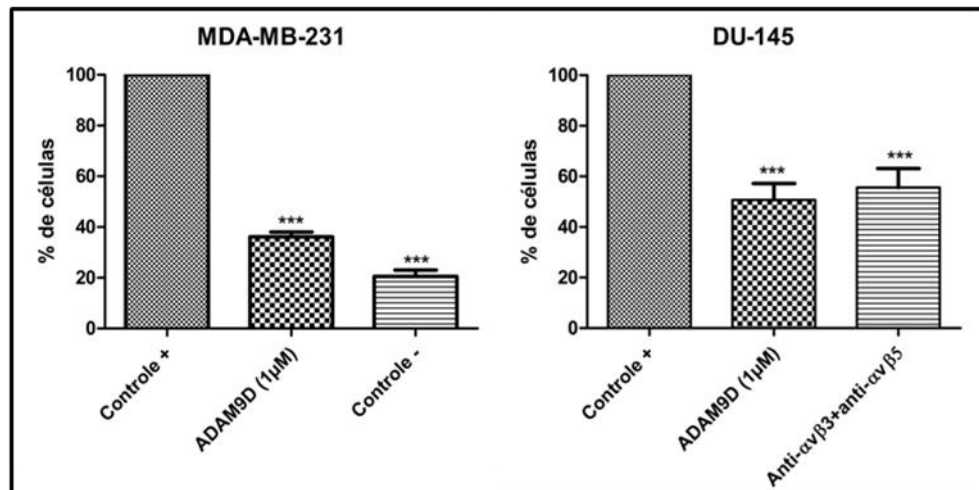


Figura 23 – Efeitos da ADAM9D na invasão de células MDA-MB-231 e DU-145 em matrigel. As imagens foram analisadas quanto à área das células que invadiram na, com auxílio do software Image J e posteriormente, transformadas em porcentagem. As barras representam a média e o desvio padrão em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. *** $p < 0,001$.

4.8 Migração celular –Transwell

No ensaio de migração celular-*transwell* realizado, a ADAM9D foi responsável por inibir a migração das células MDA-MB-231 (figura 16), nas duas concentrações testadas (100nM e 1000nM). Entretanto, a ADAM9D não foi capaz de inibir a migração das células da linhagem DU-145 nas duas concentrações testadas, e, surpreendentemente, houve uma tendência da proteína em aumentar a migração celular proporcionalmente à concentração da proteína em estudo (figura 24).

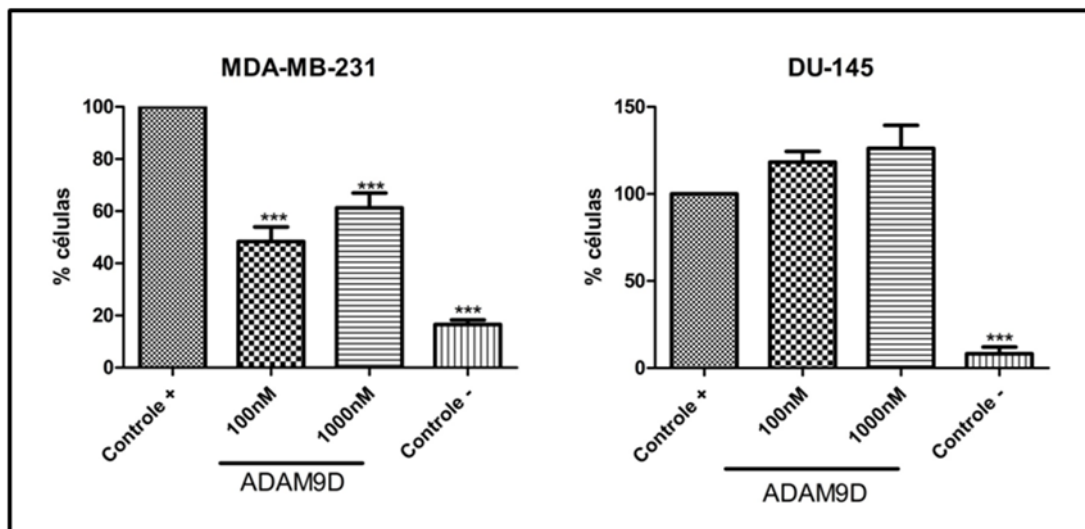


Figura 24 – Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231.

A ADAM9D foi capaz de inibir a migração celular, após 22h de incubação, as imagens foram analisadas quanto ao número de células para cada tratamento. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. *** $p < 0,001$.

4.9 Migração celular - Wound Healing

Outro ensaio para verificar a atividade da ADAM9D na migração foi o *wound healing*, em 24h de incubação foi possível visualizar que esta proteína foi capaz de inibir a migração das células MDA-MB-231 (figura 25), em cerca de 15%, somente na concentração de 2000nM (Figura 26) quando comparada ao controle (células incubadas somente com meio completo). Já em 48h não foi possível analisar a migração, pois as células migraram de forma muito dispersa, dificultando a análise no *software* Image J, com a ferramenta de análise de área não recoberta por células.

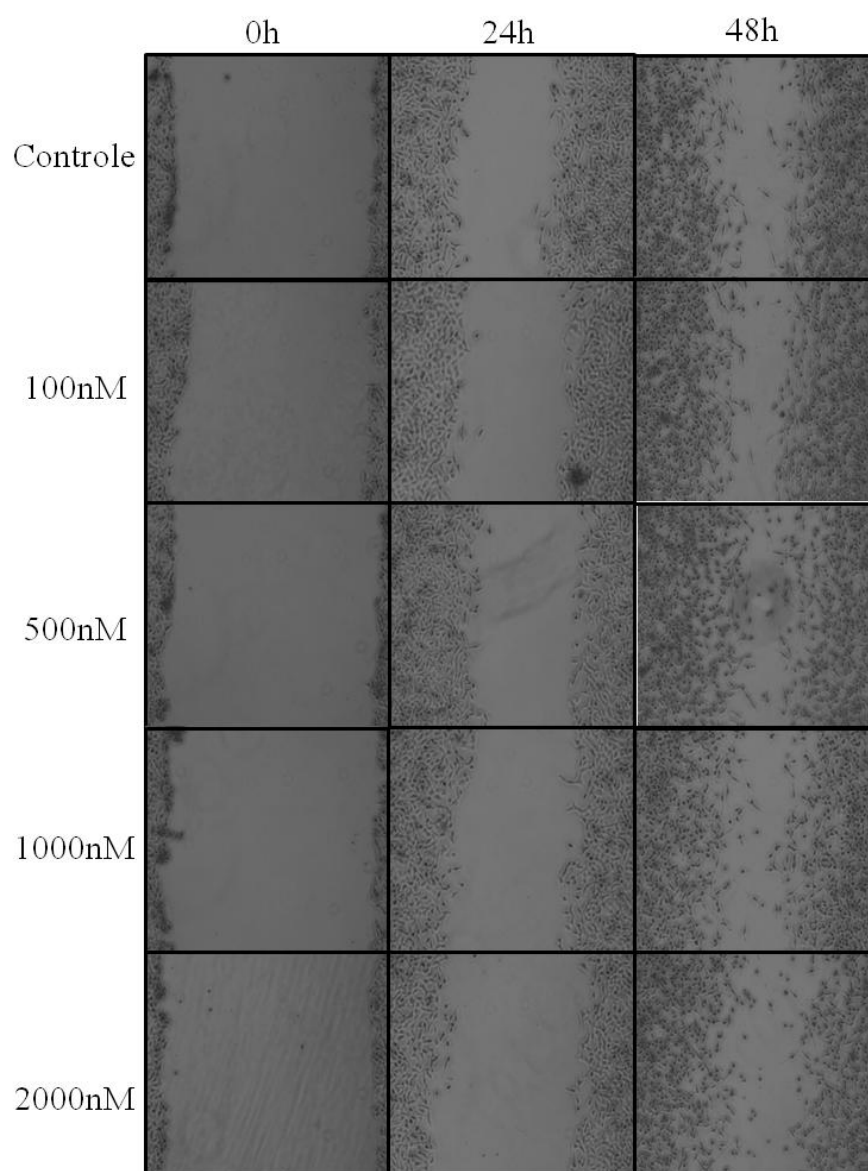


Figura 25 – Imagens representativas do ensaio de *Wound Healing* para linhagem MDA-MB-231. Imagens centrais das riscas nos tempos de 0, 24 e 48h.

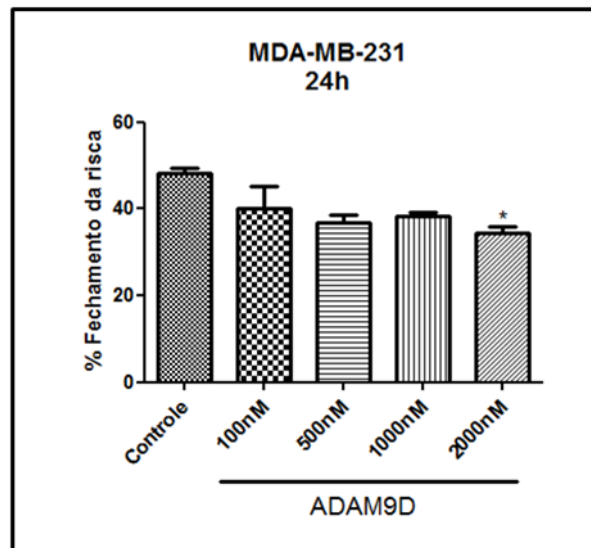


Figura 26 –. Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231 pelo método de *wound healing*.

A ADAM9D foi capaz de inibir a migração celular na concentração de 2000nM. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$.

Na linhagem DU-145 (figura 27) a ADAM9D foi capaz de inibir a migração nas concentrações de 100, 500 e 1000nM (figura 28) quando comparado com o controle e esta redução foi entre 30-40%.

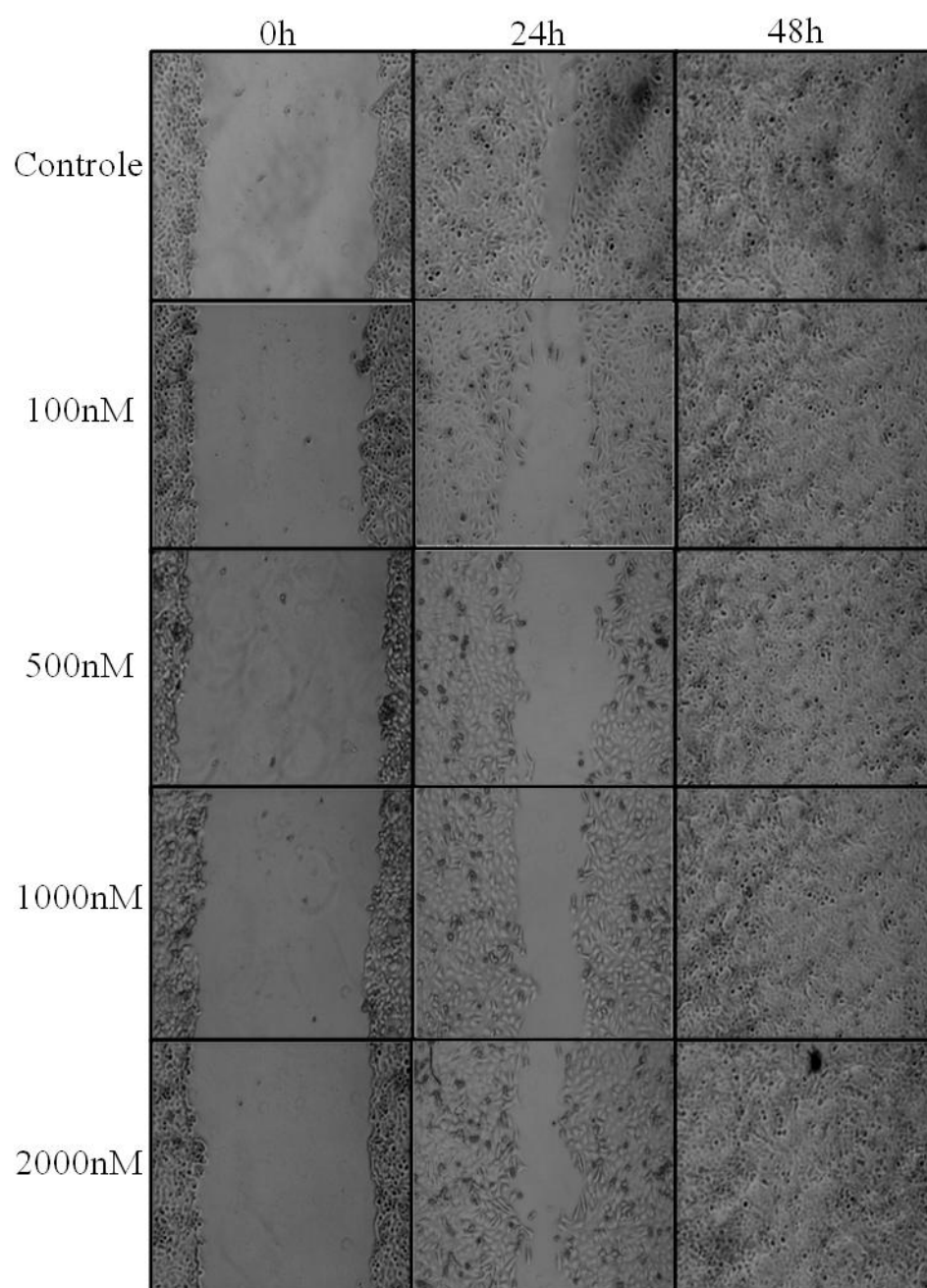


Figura 27 - Imagens representativas do ensaio de *Wound Healing* para linhagem DU-145. Imagens centrais das riscas nos tempos de 0, 24 e 48h.

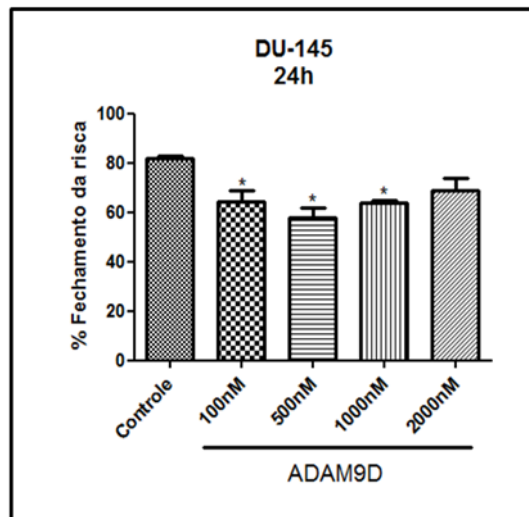


Figura 28 – Efeitos da ADAM9D na migração de células MDA-MB-231. A ADAM9D foi capaz de inibir a migração celular na concentração de 100, 500 e 1000nM. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$.

4.10 Análise da atividade de Metalopeptidases de Matriz por Zimografia

Na figura 29 pode-se ver a atividade das MMPs, a MMP-9 (~92kDa) e MMP2 (~64kDa), a partir do sobrenadante proveniente do ensaio de *wound healing* com as células da linhagem MDA-MB-231. Estas bandas foram quantificadas e verificou-se uma redução de cerca de 10% na expressão da MMP-9 nesta linhagem celular quando incubada com a ADAM9D nas concentrações de 100 e 1000nM. Já para a MMP-2 houve uma redução de 30% na concentração de 1000nM (figura 30).

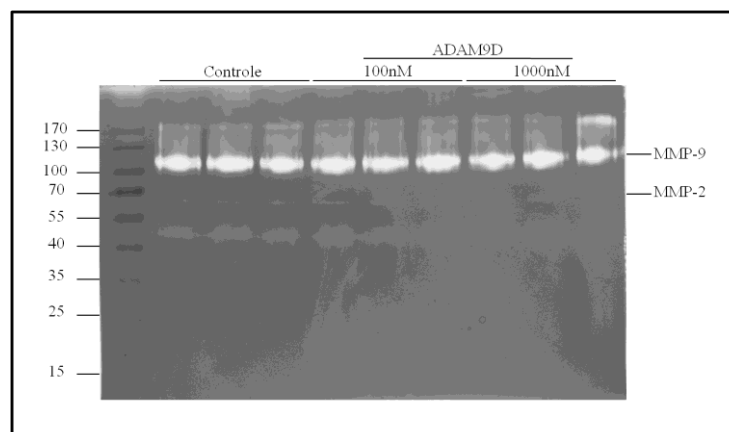


Figura 29 – Atividade de MMP por zimografia dos sobrenadantes de cultura de células da linhagem MDA-MB-231, 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle). As células foram plaqueadas (placas de 12 poços) 1.10^5 células/poço e incubadas em estufa até sua confluência de 100%, quando foram então riscadas com auxílio de uma micropipeta. Após a lavagem dos poços, as células foram incubadas com a ADAM9D ou PBS em meio sem soro por 24h. O sobrenadante foi quantificado e usado na zimografia.

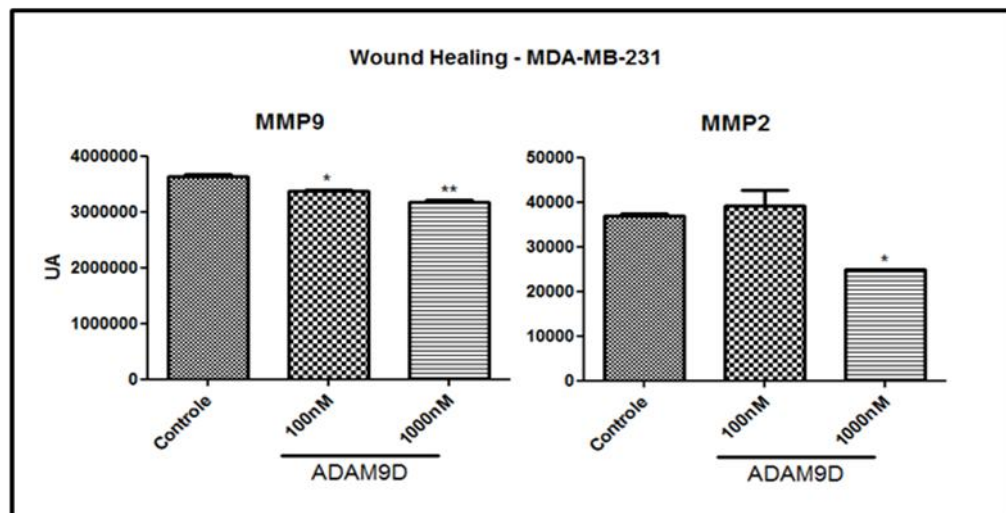


Figura 30 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de *Wound Healing* da linhagem MDA-MB-231.

A ADAM9D foi capaz de reduzir a expressão da MMP-9 nas concentrações de 100 e 1000nM, e da MMP2 ativa na concentração de 1000nM. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Na linhagem DU-145, além da MMP-9 e MMP-2, também foi verificado a atividade da proMMP-2 (figura 31), a partir do sobrenadante do ensaio de *wound healing*. Após a quantificação das bandas verificou-se que não houve aumento significativo da MMP-9. Entretanto, houve um aumento significativo na atividade da pró-MMP-2 após a incubação com a ADAM9D na concentração de 1000nM, e da MMP2 o aumento foi significativo nas duas concentrações testadas, 100 e 1000nM (figura 32).

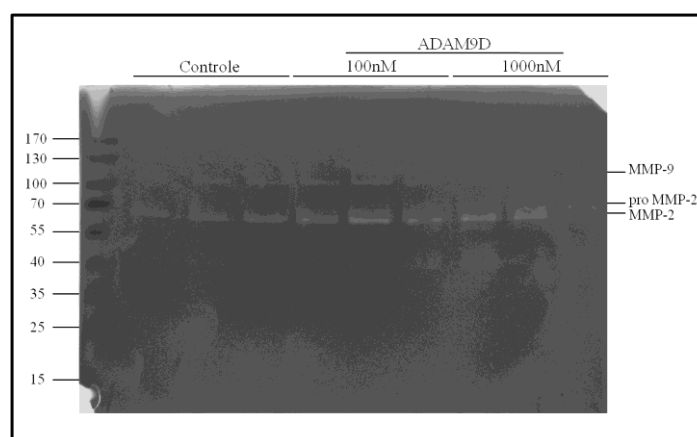


Figura 31 – Atividade de MMPs por zimografia dos sobrenadante da cultura das células da linhagem DU-145, 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle).

As células foram plaqueadas (10^5 células/poço) e incubadas em estufa até sua confluência de 100%, quando foram então riscadas com auxílio de uma micropipeta. Após a lavagem dos poços, as células foram incubadas com a ADAM9D ou PBS em meio sem soro por 24h. O sobrenadante foi quantificado e usado na zimografia.

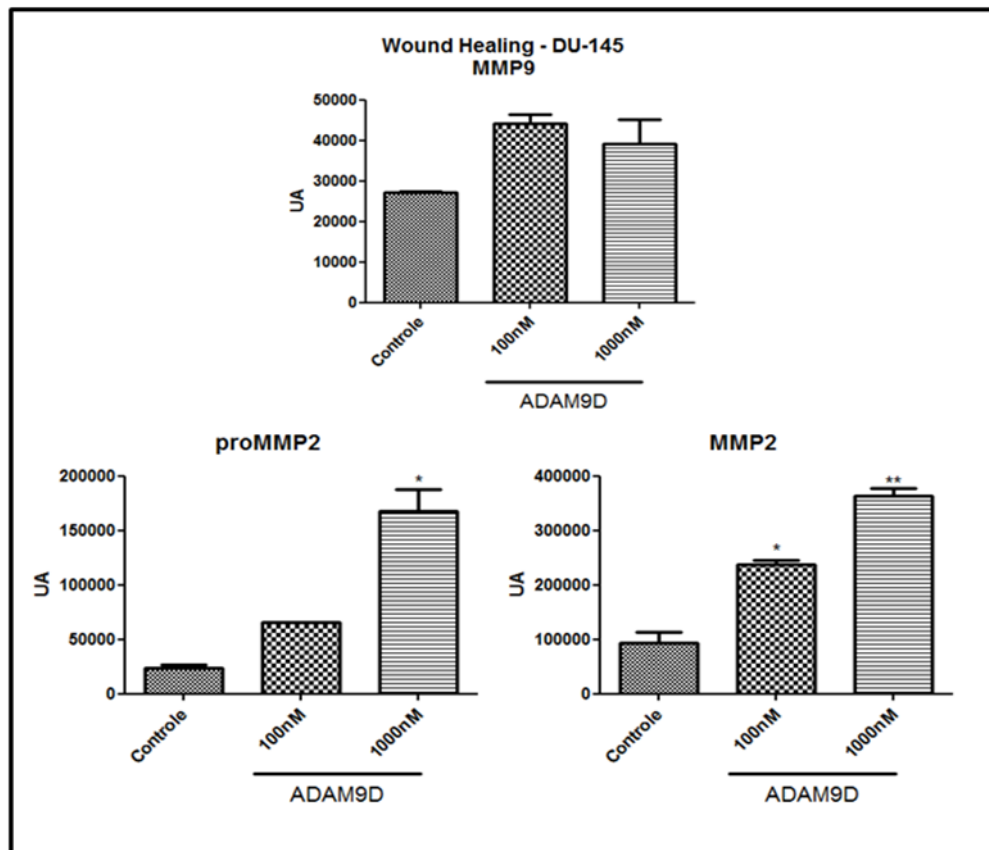


Figura 32 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de *Wound Healing* para a linhagem DU-145.

A ADAM9D não foi capaz de reduzir ou aumentar a expressão da MMP-9 nas concentrações de 100 e 1000nM. Entretanto, a ADAM9D foi capaz de aumentar a expressão da pró-MMP2 na concentração de 1000nM, e da MMP2 ativa nas duas concentrações testadas. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

As MMPs também foram verificadas, a partir do sobrenadante dos insertos usados na migração *trans-well* da linhagem DU-145 (figura 33). A atividade das MMPs na mesma linhagem, mas com estímulos diferenciados (*wound healing* x migração *trans-well*) se mostrou ser diferente. No ensaio de migração *trans-well* foi verificada uma maior atividade das MMP-9, pró-MMP-2 e MMP2 ativa. Além disso, neste último ensaio não houve diferença significativa das MMPs nas duas concentrações testadas da ADAM9D (figura 34).

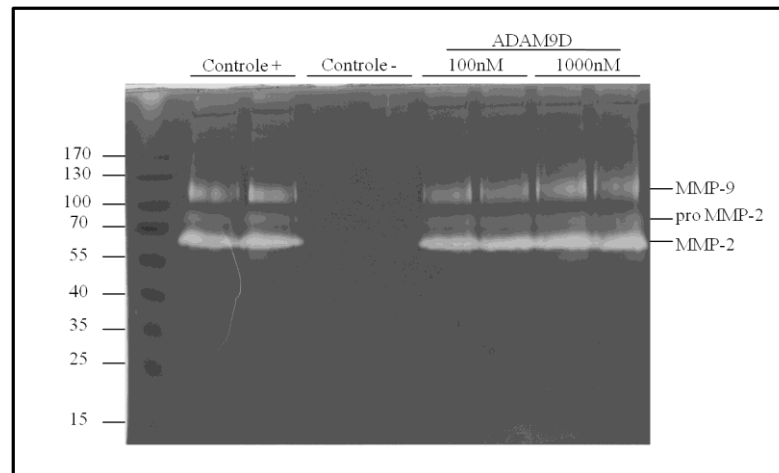


Figura 33 – Atividade de MMPs por zimografia dos sobrenadante da cultura das células da linhagem DU-145 no ensaio de migração *trans-well*, 24h após a incubação destas com a ADAM9D ou PBS (controle).

As células foram plaqueadas (placas de 12 poços) 1.10^5 células/inserto, na presença ou ausência da ADAM9D e incubadas por 22h em estufa. O sobrenadante do inserto foi quantificado e usado na zimografia.

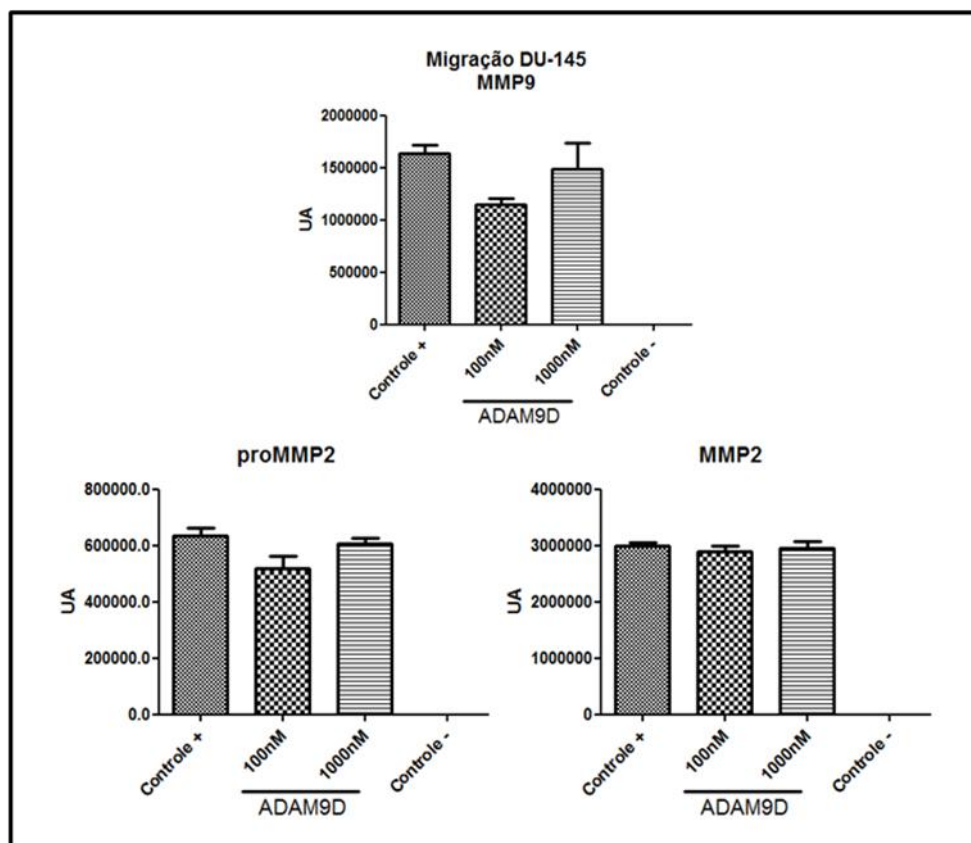


Figura 34 – Quantificação das bandas de atividade das MMPs no ensaio de migração *trans-well* na linhagem DU-145.

Não houve diferença de expressão significativa das MMPs nas diferentes concentrações de ADAM9D. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

A maior causa de morte do câncer é a metástase, cerca de 90% dos casos. Durante o processo metastático, as células precisam migrar e invadir os tecidos vizinhos para atingir os vasos e posteriormente seu sítio secundário (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007; PERRET; CREPIN, 2008; GEIGER; PEEPER, 2009; BROOKS *et al.*, 2010). As ADAMs, são moléculas que participam de diferentes processos fisiológicos, clivando fatores de crescimento, interagindo com receptores celulares, participando da adesão celular, além de poderem ter sua expressão alterada em algumas patologias, como o câncer (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; WHITE, 2003; BLOBEL, 2005; MOCHIZUKI; OKADA, 2007). Portanto, estudos que visam entender estes processos e as moléculas que participam durante a metástase são de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos.

Desta forma, com o objetivo de contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares do processo metastático, durante este projeto o domínio desintegrina da ADAM9 foi clonado em sistema bacteriano, através do vetor pGEX-4T-1, na sua forma solúvel e ativa, como demonstrado nos ensaios biológicos. Na literatura, outros autores como Zhou *et al.* (2001) realizaram a clonagem do domínio desintegrina da ADAM9 humana (A9dis) utilizando o vetor pGEX-2T e a expressaram, além de verificarem a ligação deste domínio com a integrina $\alpha V\beta 5$ em células de mieloma humano sendo este efeito dependente da concentração de A9dis. A A9dis expressa por estes autores corresponde aos aminoácidos 386 – 515 e a ADAM9D15 produzida neste trabalho aos aminoácidos 413 – 504, sendo, portanto, as duas proteínas muito semelhantes entre si. Contudo, os autores citados não apresentaram resultados relacionados aos efeitos da A9dis após sua ligação a integrina $\alpha V\beta 5$ nas células de mieloma. Nath *et al.* (2000) clonaram o ectodomínio da ADAM9, por eles chamado de Mely-Fc já que a proteína recombinante produzida possui a porção Fc da IgG1 humana. Estes autores verificaram que a proteína se liga a células das linhagens Wehi 164 (fibrosarcoma de camundongo) e HT1080 (fibrosarcoma humano) e que esta ligação ocorre através do domínio desintegrina da ADAM9. A adesão destas células foi inibida quando as mesmas foram incubadas com os anticorpos para as subunidades de integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$.

Em um trabalho realizado por Zigrino *et al.* (2007) foi verificado que a ADAM9-DC recombinante (ADAM9 desintegrina/rico em cisteína) é capaz de diminuir a adesão de queratinócitos via subunidades $\beta 1$ e $\alpha 3$, mas não com as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$, e que esta interação não é dependente no motivo ECD, pois quando as células são incubadas com

peptídeos ECD e RGD não há redução da adesão celular. Dados provenientes da análise de estrutura de uma proteína de veneno de serpente, a VAP1 (*Vascular apoptosis-inducing protein 1*), que são homólogas às ADAMs, mostraram que o domínio desintegrina não se encontra acessível para ligação com outras proteínas, sugerindo que o domínio rico em cisteína é que seria responsável pela ligação às integrinas (TAKEDA *et al.*, 2006; IGARASHI *et al.*, 2007; TAKEDA, 2009). Entretanto, esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho, pois a ADAM9D foi capaz de interagir com diversas integrinas, como demonstrado no ensaio de competição com anticorpos (item 4.3). Mahimkar e colaboradores (2005) produziram diferentes construções com os domínios da ADAM9 em fusão com a GST. Com isso, verificaram que as células HEK-293 (células embrionárias de rim) se aderiram em maior proporção ao domínio desintegrina do que ao rico em cisteína da ADAM9 quando comparado aos controles, sendo que o domínio rico em cisteína teve a mesma proporção de adesão que a GST, indicando que as interações durante a adesão ocorrem exclusivamente entre o domínio desintegrina e as integrinas. Além disso, demonstraram que esta adesão ocorre devido a interação do domínio desintegrina com as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αv e $\beta 1$, evidenciando a ADAM9 como um dos membros mais polivalentes da família das ADAMs. Outros autores também verificaram a ligação do domínio desintegrina da ADAM9 com as integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 5$, em diferentes tipos celulares (MAHIMKAR *et al.*, 2000; MAZZOCCA *et al.*, 2005; KARADAG; ZHOU; CROUCHER, 2006).

Nossos resultados são coerentes com os dados da literatura acima citados - mostrando que a ADAM9D é capaz de se ligar as subunidades $\alpha 6$, $\beta 1$, e as integrinas $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 3$ – além da subunidade $\alpha 2$. Este resultado mostra um novo ligante para o domínio desintegrina da ADAM9, uma vez que a interação desta proteína com a integrina $\alpha v\beta 3$ não havia sido descrita na literatura anteriormente, dados publicados por nosso laboratório (COMINETTI *et al.*, 2009).

A ADAM9D foi capaz de inibir a adesão da linhagem MDA-MB-231 nas concentrações de 10, 100 e 1000nM ao colágeno tipo I. Wang (2010) verificou que a Acurhagin-C, desintegrina ECD isolada do veneno da serpente *Agkistrodon acutus*, inibiu a adesão das células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) a diferentes proteínas da MEC (vitronectina, colágeno I e fibronectina) nas concentrações de 200, 400, 600 e 800nM. Entretanto, é importante salientar que a Acurhagin-C possui os domínios desintegrina e rico em cisteína. Já na linhagem DU-145 a proteína induziu a adesão na concentração de 10nM ao colágeno I. Este resultado pode estar relacionado com a interação, nesta linhagem

celular, da ADAM9D a integrina $\alpha\beta 3$, pois, Zhou e colaboradores (2001) verificaram que, quando as células de mieloma se aderem a A9dis em conjunto com o anticorpo anti- $\beta 3$ há um aumento da adesão, portanto, talvez a ligação da ADAM9D a subunidade $\beta 3$, nesta linhagem celular tenha o mesmo efeito que o anticorpo anti- $\beta 3$ na linhagem de mieloma.

Esta atividade adesiva da ADAM9D provavelmente ocorre pela interação desta com receptores da membrana celular, responsáveis por desencadearem sinalizações intracelulares envolvidas na migração celular, proliferação celular entre outros (BERRIER; YAMADA, 2007). Portanto, evidenciam o sucesso da produção biologicamente ativa desta proteína no sistema bacteriano utilizado.

Um estudo realizado por Karadag *et al.* (2006) verificou que a ADAM9 é altamente expressa em células de mieloma humano e que induz a expressão de interleucina-6 (IL-6) em osteoblastos através da ligação da integrina $\alpha V\beta 5$, além de mostrarem que em fibroblastos a ligação da ADAM9 ocorre através da integrina $\alpha 6\beta 1$. Estes resultados sugerem que a interação da ADAM9 via $\alpha V\beta 5$ seja um alvo a ser explorado. Entretanto, a ADAM9D não foi capaz de induzir nem de inibir a proliferação celular nas diferentes linhagens testadas. Entretanto, Wang (2010) mostrou que uma desintegrina (Acurhagin-C) foi capaz de inibir a proliferação de HUVECs, diferente dos resultados encontrados com a ADAM9D nas linhagens MDA-MB-231, DU-145 e FH. Porém a Acurhagin-C, uma desintegrina isolada do veneno da serpente *Agkistrodon acutus*, como dito anteriormente, além de apresentar o domínio desintegrina, também apresenta o domínio rico em cisteína, podendo a presença deste domínio extra influenciar a função da ADAM9D na proliferação celular.

A ADAM9D inibiu em cerca de 60% a invasão de células MDA-MB-231 no matrigel. Na linhagem DU-145, esta redução foi de 42%, mostrando que a atividade da proteína pode ser diferente dependendo da linhagem celular utilizada. No trabalho apresentado por Wang *et al.* (2010) a Acurhagin-C foi capaz de inibir a invasão de forma significativa nas células endoteliais da linhagem HUVEC, assim como, a ADAM9D nas linhagens estudadas. Entretanto, Mazzocca *et al.* (2005) mostraram que uma forma solúvel da ADAM9 (ADAM9-S), contendo os domínios metaloprotease, desintegrina e o rico em cisteína é capaz de induzir a invasão das células de carcinoma, através de seu domínio metaloprotease, pois quando as células são incubadas com um inibidor de metalopeptidases, há uma redução da invasão. Estes autores verificaram que a ADAM9-S provavelmente induz a invasão de células de carcinoma através de receptores de laminina ($\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 2\beta 1$) mas não através das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 5$. A ADAM9-S também parece induzir a surgimento de um caráter invasivo nas células de

carcinoma hepático levando a formação de metástases. A superexpressão de ADAM9 em células de câncer de pulmão das linhagens A549 e EBC-1 aumenta a invasão em matrigel, entretanto, quando estas células são incubadas com anticorpo anti- $\beta 1$ há uma redução desta invasão, evidenciando o papel da interação com as integrinas no processo de invasão celular (SHINTANI *et al.*, 2004). Em nosso laboratório foi verificado que o silenciamento da ADAM9 em células de câncer de mama, MDA-MB-231, inibiu a invasão ao matrigel destas células, e isto pode ocorrer por uma redução da capacidade desta linhagem em degradar a MEC, e portanto, de invadir (dados não publicados).

O processo de invasão e migração celular normalmente está associado à atividade de proteases (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2010; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010), porém, Huang *et al.* (2005) verificou que além da migração mediada por proteases, existe uma maneira alternativa de migração celular independente da atividade proteolítica, através do domínio desintegrina. Apesar das ADAMs e integrinas interagirem com células do microambiente em que se encontram, ou seja, interações célula-célula (ETO *et al.*, 2000), Huang e colaboradores, verificaram que a ADAM12 foi capaz de inibir a migração individual de células de ovário de hamster chinês através da integrina $\alpha 4 \beta 1$, indicando que as ADAMs podem influenciar uma integrina na mesma célula, e não através de interações célula-célula como descrito anteriormente a este estudo. Este processo pode ocorrer, pois a ADAM12 deve influenciar a fosforilação da integrina de localização próxima a ela, na mesma célula, ou a associação de proteínas adaptadoras a esta (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005).

O experimento de invasão em matrigel, além de verificar a migração celular também verifica a degradação da MEC. Entretanto, para certificar-se do papel da ADAM9D na migração celular independente da proteólise, foram realizados dois experimentos: 1- migração *trans-well* (membrana com poros sem *coating* com proteínas da MEC); 2- migração por *Wound Healing*. A ADAM9D na sua forma solúvel foi capaz de inibir a migração das células MDA-MB-231 nos ensaios de migração *trans-well* e *wound healing*. Wang (2010) verificou que a Acuhragin-C além de inibir a invasão de células endoteliais HUVEC, também foi capaz de inibir a migração celular no ensaio *trans-well* de maneira dose dependente.

Com relação à atividade da ADAM9D na linhagem de câncer de próstata, a inibição da migração foi verificada somente no ensaio de *wound healing*, diferente do ensaio *trans-well* que houve um aumento da migração celular. Nath *et al.* (2000) verificou que células da linhagem HT1080 (fibrosarcoma humano) Wehi 164 (fibrosarcoma de camundongo) quando plaqueadas sobre a Mely-Fc há um aumento da migração de 8 vezes. Zigrino e colaboradores

(2007) mostraram que os domínios desintegrina e rico em cisteína também quando plaqueados sob queratinócitos induziram um aumento na migração destas células. Fry *et al.* (FRY; TOKER, 2010) estudando o papel dos domínios da ADAM9, verificou que células de câncer de mama da linhagem BT549 que expressam somente a ADAM9-L (ADAM9-long, localizada na membrana celular) quando incubadas com anti- $\alpha 6$ há um ligeiro aumento da migração *trans-well*. Este resultado pode ser um indicativo do aumento da migração nas células DU-145, já que esta linhagem expressa a subunidade $\alpha 6$ e a ADAM9D é capaz de interagir de forma significativa com esta subunidade. Além disso, Mauch *et al.* (2010) verificaram que o silenciamento da ADAM9, ou seja, a ausência da interação desta proteína com as integrinas e clivagem de seus substratos há um aumento da migração celular de culturas primárias de queratinócitos.

As células tumorais possuem diferentes mecanismos de migração, incluindo a migração coletiva, individual, amebóide, entre outras, dependendo do estímulo que estas recebem (FRIEDL; WOLF, 2003; 2009). Pode-se verificar um padrão diferente de migração das células MDA-MB-231 e DU-145 no ensaio de *wound healing*, podendo-se sugerir que as células de câncer de mama migrem de forma mais individual que as células de câncer de próstata, neste ensaio celular.

Os dados apresentados podem ser comparados com resultados na literatura, pois a expressão diferencial de integrinas nas linhagens celulares está relacionada com a forma como os domínios das proteínas da família das ADAMs atuam, portanto, dependendo da expressão das integrinas em uma linhagem celular o bloqueio destas com o uso do domínio desintegrina da ADAM9 pode atuar de forma diferente em cada tipo celular (GEHLSSEN; DAVIS; SRIRAMARAO, 1992; MAHIMKAR *et al.*, 2005; ZIGRINO; NISCHT; MAUCH, 2010). Este perfil de expressão das integrinas também está relacionado ao tipo de tumor, sua malignidade e a sobrevida dos pacientes (HOOD; CHERESH, 2002; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010), enfatizando-se a seletividade e a complexidade do processo de metástase.

Como dito anteriormente, as metalopetidases de matriz (MMPs) são de grande importância no processo de migração e invasão tumoral. As MMPs podem ser estimuladas por fatores de crescimento, citocinas e via integrinas (FRIEDL; WOLF, 2003; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; ZIGRINO; NISCHT; MAUCH, 2010). Portanto, a interação da ADAM9D com as integrinas e sua atividade na migração e invasão tumoral poderia afetar a expressão das MMPs. Na linhagem MDA-MB-231 houve uma redução da expressão da MMP-9, pró-MMP-2 e MMP2 quando incubadas com a ADAM9D no ensaio de

wound healing, podendo ser o motivo que esta linhagem teve sua invasão inibida comparando-se com o controle. Na linhagem DU-145 neste mesmo ensaio, a ADAM9D induziu a expressão de MMP-9 e MMP-2, e estas não tiveram sua expressão alterada no ensaio de migração *trans-well*. Os ensaios possuem estímulos diferentes, resultando em diferentes expressões das MMPs na mesma linhagem celular. Zigrino *et al.*(2007) verificou que queratinócitos tem a expressão de MMP-9 estimulada quando incubados com a DC-9 (domínios desintegrina e rico em cisteína da ADAM9), e recentemente, observou que a DC-9 também foi capaz de induzir a expressão de pró-MMP-2 e MMP-2 em linhagens de melanoma e fibroblastos, de maneira dose dependente. Entretanto, em queratinócitos silenciados para a ADAM9 não houve alteração na expressão de MMP-9 (MAUCH *et al.*, 2010).

Estes diferentes resultados encontrados neste projeto e na literatura evidenciam que a ADAM9 possui atividades dependentes da linhagem celular (FRY; TOKER, 2010). Portanto, mais esforços devem ser realizados visando o estudo dos domínios adesivos que são de grande utilidade para que ADAM9D possa ser utilizada como uma ferramenta para investigar a função deste importante grupo de proteínas na carcinogênese e progressão tumoral, além de fornecer subsídios para o desenho de agentes inibidores seletivos que possam atuar contra a sobrevivência e proliferação de células tumorais.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Neste projeto a ADAM9D foi clonada no vetor pGEX-4T-1 na linhagem de *E. coli* AD494(DE3) e produzida na sua forma solúvel e ativa, e foi utilizada em diferentes ensaios celulares para verificar sua atividade e funções na migração e invasão celular.

Nos ensaios de atividade celular a ADAM9D:

- ✓ Foi capaz de promover a adesão via diferentes integrinas, como $\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha 6$ e $\alpha 2$ nas linhagens celular de câncer de mama e de próstata, evidenciando o papel do domínio desintegrina de interagir com diferentes integrinas;
- ✓ Na linhagem MDA-MB-231 a ADAM9D foi capaz de inibir a adesão ao colágeno tipo I nas concentrações de 10, 100 e 1000nM. Entretanto, na linhagem DU-145 a proteína em estudo induziu a adesão na concentração de 10nM, e nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000nM a adesão ao colágeno não foi afetada;
- ✓ Não afetou a proliferação celular nas diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM e 1000nM) e linhagens celulares testadas (MDA-MB-231, DU-145 e FH);
- ✓ Inibiu a invasão nas linhagens MDA-MB-231 e DU-145;
- ✓ No ensaio de migração *trans-well* a ADAM9D inibiu a migração das células MDA-MB-23 e na linhagem DU-145 a ADAM9D não afetou a migração celular;
- ✓ Inibiu a migração da linhagem MDA-MB-231 na maior concentração testada (2000nM) no ensaio de migração – *Wound Healing*, e na linhagem DU-145 a ADAM9D inibiu a migração nas concentrações de 100, 500 e 1000nM;
- ✓ Quanto à expressão de MMPs, com a incubação da ADAM9D na linhagem MDA-MB-231 houve uma redução da atividade da MMP-9 e MMP2. Na linhagem DU-145, o sobrenadante do *wound healing*, não houve alteração na expressão de MMP-9, mas houve um aumento da proMMP-2 e da MMP-2. No sobrenadante da migração *trans-well* da linhagem DU-145, verificou-se que não houve diferença significativa na expressão nas diferentes MMPs;
- ✓ Portanto, este estudo foi capaz de obter mais informações sobre as funções do domínio desintegrina da ADAM9 na adesão e proliferação celular, além de verificar seu papel na migração e invasão de células tumorais de câncer de mama e de próstata.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFANDARI, D. *et al.* Xenopus ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. **Curr Biol**, v.11, n.12, p.918-30, Jun 26, 2001.

ALMEIDA, E. A. *et al.* Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. **Cell**, v.81, n.7, p.1095-104, Jun 30, 1995.

AMOUR, A. *et al.* The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. **FEBS Lett**, v.473, n.3, p.275-9, May 19, 2000.

ASAI, M. *et al.* Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.301, n.1, p.231-5, Jan 31, 2003.

ASAKURA, M. *et al.* Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. **Nat Med**, v.8, n.1, p.35-40, Jan, 2002.

BECKER, J. W. *et al.* Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. **Protein Sci**, v.4, n.10, p.1966-76, Oct, 1995.

BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. **J Cell Physiol**, v.213, n.3, p.565-73, Dec, 2007.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v.62, n.3, p.325-72, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods Enzymol**, v.248, p.345-68, 1995.

BLACK, R. A. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **Int J Biochem Cell Biol**, v.34, n.1, p.1-5, Jan, 2002.

BLACK, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v.385, n.6618, p.729-33, Feb 20, 1997.

BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr Opin Cell Biol**, v.10, n.5, p.654-9, Oct, 1998.

BLOBEL, C. P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.6, n.1, p.32-43, Jan, 2005.

BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v.90, n.4, p.589-92, Aug 22, 1997.

BLOBEL, C. P. *et al.* A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v.356, n.6366, p.248-52, Mar 19, 1992.

BROOKS, S. A. *et al.* Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochem**, v.112, n.1, p.3-252010.

BUXBAUM, J. D. *et al.* Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. **J Biol Chem**, v.273, n.43, p.27765-7, Oct 23, 1998.

CERRETTI, D. P. *et al.* Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v.263, n.3, p.810-5, Oct 5, 1999.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v.11, n.11, p.S37-43, Nov, 2001.

CHO, C. *et al.* Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. **Science**, v.281, n.5384, p.1857-9, Sep 18, 1998.

CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res**, v.66, n.17, p.8319-26, Sep 1, 2006.

CLEUTJENS, J. P. *et al.* Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v.27, n.6, p.1281-92, Jun, 1995.

COMINETTI, M. R. *et al.* Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. **Biochimie**, v.91, n.8, p.1045-52, Aug, 2009.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**, v.10, n.1, p.9-22, Jan, 2010.

DOEDENS, J. R.; MAHIMKAR, R. M.; BLACK, R. A. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.308, n.2, p.331-8, Aug 22, 2003.

DUFFY, M. J. *et al.* The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. **Thromb Haemost**, v.89, n.4, p.622-31, Apr, 2003.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, v.29, n.5, p.258-89, Oct, 2008.

EMI, M. *et al.* A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. **Nat Genet**, v.5, n.2, p.151-7, Oct, 1993.

ETO, K. *et al.* Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **J Biol Chem**, v.277, n.20, p.17804-10, May 17, 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.34922-30, Nov 10, 2000.

FORGET, M. A.; DESROSIERS, R. R.; BELIVEAU, R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. **Can J Physiol Pharmacol**, v.77, n.7, p.465-80, Jul, 1999.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v.123, n.Pt 24, p.4195-200, Dec 15, 2010.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **J Cell Biol**, v.188, n.1, p.11-9, Jan 11, 2009.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.5, p.362-74, May, 2003.

FRITZSCHE, F. R. *et al.* ADAM9 expression is a significant and independent prognostic marker of PSA relapse in prostate cancer. **Eur Urol**, v.54, n.5, p.1097-106, Nov, 2008.

FRY, J. L.; TOKER, A. Secreted and membrane-bound isoforms of protease ADAM9 have opposing effects on breast cancer cell migration. **Cancer Res**, v.70, n.20, p.8187-98, Oct 15, 2010.

GANDY, S.; PETANCESKA, S. Regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v.1502, n.1, p.44-52, Jul 26, 2000.

GARTON, K. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). **J Biol Chem**, v.276, n.41, p.37993-8001, Oct 12, 2001.

GECHTMAN, Z. *et al.* The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. **J Biol Chem**, v.274, n.40, p.28828-35, Oct 1, 1999.

GEHLEN, K. R.; DAVIS, G. E.; SRIRAMARAO, P. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. **Clin Exp Metastasis**, v.10, n.2, p.111-20, Mar, 1992.

GEHO, D. H. *et al.* Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. **Physiology (Bethesda)**, v.20, p.194-200, Jun, 2005.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v.1796, n.2, p.293-308, Dec, 2009.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS J**, v.278, n.1, p.16-27, Jan, 2010.

- GILPIN, B. J. *et al.* A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. **J Biol Chem**, v.273, n.1, p.157-66, Jan 2, 1998.
- GUARINO, M. Src signaling in cancer invasion. **J Cell Physiol**, v.223, n.1, p.14-26, Apr, 2010.
- HADLER-OLSEN, E. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS J**, v.278, n.1, p.28-45, Jan, 2010.
- HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.2, p.91-100, Feb, 2002.
- HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett**, v.354, n.1, p.1-6, Oct 31, 1994.
- HORWITZ, A. F.; HUNTER, T. Cell adhesion: integrating circuitry. **Trends Cell Biol**, v.6, n.12, p.460-1, Dec, 1996.
- HOTODA, N. *et al.* A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. **Biochem Biophys Res Commun**, v.293, n.2, p.800-5, May 3, 2002.
- HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **J Vis Exp**, n.452010.
- 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.4982-91, Oct, 2005.
- 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.1143-56, May 29, 2000.
- IBA, K. *et al.* Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **Am J Pathol**, v.154, n.5, p.1489-501, May, 1999.
- IGARASHI, T. *et al.* Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. **FEBS Lett**, v.581, n.13, p.2416-22, May 29, 2007.
- ILINA, O.; FRIEDL, P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. **J Cell Sci**, v.122, n.Pt 18, p.3203-8, Sep 15, 2009.
- IZUMI, Y. *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. **Embo J**, v.17, n.24, p.7260-72, Dec 15, 1998.
- JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.4, p.239-52, Apr, 2009.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.5, p.392-401, May, 2006.

KARADAG, A.; ZHOU, M.; CROUCHER, P. I. ADAM-9 (MDC-9/meltrin-gamma), a member of the a disintegrin and metalloproteinase family, regulates myeloma-cell-induced interleukin-6 production in osteoblasts by direct interaction with the alpha(v)beta5 integrin. **Blood**, v.107, n.8, p.3271-8, Apr 15, 2006.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v.141, n.1, p.52-67, Apr 2, 2010.

KOIKE, H. *et al.* Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. **Biochem J**, v.343 Pt 2, p.371-5, Oct 15, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-5, Aug 15, 1970.

LAMMICH, S. *et al.* Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.7, p.3922-7, Mar 30, 1999.

LOECHEL, F. *et al.* ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. **Biochem Biophys Res Commun**, v.278, n.3, p.511-5, Nov 30, 2000.

LOECHEL, F. *et al.* Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. **J Biol Chem**, v.273, n.27, p.16993-7, Jul 3, 1998.

LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J Biol Chem**, v.273, n.40, p.26236-47, Oct 2, 1998.

LUNN, C. A. *et al.* Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. **FEBS Lett**, v.400, n.3, p.333-5, Jan 6, 1997.

MAHIMKAR, R. M. *et al.* Identification, cellular distribution and potential function of the metalloprotease-disintegrin MDC9 in the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v.11, n.4, p.595-603, Apr, 2000.

MAHIMKAR, R. M. *et al.* The disintegrin domain of ADAM9: a ligand for multiple beta1 renal integrins. **Biochem J**, v.385, n.Pt 2, p.461-8, Jan 15, 2005.

MARTIN, J. *et al.* The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. **J Biol Chem**, v.277, n.37, p.33683-9, Sep 13, 2002.

MASSAGUE, J.; PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors. **Annu Rev Biochem**, v.62, p.515-411993.

MAUCH, C. *et al.* Accelerated wound repair in ADAM-9 knockout animals. **J Invest Dermatol**, v.130, n.8, p.2120-30, Aug, 2010.

- MAZZOCCA, A. *et al.* A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. **Cancer Res**, v.65, n.11, p.4728-38, Jun 1, 2005.
- MCLEAN, G. W. *et al.* The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.7, p.505-15, Jul, 2005.
- MILLA, M. E. *et al.* Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). **J Biol Chem**, v.274, n.43, p.30563-70, Oct 22, 1999.
- MILLICHIP, M. I. *et al.* The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v.245, n.2, p.594-8, Apr 17, 1998.
- MIRANTI, C. K.; BRUGGE, J. S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nat Cell Biol**, v.4, n.4, p.E83-90, Apr, 2002.
- MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Curr Opin Cell Biol**, v.18, n.5, p.516-23, Oct, 2006.
- MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Sci**, v.98, n.5, p.621-8, May, 2007.
- MOSER, M. *et al.* The tail of integrins, talin, and kindlins. **Science**, v.324, n.5929, p.895-9, May 15, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, Dec 16, 1983.
- MOSS, M. L. *et al.* TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discov Today**, v.6, n.8, p.417-26, Apr 1, 2001.
- NATH, D. *et al.* Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. **J Cell Sci**, v.112 (Pt 4), p.579-87, Feb, 1999.
- NATH, D. *et al.* Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **J Cell Sci**, v.113 (Pt 12), p.2319-28, Jun, 2000.
- O'SHEA, C. *et al.* Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. **Int J Cancer**, v.105, n.6, p.754-61, Jul 20, 2003.
- PERRET, G. Y.; CREPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, n.5, p.465-92, Oct, 2008.
- PESCHON, J. J. *et al.* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**, v.282, n.5392, p.1281-4, Nov 13, 1998.

- PRENZEL, N. *et al.* EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. **Nature**, v.402, n.6764, p.884-8, Dec 23-30, 1999.
- RAAB, G.; KLAGSBRUN, M. Heparin-binding EGF-like growth factor. **Biochim Biophys Acta**, v.1333, n.3, p.F179-99, Dec 9, 1997.
- REDDY, P. *et al.* Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **J Biol Chem**, v.275, n.19, p.14608-14, May 12, 2000.
- REISS, K.; LUDWIG, A.; SAFTIG, P. Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. **Pharmacol Ther**, v.111, n.3, p.985-1006, Sep, 2006.
- ROBERTS, C. M. *et al.* MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. **J Biol Chem**, v.274, n.41, p.29251-9, Oct 8, 1999.
- ROCKS, N. *et al.* Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v.90, n.2, p.369-79, Feb, 2008.
- ROGHANI, M. *et al.* Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. **J Biol Chem**, v.274, n.6, p.3531-40, Feb 5, 1999.
- ROSENDAHL, M. S. *et al.* Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. **J Biol Chem**, v.272, n.39, p.24588-93, Sep 26, 1997.
- SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Curr Opin Genet Dev**, v.15, n.1, p.87-96, Feb, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- 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, Jan 1, 2003.
- SHI, Z. *et al.* ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. **J Biol Chem**, v.275, n.24, p.18574-80, Jun 16, 2000.
- SHINTANI, Y. *et al.* Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. **Cancer Res**, v.64, n.12, p.4190-6, Jun 15, 2004.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v.189, n.1, p.113-30, May 5, 1986.
- TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol**, v.8, n.5, p.2152007.
- TAKEDA, S. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. **Semin Cell Dev Biol**, v.20, n.2, p.146-52, Apr, 2009.

- TAKEDA, S. *et al.* Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **Embo J**, v.25, n.11, p.2388-96, Jun 7, 2006.
- TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. **J Orthop Sci**, v.11, n.3, p.326-31, May, 2006.
- TSOU, C. L.; HASKELL, C. A.; CHARO, I. F. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. **J Biol Chem**, v.276, n.48, p.44622-6, Nov 30, 2001.
- ULRICH, F.; HEISENBERG, C. P. Trafficking and cell migration. **Traffic**, v.10, n.7, p.811-8, Jul, 2009.
- VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.14, p.5578-82, Jul, 1990.
- WANG, W. J. Acurhagin-C, an ECD disintegrin, inhibits integrin alphavbeta3-mediated human endothelial cell functions by inducing apoptosis via caspase-3 activation. **Br J Pharmacol**, v.160, n.6, p.1338-51, Jul, 2010.
- WANG, X. *et al.* Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. **Cancer Sci**, v.101, n.3, p.759-66, Mar.
- WANG, X. *et al.* Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. **Cancer Sci**, v.101, n.3, p.759-66, Mar, 2010.
- WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v.15, n.5, p.598-606, Oct, 2003.
- WOLFSBERG, T. G. *et al.* The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.22, p.10783-7, Nov 15, 1993.
- WU, E.; CROUCHER, P. I.; MCKIE, N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochem Biophys Res Commun**, v.235, n.2, p.437-42, Jun 18, 1997.
- XU, Q. *et al.* RNAi-mediated ADAM9 gene silencing inhibits metastasis of adenoid cystic carcinoma cells. **Tumour Biol**, v.31, n.3, p.217-24, Jun, 2010.
- YAMADA, K. M. Integrin signaling. **Matrix Biol**, v.16, n.4, p.137-41, Oct, 1997.
- YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Curr Opin Cell Biol**, v.17, n.5, p.559-64, Oct, 2005.
- YAN, Y.; SHIRAKABE, K.; WERB, Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. **J Cell Biol**, v.158, n.2, p.221-6, Jul 22, 2002.

YAVARI, R. *et al.* Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. **Hum Mol Genet**, v.7, n.7, p.1161-7, Jul, 1998.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Mol Cancer Res**, v.8, n.5, p.629-42, May, 2010.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G.; LEHEMBRE, F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends Mol Med**, v.13, n.12, p.535-41, Dec, 2007.

YUAN, R.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. **J Cell Biol**, v.137, n.1, p.105-12, Apr 7, 1997.

YUE, P. Y. *et al.* A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v.15, n.4, p.427-33, Apr, 2010.

ZHANG, X. P. *et al.* Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. **J Biol Chem**, v.273, n.13, p.7345-50, Mar 27, 1998.

ZHOU, M. *et al.* MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin. **Biochem Biophys Res Commun**, v.280, n.2, p.574-80, Jan 19, 2001.

ZIGRINO, P.; NISCHT, R.; MAUCH, C. The disintegrin-like and cysteine-rich domains of ADAM-9 mediate interactions between melanoma cells and fibroblasts. **J Biol Chem**, Dec 6, 2010.

ZIGRINO, P. *et al.* Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. **J Biol Chem**, v.282, n.42, p.30785-93, Oct 19, 2007.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions

Marcia R. Cominetti^{a,*}, Ana Carolina B.M. Martin^a, Juliana U. Ribeiro^a, Ibtissem Djaafri^b, Françoise Fauvel-Lafève^b, Michel Crépin^{b,c}, Heloisa S. Selistre-de-Araujo^a

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

^b INSERM, U553, Hôpital St Louis, Paris 75010, France

^c Université Paris 13, Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Experimentale, CNRS UMR 7033, Bobigny 93000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2009

Accepted 28 May 2009

Available online xxx

Keywords:

ADAM

Integrin

Disintegrin

Cell adhesion

Cancer

Metastasis

ABSTRACT

This work aimed to investigate the role of the disintegrin domain of the human ADAM9 (ADAM9D) on the adhesion of breast tumor cells and platelets to collagen I, in a dynamic flow assay to simulate *in vivo* shear conditions. Recombinant ADAM9D was able to support tumor cell adhesion through binding to the $\beta 1$ integrin subunit and also to inhibit the invasion through matrigel *in vitro*. In a dynamic flow assay ADAM9D inhibited about 75% and 65% of MDA-MB-231 tumor cells and platelet adhesion to collagen I, respectively. In addition, it was demonstrated that $\alpha V\beta 3$ integrin is new interacting partner for ADAM9D. In conclusion, these results suggest a role for the disintegrin domain of ADAM9 in the metastatic process. Also, ADAM9D may be a tool for investigating the role of ADAMs in metastasis and cancer progression and for the design of selective inhibitors against the adhesion and extravasation of cancer cells.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Metastasis is a key characteristic of malignant cells, which use the bloodstream to colonize distant target organs. Tumor cell arrest within the vasculature is a prerequisite for metastasis and it can be supported by tumor cell interaction with activated platelets [1]. Once in the circulation, tumor cells and platelets are exposed to shear stress generated by the dynamic flow conditions in the bloodstream [2,3]. Under these conditions, the adhesive properties of cells are pronouncedly different from those that mediate tumor cell attachment under static or *in vitro* conditions [4].

To form metastasis, circulating tumor cells must attach to vascular endothelial cells or components of the vessel wall and invade through them until reach the target organs. This is mediated by specific adhesive functions of tumor cell receptors, including the

integrins. Integrins are a family of cell-surface α/β heterodimer receptors, which mediate adhesive interactions with multiple protein ligands, mostly extracellular matrix (ECM) proteins [5].

On the other hand, the ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) family of proteins comprises a group of multifunctional proteins that play important roles in many biological processes, such as cell fusion, cell adhesion, proteolysis, and in some diseases as well, including cancer [6]. These type I transmembrane proteins are characterized by the presence of a prodomain, an N-terminal metalloproteinase domain, a disintegrin domain, a cysteine-rich domain, an EGF-like domain, a transmembrane region, and a cytoplasmic tail with signaling properties [6–11]. The peptidase, disintegrin and cysteine-rich domains of the ADAMs are homologous to the snake venom metalloproteinase (SVMP) family of proteins [12].

Although various studies have focused on the proteolytic activities of some ADAM members, the importance of the disintegrin domain in cell adhesion and tumor progression has only been recently demonstrated [6,13]. The disintegrin domain of many ADAMs has the ability to interact with integrins on the surface of different cell types, including normal and cancer cells [13,14]. The interaction of ADAM15, or human metargidin, is provided by its RGD adhesive motif, which binds to $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins on hematopoietic cells [13]. In fact, ADAM15 is the only member of the ADAM family of proteins that contains the RGD sequence in the disintegrin domain. Other ADAM members bind to cells via ECD or

Abbreviations: ADAM, A disintegrin and metalloproteinase; ADAM9D, disintegrin domain of human ADAM9; ATCC, American type culture collection; BCA, bichinchonic acid; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; ECM, extracellular matrix; GST, glutathione S-transferase; IPTG, isopropyl thio- β -D-galactopyranoside; PCR, polymerase chain reaction; PRP, platelet-rich plasma; RGD, arginine-glycine-aspartic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SVMP, snake venom metalloproteinase.

* Corresponding author. Tel.: +55 162608333; fax: +55 162608401.

E-mail addresses: mcominetti@ufscar.br, marciacominetti@yahoo.com.br (M.R. Cominetti).

0300-9084/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biochi.2009.05.012

Please cite this article in press as: M.R. Cominetti et al., Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9..., Biochimie (2009), doi:10.1016/j.biochi.2009.05.012

DCD motifs [7,13,15]. In the literature, the adhesive properties of the different ADAMs' domains are still a matter of controversy. Whereas some works attribute adhesive properties to the disintegrin domain [16–18], others indicate the cysteine-rich domain as having adhesive functions [19]. The same controversy is also observed for ADAM homologues, the SVMP proteins [20].

Among the 30 described members of the ADAM family, ADAM9 or Meltrin- γ , is a widely expressed, non-RGD-containing protein that has been shown to bind to the $\alpha 6\beta 1$ integrin on fibroblasts [16], $\alpha V\beta 5$ on myeloma cells [21] as well as osteoblasts [17]. Furthermore, the disintegrin domain of ADAM9 was demonstrated to bind directly to $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins on the surface of colon carcinoma cells [18]. After binding to these integrins, the disintegrin domain of ADAM9 was able to promote different cell signaling responses, such as an increase in IL-6 production via the p38MAPK and cPLA₂ pathways [17].

In the present work we demonstrated for the first time, the adhesive properties of the disintegrin domain of ADAM9 under flow conditions, used to simulate the shear conditions found *in vivo* in the bloodstream. ADAM9D inhibited the adhesion of both tumor cells and platelets to type I collagen, a major component of the endothelium. In addition, we demonstrated that $\alpha V\beta 3$ integrin is a new interacting partner for ADAM9D. Moreover, ADAM9D inhibited the invasion of tumor cells through matrigel, strongly suggesting a role for the ADAM9 disintegrin domain on the adhesive properties of this protein.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies

For competition assays the monoclonal antibodies directed against human $\alpha 2$ (MAB1233), $\alpha 6$ (MAB13501), $\beta 1$ (MAB17781) and $\alpha V\beta 5$ (MAB2528) integrins were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Antibodies against $\alpha V\beta 3$ (MAB1976) and $\alpha 3$ (AB1920) integrins were from Chemicon (Billerica, MA, USA), and antibodies to the $\alpha 4$ integrin subunit (I6528) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti- $\alpha V\beta 3$, anti- $\alpha 2\beta 1$, anti- $\alpha 2$ and anti- $\alpha IIb\beta 3$ integrin antibodies and FITC-labeled rat IgG2a isotype control antibodies for flow cytometry analysis were from Becton–Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Purified control IgG was purchased from Dako (Hamburg, Germany).

2.2. Cell line and culture

MDA-MB-231 human breast tumor cell line, obtained from ATCC, was maintained at 37 °C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cultilab – Campinas; SP, Brazil) containing 10% FBS, penicillin (100 UI/ml), streptomycin (100 µg/ml) and L-glutamine (2 mM). Cell cultures and experiments were conducted in a humidified environment with 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. ADAM9 disintegrin domain cloning

Total RNA from a VMM12 human melanoma cell line was kindly donated by Dr. Jay W. Fox from the University of Virginia Health Systems (Charlottesville, VA, USA). After reverse transcription using the Superscript One-Step RT-PCR kit (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), the resulting cDNA was used for amplification of the disintegrin domain of human ADAM9 (ADAM9D) (GenBank accession no. NM003816) with the following oligonucleotides: sense 5'-CAT CGATCCGCTCCCTCTGTGGTAATAAGTTG-3' and antisense 5'-GT CGCTCGAG TTAATATCCATTCTGAATAAAAACATCTG-3'. The PCR product for ADAM9D corresponds to the nucleotides 1318–1588

and generates an amplicon of 270 pb which results in a protein with two ECD domains (base pairs 1357–1365 and 1513–1521). To facilitate the DNA cloning, *Bam* HI and *Xho* I restriction sites were added to the primers (underlined regions). For ADAM9D expression it was used the pGEX-4T-1 vector which is classically used to produce GST fusion proteins. The PCR product and pGEX-4T-1 vector (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were digested with the same restriction enzymes, purified from 1% agarose gels, and ligated using T4 DNA ligase (Invitrogen). After the transformation of *Escherichia coli* DH5- α cells, the ampicillin-resistant recombinant plasmids were selected for restriction analysis and the positive clones were automatically sequenced in an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer – Foster City, CA, USA). The confirmed recombinant plasmids (pADAM9D) were used to transform the *E. coli* AD494(DE3) expression strain.

2.4. Protein expression, purification and characterization

Cultures of *E. coli* AD494(DE3)pADAM9D were induced for expression by addition of 0.5 mM isopropyl thio- β -D-galactopyranoside (IPTG). Four hours after induction, the cells were harvested by centrifugation (7000 rpm, 15 min, 4 °C) in a Sorvall refrigerated centrifuge. Cell pellet was suspended in PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) and lysed by sonication (5 times, 4 °C, 1 min interval). ADAM9D was released from the fusion protein (GST) by thrombin (GE Healthcare) cleavage. Thrombin was eliminated from samples containing ADAM9D by purification in a Benzamidine-Sepharose 4B column (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue staining and ADAM9D concentration was determined by BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). The ADAM9D expression yield is approximately 2.5 mg/l of culture.

2.5. Platelet aggregation

Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP). Human blood was obtained from healthy donors and an 8% sodium citrate solution was added into the blood at the proportion of 1/9 (v/v). The mixture was centrifuged at 500 × g for 10 min and PRP was transferred into a clean tube. Different amounts of ADAM9D were added to PRP and allowed to incubate for 2 min, followed by the addition of collagen type I (final concentration of 10 µg/ml) or ADP (10 µM) to initiate aggregation. Platelet aggregation was measured in a Chronolog Aggregometer at 37 °C with stirring (900 rpm). The maximum aggregation response obtained from addition of collagen or ADP and in the absence of ADAM9D was given a value of 100% aggregation.

2.6. Inhibition of cell adhesion

Cell adhesion assays were performed as described earlier [22]. Briefly, 80% confluent monolayer cultures of MDA-MB-231 breast tumor cells were detached from tissue flasks by a short period incubation with 0.25% Trypsin–0.1% EDTA solution. Collagen type I from calf skin (Sigma–Aldrich) in acetic acid (0.1%) was immobilized in 96 well plates (10 µg/well) by incubation at 4 °C overnight. Wells were blocked with 1% BSA in adhesion buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, and 1 mM MnCl₂, pH 7.4) (200 µl/well) at room temperature for 2 h. MDA-MB-231 cells (5 × 10⁶ cells/ml) were labeled by incubation with 12.5 µM CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) in adhesion buffer at 37 °C for 30 min. Unbound label was removed by washing with adhesion buffer. Labeled cells (1 × 10⁵ cells/well) were incubated with ADAM9D at several concentrations before being transferred to the plate and incubated at 37 °C for 30 min. After washing to remove

unbound cells, the remaining cells were lysed by the addition of 0.5% Triton X-100. In parallel, a standard curve was prepared in the same plate using known quantities of labeled cells. The plates were read using a Spectra-Max Gemini XS fluorescence plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with a 485-nm excitation and 530-nm emission filters.

2.7. Promotion of cell adhesion and antibody competition assays

For the promotion of cell adhesion assay, collagen type I (10 µg/well) (Sigma–Aldrich) or ADAM9D (1–100 µg/well) dissolved in 0.1% acetic acid or adhesion buffer respectively, were immobilized on a 96-well microtiter plate overnight at 4 °C. Labeled cells (1×10^5 cells/well) alone or previously incubated with anti- α V β 3, anti- α V β 5, anti- α 2, anti- α 3, anti- α 4, anti- α 6, and anti- β 1 blocking antibodies were added to the wells for 30 min at 37 °C. After washing with adhesion buffer to remove unbound cells, the remaining cells were lysed and the plate was read as described above.

2.8. Flow cytometry analysis

The integrin content on MDA-MB-231 breast tumor cells and platelets was determined by flow cytometry analysis using specific anti-integrin antibodies. Harvested MDA-MB-231 breast tumor cells were washed in PBS containing 1% BSA and 5×10^5 cells were incubated for 30 min at 4 °C with 10 µl FITC-anti- α V β 3, anti- α 2, anti- β 1, anti- α 3, or anti- α IIb β 3 integrin antibodies. As negative controls, cells were incubated with FITC-isotype antibodies. Cells were immediately analyzed with a FACscalibur flow cytometer (Becton–Dickinson Biosciences).

2.9. Matrigel invasion assay

To measure cell invasion BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton–Dickinson Biosciences) were used. Eighty percent confluent monolayer cultures of MDA-MB-231 breast tumor cells were detached as described above and 5×10^4 cells/ml, previously mixed or not (controls) with ADAM9D (1 µM) were placed in the upper well of rehydrate inserts. For the controls, the lower well was filled with 750 µl medium with (+C) or without (–C) 10% FBS. Cells were allowed to invade for 22 h. Then the non-invading cells were scraped from the upper surface of the membrane and the cells on the lower side were fixed with 100% methanol and stained with 1% Toluidine Blue in 1% Borax. Inserts were rinsed with water and membranes were allowed to air dry. Twenty images covering the membrane were taken under microscope and the recovered surface of insert membranes was calculated using the software Image J.

2.10. Flow adhesion assay

The effects of ADAM9D on the adhesion of tumor cells and platelets *in vitro* under flow conditions were analyzed using a model proposed by Gomes [23]. MDA-MB-231 cells (10^6 cells/ml) labeled with cell tracker red CMTPX (Invitrogen) were incubated (20 min) with ADAM9D (5 and 10 µM, final concentrations) or PBS (control) at 37 °C. Blood obtained from consenting healthy human donors was anticoagulated with standard heparin (13 IU/ml) and centrifuged at $200 \times g$ for 20 min to obtain PRP which was then labeled with 5 µg/ml cell trace calcein green AM (Invitrogen) for 30 min at 37 °C. PRP was mixed with the remaining red blood cells (1:1.5, v/v) and further mixed with ADAM9D-treated MDA-MB-231 labeled cells (1:10, v/v). The mixture was perfused (1500 s^{-1}) in a perfusion chamber for 10 min covered by a bovine collagen type I-coated coverslip. After washing with PBS for 5 min, twenty

different fields were captured using the software Scion Visicapture Image Acquisition Application and an epifluorescent microscopy (Nikon Eclipse TE 300) coupled to a photo machine. Recovered surface of adhered platelets and cells in each field was differentially counted using the software Image J.

2.11. Statistical analysis

Each experiment was repeated three times in triplicate and a standard error mean was calculated. The results were compared statistically with a one-way analysis of variance (ANOVA). Since the ANOVA tests showed significant differences (acceptable *p* level < 0.05) Dunnett's significant difference post hoc analysis was performed to determine differences between simple main-effect means.

3. Results

3.1. ADAM9D cloning, expression, purification and characterization

A band of 270 bp was amplified from total RNA extracted from human VMM12 cells using specific primers for the disintegrin domain of human ADAM9 (GenBank accession no. NM003816) (Fig. 1A). The PCR product and the vector pGEX-4T-1 were purified and ligated. The success of the cloning process was confirmed by restriction analysis and sequencing (not shown). *E. coli* AD494(DE3) cells were transformed by pADAM9D and the ADAM9D was produced after IPTG induction (Fig. 1B, lanes 1 and 2). Most of the recombinant protein (60%) was found in the soluble extract (Fig. 1B, lane 3), yielding approximately 2.5 mg of ADAM9D per liter of bacterial culture. However, a great quantity of protein was produced as inclusion bodies and was found in the pellet fraction (Fig. 1B, lane 4). The ADAM9D was released from the pGEX-4T-1 fusion protein (GST) using thrombin cleavage. Fig. 1C represents the thrombin cleavage at 0 h at room temperature (lane 1) or 4 °C (lane 2) and after 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h, under room temperature, respectively (Fig. 1C, lanes 3–8). Thrombin was eliminated from samples containing ADAM9D by purification in a Benzamidine-Sephrose 4B column and the fractions containing ADAM9D were concentrated (Fig. 1D) to be used in the biological assays. ADAM9D was submitted to N-terminal sequencing of its first 8 residues (Gly-Ser-Ala-Pro-Ser-Cys-Gly-Asn). The amino acid sequence had 100% identity with the predicted sequence of the disintegrin domain of ADAM9 (bold residues after the thrombin cleavage site).

3.2. Platelet aggregation

Recombinant ADAM9D was tested on platelet aggregation using human PRP and collagen type I or ADP as agonists for aggregation. Recombinant ADAM9D, at concentrations as high as 10 µM, was unable to inhibit platelet aggregation induced by both agonists, collagen type I or ADP (results not shown).

3.3. Effects of ADAM9D on the adhesion of MDA-MB-231 cells under static conditions

In a static model, ADAM9D inhibited the adhesion of MDA-MB-231 breast cancer cells to the collagen type I. This inhibition was partially proportional to the concentration of ADAM9D used. Concentrations of 1 nM of ADAM9D inhibited $22.96 \pm 2.6\%$, whereas concentrations of 10, 100 and 1000 nM inhibited $32.75 \pm 4.8\%$, $36.56 \pm 0.05\%$ and $37.43 \pm 1.4\%$, respectively, the adhesion of MDA-MB-231 cancer cells compared to the positive control, collagen type I, to which the adhesion was considered as 100% (Fig. 2).

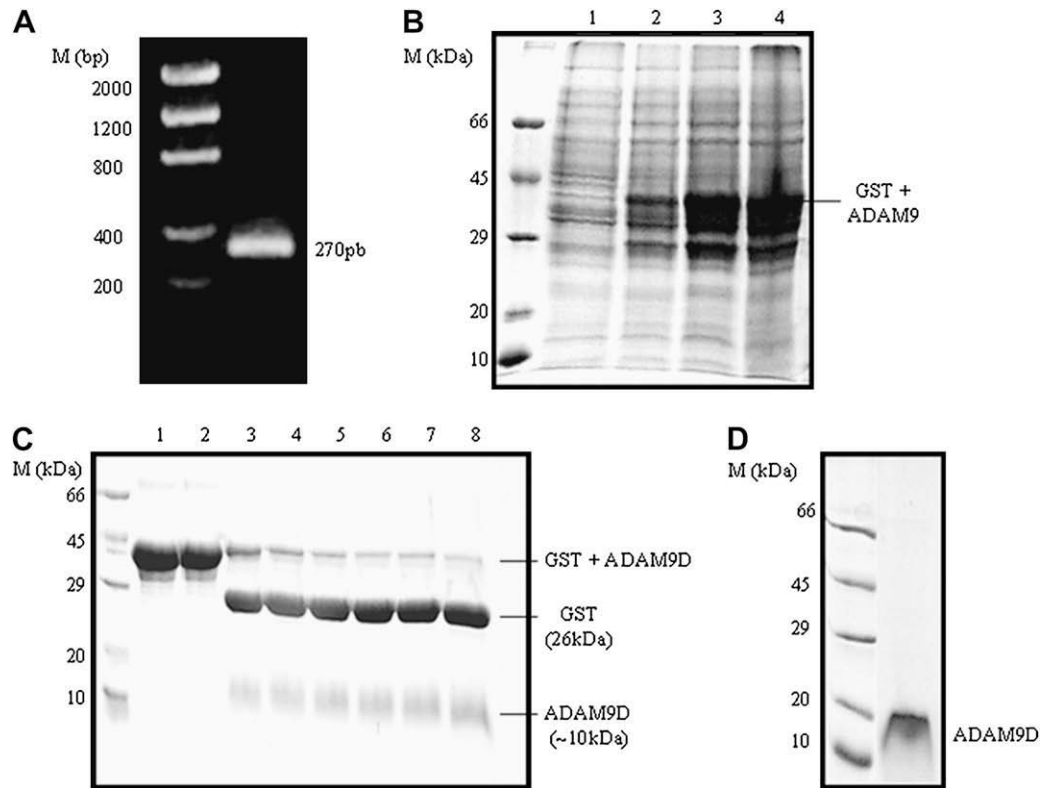


Fig. 1. Cloning, expression and purification of recombinant disintegrin domain of human ADAM9 (ADAM9D). (A) cDNA amplification of ADAM9D (270 bp) starting from total RNA of VMM12 cell line (1% agarose gel). (B) Recombinant ADAM9D protein was expressed by *E. coli* AD494(DE3). Bacterial culture sample before IPTG induction (lane 1) or 4 h after IPTG induction (lane 2) are represented. The protein content of the cell extract representing the soluble (lane 3) and insoluble (lane 4) fractions are also showed (SDS-PAGE in a Coomassie brilliant blue-stained 15% gel). (C) Digestion of ADAM9D/GST recombinant protein after expression and purification on a Glutathione-Sepharose 4B resin, following 0 h of thrombin incubation at room temperature (lane 1) or 4 °C (lane 2) and 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h (lanes 3–8) of thrombin incubation at room temperature, respectively (15% SDS-PAGE). Samples containing ADAM9D were fractionated by application on a Benzamidine-Sepharose 4B column for thrombin elimination. (D) Concentrated fraction of ADAM9D (15% SDS-PAGE). M: molecular mass marker.

To analyze whether the recombinant ADAM9D could support the adhesion of breast tumor cancer cells, the protein was immobilized on the wells of a 96-well plate. When coated on wells, ADAM9D significantly induced concentration-dependent adhesion of breast tumor MDA-MB-231 cells, working as an adhesion molecule for this cell type (Fig. 3A). ADAM9D at quantities of 1, 10 and 100 μg supported the adhesion of tumor cells by $67.7 \pm 6.2\%$, $99.8 \pm 4.5\%$ and $110 \pm 10.2\%$, respectively, when compared to the adhesion of collagen type I (Fig. 3A). MDA-MB-231 cells adhered very poorly on BSA ($11.5 \pm 1.8\%$), used as a negative control (Fig. 3A). The morphology of cells plated on different substrates was also analyzed (Fig. 3B). After 6 h of incubation the majority of cells plated on BSA appeared rounded, contrasting with cells plated on collagen type I, which spread out through the coating forming cell projections. A similar pattern was observed when cells were plated on ADAM9D coating (10 μg , 6 h and 24 h) (Fig. 3B) suggesting that this protein can serve as a substrate for supporting cell adhesion.

The integrin content on tumor MDA-MB-231 cell and platelets were measured by flow cytometry using specific antibodies against different integrins (Fig. 4). Cytometry analysis of MDA-MB-231 cells showed that they express high levels of $\alpha\text{V}\beta 3$, $\beta 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ and integrins, however they do not express the platelet $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin on their surface (Fig. 4). For the surface of human platelets, the integrin profile is already well documented [24]. They contain at least five members of integrin family proteins, including a collagen receptor, the $\alpha 2\beta 1$ integrin, which is the most widely distributed collagen-binding integrin on platelets [24].

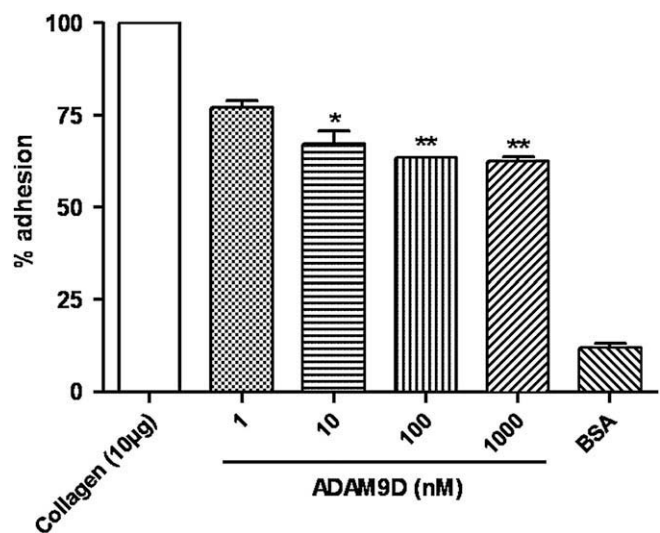


Fig. 2. ADAM9D inhibits the adhesion of MDA-MB-231 breast tumor cells to collagen type I. Ninety six well plates were coated with collagen I (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) overnight at 4 °C. After blocking with 1% BSA, CMFDA-labeled MDA-MB-231 cells (1×10^5 cells/well) previously incubated for 30 min at 37 °C with different concentrations of ADAM9D (1–1000 nM), were seeded in the wells. After washing, remaining cells were lysed and the plate was read for the release of fluorescence. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. The results were normalized by the collagen values which were considered as 100% adhesion. The *p* value was determined using the using Dunnett's test comparing ADAM9D bars with the positive control bar (collagen type I) (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

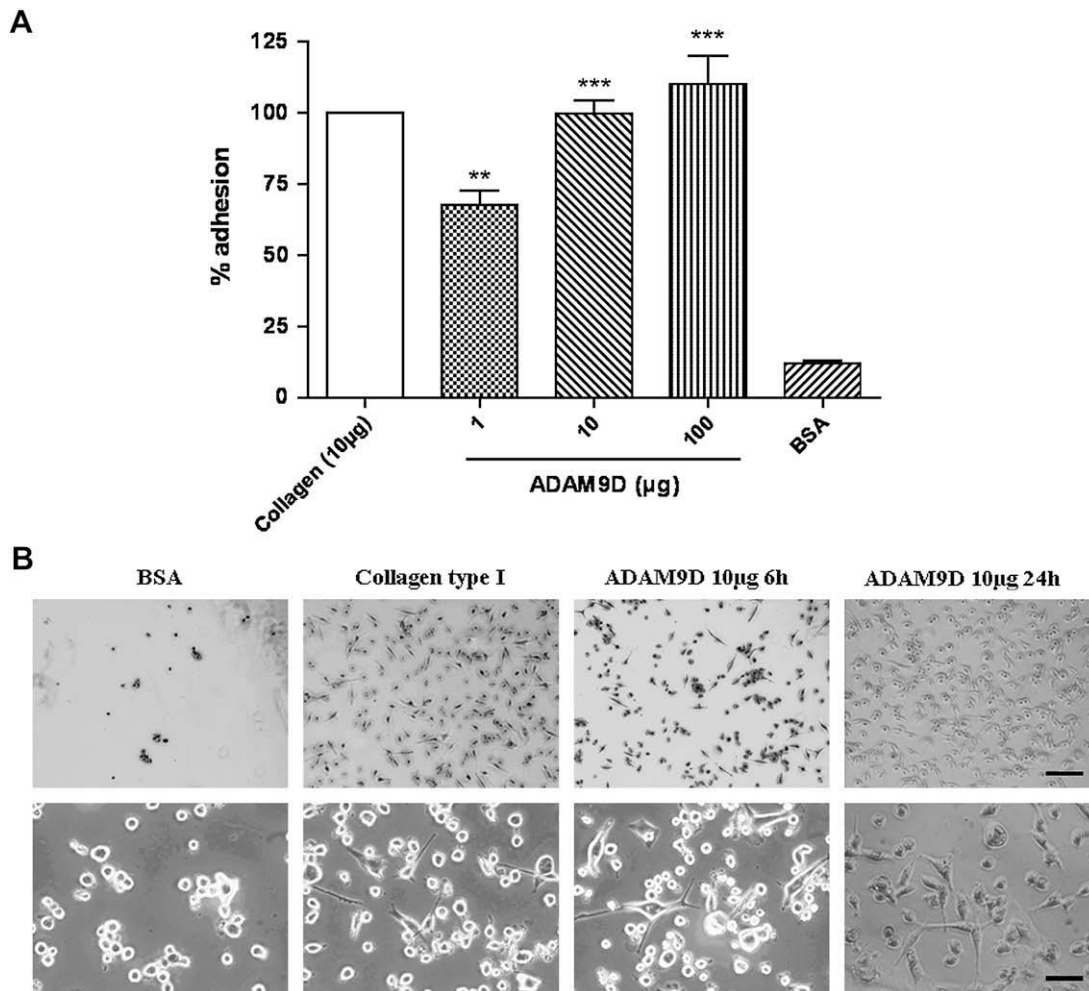


Fig. 3. ADAM9D supports the adhesion of MDA-MB-231 breast tumor cells. (A) 96 well plates were coated with ADAM9D (1–100 µg) or collagen I (10 µg/well) overnight at 4 °C. After blocking with 1% BSA, CMFDA-labeled MDA-MB-231 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in the wells. The plates were incubated at 37 °C for 30 min, washed, lysed and read as in Fig. 2. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. The *p* value was determined using the using Dunnett's test comparing ADAM9D bars with negative control bar (BSA) (***p* < 0.01; ****p* < 0.001). (B) Morphology of cells plated on BSA, collagen type I (10 µg) or ADAM9D (10 µg) was analyzed by photomicrographs taken after 6 and 24 h of incubation (bars 10 µm, upper panel; 25 µm, lower panel).

Other integrin receptors in platelets include a fibrinogen receptor (α IIb β 3), a vitronectin receptor (α V β 3), a fibronectin receptor (α 5 β 1), and a laminin receptor (α 6 β 1) [24].

3.4. ADAM9D binds to MDA-MB-231 tumor breast cells by β 1, α 3, α V β 3, α V β 5 and α 2 integrins

To verify which integrin subunits of tumor cells were specific for the binding of ADAM9D, we performed competition assays using blocking anti-integrin antibodies (Fig. 5). MDA-MB-231 cells were incubated with different inhibitory anti-integrin antibodies and then applied on ADAM9D-coated wells. Antibodies directed against the β 1 integrin subunit efficiently inhibited MDA-MB-231 cell adhesion to ADAM9D ($88.13 \pm 3.4\%$) compared to the control, where cells were incubated only with PBS and plated on ADAM9D (Fig. 5). Antibodies against α 3, α V β 3, α V β 5, and α 2 integrins also inhibited MDA-MB-231 cell adhesion to ADAM9D by $74 \pm 17.1\%$, $55.1 \pm 1.8\%$, $50.66 \pm 3.7\%$ and $39.63 \pm 7.6\%$, respectively. This result demonstrates for the first time that the disintegrin domain of ADAM9D interacts with α V β 3 integrin. On the other hand, antibodies raised against α 6 and α 4 integrin subunits did not have a significant

effect on the inhibition of MDA-MB-231 cell adhesion to ADAM9D-coated wells (Fig. 5).

3.5. ADAM9D inhibits the matrigel invasion of MDA-MB-231 breast tumor cells

ADAM9D (1 µM) inhibited the invasion of MDA-MB-231 breast tumor cells through the matrigel in an *in vitro* assay by $60 \pm 11.3\%$ (Fig. 6). Complete medium was used as a chemoattractant and the negative control was medium without serum.

3.6. ADAM9D inhibits the adhesion of MDA-MB-231 breast tumor cells and activated platelets to collagen type I under dynamic flow conditions

The effects of ADAM9D on the adhesion of MDA-MB-231 cells and activated platelets to collagen type I under dynamic flow assay conditions were tested (Fig. 7). ADAM9D (5 µM) was able to inhibit the adhesion of platelets and tumor cells by $65.6 \pm 14.2\%$ and $69.5 \pm 13.2\%$ respectively, compared to the control (Fig. 7). Results obtained with 10 µM ADAM9D were not significantly different from those with 5 µM ($63.4 \pm 29.1\%$ for platelets and $81.8 \pm 17.2\%$ for tumor cells).

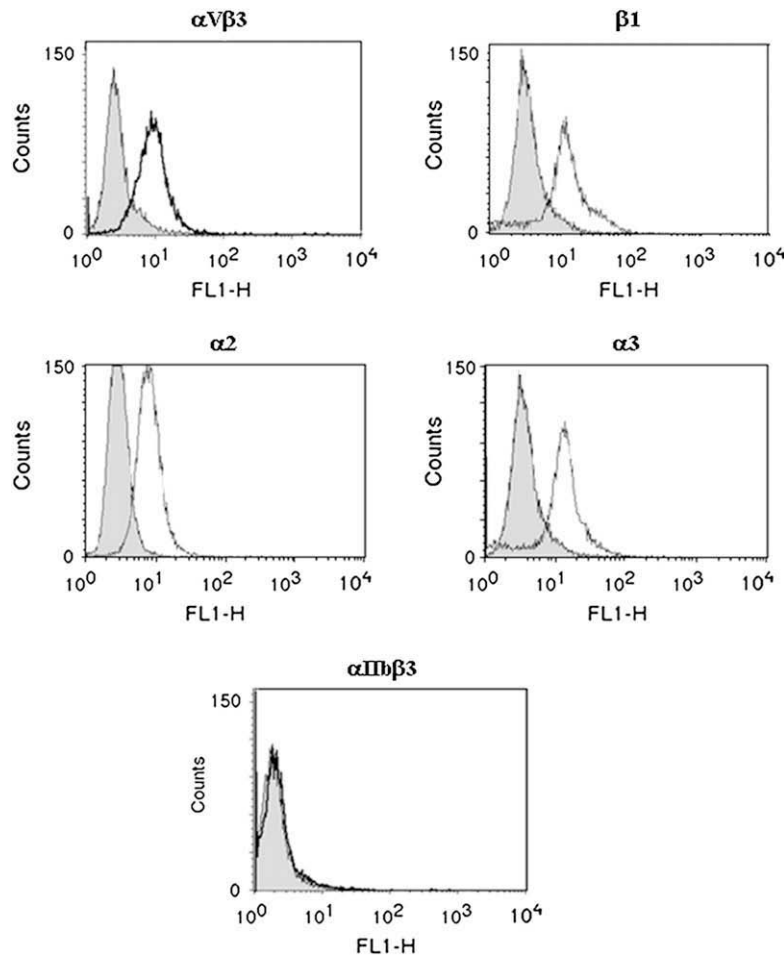


Fig. 4. MDA-MB-231 cells express $\alpha V\beta 3$, $\beta 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$, but not $\alpha IIb\beta 3$ integrin receptors. The presence of integrin receptors on MDA-MB-231 cell surface was determined by flow cytometry with FITC-anti- $\alpha V\beta 3$, anti- $\alpha 2$, anti- $\beta 1$, anti- $\alpha 3$, or anti- $\alpha IIb\beta 3$ integrin antibodies, as described in Section 2. Shaded curve represents background fluorescence in the presence of isotype-matched antibody.

4. Discussion

ADAM9D was produced in a bacterial system in an active form, which was demonstrated by several biological assays. Similar results were previously described [17,21] suggesting that no post-translational modifications are needed for its activity. ADAM9D inhibited MDA-MB-231 cell adhesion to collagen I and functioned as an adhesive protein itself. Inhibition of cell adhesion by ADAM9D was only partial probably by the presence of other collagen-binding receptors on MDA-MB-231 cells, such as $\alpha 1\beta 1$ integrin [25–27].

The interaction of ADAM9D with tumor cells was mediated mainly by $\beta 1$ integrin subunits in these cells, as demonstrated by antibody competition assays. It has been previously demonstrated that the recombinant disintegrin and cysteine-rich domains from human ADAM9 mediate cellular adhesion through $\beta 1$ integrins [19,28]. The disintegrin domain of human ADAM9 was also demonstrated to be a ligand for $\alpha V\beta 5$ integrin on myeloma cells [21]. Our data are in agreement with these results and moreover indicate, for the first time, an interaction of ADAM9D with $\alpha V\beta 3$ integrin on MDA-MB-231 breast tumor cells. Flow cytometry analysis of this cell line confirmed the presence of $\alpha V\beta 3$ integrin.

Nath et al. [16] and Mazzocca et al. [18] have demonstrated the binding of the ADAM9 recombinant ectodomain to fibrosarcoma or liver cells. In addition, Karadag et al. [17] have demonstrated that the recombinant disintegrin domain of human ADAM9 regulates

myeloma-cell-induced IL-6 production in osteoblasts, through interaction with $\alpha V\beta 5$ integrin. In agreement with these results, Mahimkar et al. [28] produced the stable expression of ADAM9 constructs in HEK-293 cells and showed that the disintegrin domain (and not the cysteine-rich domain) is the responsible for the competitive inhibition of these cells to the ECM components, by binding to different $\beta 1$ integrins ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ and αV). On the other hand, Zigrino et al. [19] demonstrated that ADAM9 functions as a cell adhesion molecule via disintegrin and cysteine-rich domains. Therefore, it seems that both disintegrin and the cysteine-rich domains have important and probably cooperative roles in protein interaction and cell adhesion.

In this work we demonstrated that ADAM9D is able to inhibit the matrigel invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. In a model proposed by Mazzocca et al. [18], a form called ADAM9-S, composed by a prodomain, metallopeptidase, disintegrin and cysteine-rich domains, localized in a proteolytically active form proximal to the cell surface of invasive cells would regulate cell motility, facilitating invasion. On the other hand, according to our results, the isolated disintegrin domain is blocking MDA-MB-231 breast tumor cell invasion through matrigel and this result is in agreement with in-flow assays. It is important to mention that ADAM9-S is composed by other domains besides the disintegrin domain [18], and the presence of these additional domains probably also contributes to invasion.

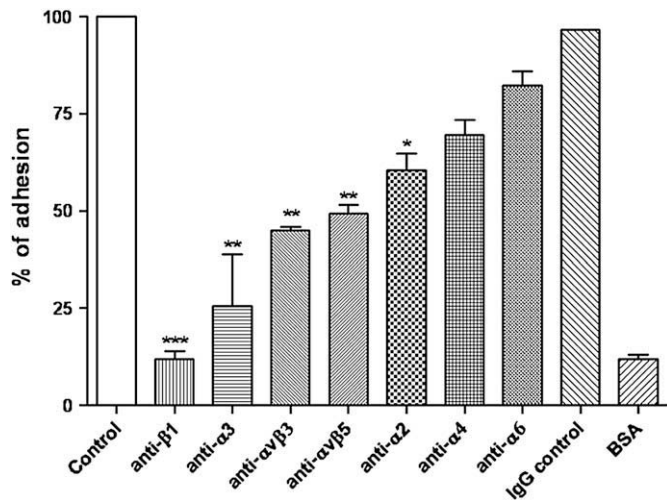


Fig. 5. ADAM9D binds to MDA-MB-231 tumor breast cells by $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ and $\alpha 2$ integrins. Ninety six well plates were coated with ADAM9D (10 $\mu\text{g/ml}$) overnight at 4 °C. After blocking with 1% BSA, the CFDA-labeled MDA-MB-231 cells (1×10^5 cells/well) previously incubated (30 min, 37 °C) or not (control bar) with different antibodies (20 $\mu\text{g/well}$) were added to each well. The plates were incubated at 37 °C for 30 min, washed, lysed and read as in Fig. 2. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. The results were normalized by the ADAM9D (control) values which were considered as 100% adhesion. The p value was determined using the Dunnett's test comparing antibodies bars with the control bar (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Metastasis to different organs involves dissemination of tumor cells via the bloodstream [1]. This process depends on tumor cell intravasation, adhesion to the vessel wall, extravasation, infiltration, and proliferation into target tissue. Integrin $\alpha V\beta 3$ has been implicated in the pathophysiology of malignant tumors. It plays

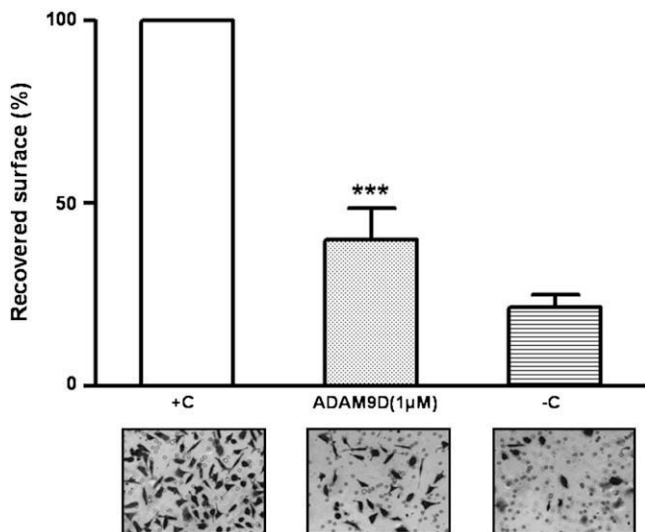


Fig. 6. ADAM9D inhibits matrigel invasion of MDA-MB-231 breast tumor cells. MDA-MB-231 breast tumor cells (5×10^4 cells/ml) were resuspended in DMEM and added to the upper compartments of BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences) before incubation for 30 min with ADAM9D (1 μM) in DMEM. For the controls, the lower well was filled with 750 μl medium with (+C) or without (-C) 10% FBS. Cells were allowed to invade for 22 h at 37 °C and 5% CO_2 . Non-invading cells were scraped from the upper surface of the membrane and the cells on the lower side were fixed and stained. Twenty images covering the membrane were taken under microscope and the recovered surface of inserts was calculated using the software Image J. Representative images from the controls and ADAM9D inserts are shown. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. The p value was determined using the Dunnett's test comparing ADAM9D bars with the positive control bar (***) $p < 0.001$.

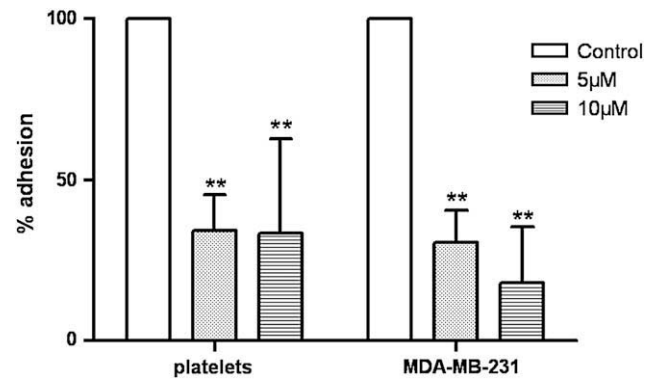


Fig. 7. ADAM9D inhibits the adhesion of MDA-MB-231 breast tumor cells and activated platelets to collagen type I under dynamic flow conditions. Cell tracker red-labeled MDA-MB-231 cells were incubated (20 min) with ADAM9D (5 or 10 μM) or PBS (control bar) and then mixed with whole blood diluted in calcein green-labeled PRP. MDA-MB-231 cells and PRP mixture were perfused (1500 s^{-1}) in a perfusion chamber for 10 min on a collagen type I-coated coverslip. The images of recovered area from adhered platelets and tumor cells in twenty random fields were captured and differentially counted using the software Image J. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. The p value was determined using the Dunnett's test comparing ADAM9D bars with the positive control bar (** $p < 0.01$).

a role on endothelial cells, where it is required for tumor angiogenesis. In breast cancer, $\alpha V\beta 3$ characterizes the metastatic phenotype, as this integrin is up regulated in invasive tumors and distant metastases. In the bloodstream, $\alpha V\beta 3$ integrin supports tumor cell interaction with adherent platelets and leukocytes [1]. However, to mediate this interaction, $\alpha V\beta 3$ integrin must be activated. In breast cancer cells, the integrin $\alpha V\beta 3$ can exist in activated or non-activated forms. Furthermore, expression of activated $\alpha V\beta 3$ integrins on the surface of cancer cells is associated with a highly aggressive metastatic phenotype [1]. Thus, expression of $\alpha V\beta 3$ on circulating tumor cells in a constitutively activated form, or in a state that allows rapid activation under blood flow dynamic conditions, provides an advantage for successful metastasis [29].

The shear stress generated by the dynamic blood flow conditions in the bloodstream affects the characteristics of cell adhesion receptors [2,3]. Under flow conditions, the adhesive properties of cells are markedly different from those that mediate cell attachment under static conditions. Arrest during blood flow can be supported by tumor cell interaction with attached, activated platelets [4]. Platelets are also implicated in tumor progression by facilitating metastasis formation and enhancing tumor cell adhesion to the subendothelial matrix under blood flow conditions [29]. Furthermore, platelets have been shown to promote tumor cell adhesion to ECM under flow [30]. The mechanisms through which platelets and melanoma cells interact are still unknown, but some hypotheses have been created. Some works demonstrate that platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and melanoma cell integrin $\alpha V\beta 3$ interact via divalent or multivalent RGD-containing plasma proteins, such as fibrinogen, von Willebrand factor, fibronectin, or thrombospondin [31]. However, the results of aggregation studies using ADP suggest that ADAM9D does not antagonize $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin. Since ADAM9D has no effects on collagen-induced platelet aggregation, we hypothesize that this protein, by binding to MDA-MB-231 cells, would inhibit the platelet/cancer cell conjugates recruitment. This hypothesis would explain the discrepant results between in-flow platelet adhesion to collagen inhibited by ADAM9D, and collagen-induced platelet aggregation, not inhibited by ADAM9D.

Regarding the effects on the inhibition of tumor cell invasion and platelet and tumor cell adhesion under dynamic flow conditions, ADAM9D can be a candidate as a model for the design of

selective inhibitors against the adhesion and extravasation of cancer cells. Anti-adhesion therapy is a promising therapeutic concept in oncology [32] and many pharmacological and toxicological studies indicate that antagonists of different integrins, such as disintegrins, RGD peptides, small molecules, and blocking antibodies are well tolerated in different animal species, suggesting that these molecules may be potentially effective and safe for therapeutic purposes [33]. However, the secondary effects of targeting ADAM9D in tumor breast cancer remains to be identified.

In conclusion, we have demonstrated that ADAM9D is able to inhibit tumor and platelet cell adhesion under flow to simulate *in vivo* conditions. Our results suggest a role for the disintegrin domain of ADAM9 in the metastatic process. In addition, ADAM9D can be used as a tool for investigating the role of ADAMs in metastasis and cancer progression.

Acknowledgements

M.R. Cominetti, A.C.B.M. Martin and J.U. Ribeiro were the recipients of fellowships and research grants provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil). This work was supported by travel grants provided in cooperation by INSERM and the Brazilian government (CNPq-INSERM and FAPESP-INSERM collaborations).

References

- [1] B. Felding-Habermann, T.E. O'Toole, J.W. Smith, E. Fransvea, Z.M. Ruggeri, M.H. Ginsberg, P.E. Hughes, N. Pampori, S.J. Shattil, A. Saven, B.M. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 1853–1858.
- [2] A.B. Al-Mehdi, K. Tozawa, A.B. Fisher, L. Shientag, A. Lee, R.J. Muschel, *Nat. Med.* 6 (2000) 100–102.
- [3] C.W. Wong, A. Lee, L. Shientag, J. Yu, Y. Dong, G. Kao, A.B. Al-Mehdi, E.J. Bernhard, R.J. Muschel, *Cancer Res.* 61 (2001) 333–338.
- [4] J. Pilch, R. Habermann, B. Felding-Habermann, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21930–21938.
- [5] M.J. Humphries, M.A. Travis, K. Clark, A.P. Mould, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 822–825.
- [6] A.L. Stone, M. Kroeger, Q.X. Sang, J. Protein Chem. 18 (1999) 447–465.
- [7] J. Kratzschmar, L. Lum, C.P. Blobel, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4593–4596.
- [8] C.P. Blobel, *Cell* 90 (1997) 589–592.
- [9] D.F. Seals, S.A. Courtneidge, *Genes Dev.* 17 (2003) 7–30.
- [10] J.M. White, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 598–606.
- [11] C.P. Blobel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 32–43.
- [12] L.G. Jia, K. Shimokawa, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, *Toxicol.* 34 (1996) 1269–1276.
- [13] D. Nath, P.M. Slocombe, P.E. Stephens, A. Warn, G.R. Hutchinson, K.M. Yamada, A.J. Docherty, G. Murphy, *J. Cell Sci.* 112 (Pt 4) (1999) 579–587.
- [14] K. Reiss, A. Ludwig, P. Saftig, *Pharmacol. Ther.* 111 (2006) 985–1006.
- [15] X.P. Zhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7345–7350.
- [16] D. Nath, P.M. Slocombe, A. Webster, P.E. Stephens, A.J. Docherty, G. Murphy, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 12) (2000) 2319–2328.
- [17] A. Karadag, M. Zhou, P.I. Croucher, *Blood* 107 (2006) 3271–3278.
- [18] A. Mazzocca, R. Coppari, R. De Franco, J.Y. Cho, T.A. Libermann, M. Pinzani, A. Toker, *Cancer Res.* 65 (2005) 4728–4738.
- [19] P. Zigrino, J. Steiger, J.W. Fox, S. Loffek, A. Schild, R. Nischt, C. Mauch, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 30785–30793.
- [20] J.M. Gutierrez, A. Rucavado, T. Escalante, C. Diaz, *Toxicol.* 45 (2005) 997–1011.
- [21] M. Zhou, R. Graham, G. Russell, P.I. Croucher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 574–580.
- [22] M.R. Cominetti, C.H. Terruggi, O.H. Ramos, J.W. Fox, A. Mariano-Oliveira, M.S. De Freitas, C.C. Figueiredo, V. Morandi, H.S. Selistre-de-Araujo, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18247–18255.
- [23] N. Gomes, C. Legrand, F. Fauvel-Lafeve, *Clin. Exp. Metastasis* 22 (2005) 215–223.
- [24] B. Leitinger, E. Hohenester, *Mammalian collagen receptors, Matrix Biol.* 26 (2007) 146–155.
- [25] A.I. Roberts, R.E. Brolin, E.C. Ebert, *Immunology* 97 (1999) 679–685.
- [26] K. Herzhoff, S. Sollberg, C. Huerkamp, T. Krieg, B. Eckes, *Br. J. Dermatol.* 141 (1999) 218–223.
- [27] N.J. Tawil, M. Houde, R. Blacher, F. Esch, L.F. Reichardt, D.C. Turner, S. Carbonetto, *Biochemistry* 29 (1990) 6540–6544.
- [28] R.M. Mahimkar, O. Visaya, A.S. Pollock, D.H. Lovett, *Biochem. J.* 385 (2005) 461–468.
- [29] R. Dardik, Y. Kaufmann, N. Savion, N. Rosenberg, B. Shenkman, D. Varon, *Int. J. Cancer* 70 (1997) 201–207.
- [30] E. Bastida, L. Almirall, A. Ordinas, *Thromb. Haemost.* 61 (1989) 485–489.
- [31] B. Felding-Habermann, R. Habermann, E. Saldivar, Z.M. Ruggeri, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5892–5900.
- [32] R. Schmidmaier, P. Baumann, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 978–990.
- [33] S. Huvenneers, H. Truong, H.J. Danen, *Int. J. Radiat. Biol.* 83 (2007) 743–751.

Review

Snake Venom Disintegrins and Cell Migration

Heloisa S. Selistre-de-Araujo *, Carmen L. S. Pontes, Cyntia F. Montenegro and Ana Carolina B. M. Martin

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil; E-Mails: carmenpontes@yahoo.com.br (C.L.S.P.); cyntia_montenegro@hotmail.com (C.F.M.); carol_gau@yahoo.com.br (A.C.B.M.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hсараужо@ufscar.br; Tel.: +55-1633518333; Fax: +55-1633518401.

Received: 24 August 2010; in revised form: 15 October 2010 / Accepted: 18 October 2010 / Published: 29 October 2010

Abstract: Cell migration is a key process for the defense of pluricellular organisms against pathogens, and it involves a set of surface receptors acting in an ordered fashion to contribute directionality to the movement. Among these receptors are the integrins, which connect the cell cytoskeleton to the extracellular matrix components, thus playing a central role in cell migration. Integrin clustering at focal adhesions drives actin polymerization along the cell leading edge, resulting in polarity of cell movement. Therefore, small integrin-binding proteins such as the snake venom disintegrins that inhibit integrin-mediated cell adhesion are expected to inhibit cell migration. Here we review the current knowledge on disintegrin and disintegrin-like protein effects on cell migration and their potential use as pharmacological tools in anti-inflammatory therapy as well as in inhibition of metastatic invasion.

Keywords: cell migration; disintegrin; snake venom; ADAM; $\alpha_v\beta_3$ integrin

1. Introduction

Metastasis is one the major causes of death in patients with cancer. In order for a tumor to grow and metastasize, both tumor and endothelial cells must migrate and invade surrounding tissues [1,2]. Endothelial cell migration provides the blood supply that is essential to tumor cells. Once in the blood

vessels, tumor cells must adhere to the endothelium and escape to a new site [3], two processes that depend on their invasive abilities. Therefore, the blockage of both tumor and endothelial cell migration and invasion is an interesting approach for the treatment of cancer patients. The key receptors involved in cell migration are the integrins, which connect the cells to the extracellular matrix of the tumor microenvironment. Integrin blocking usually results in inhibition of cell migration and tumor angiogenesis [4]. Here we review the effects of disintegrins, a group of integrin-binding proteins found in snake venoms, in the cell adhesion process and their application in anti-cancer and anti-metastatic therapy. The effects of disintegrin on neutrophil migration will also be briefly described for a better illustration of the role of these proteins in cell migration.

2. Integrins and Cell Migration

Integrins are cell surface receptors that play critical roles in cell adhesion and migration. These proteins are heterodimers of transmembrane α - and β -subunits that connect the extracellular matrix (ECM) to the cell cytoskeleton. Cell binding by integrins to their cognate extracellular ligands, such as collagen, laminin and fibronectin, triggers intracellular signaling pathways that control cytoskeleton organization, cell polarity and force generation [5]. Integrin clustering at focal complexes drives actin polymerization along the leading edge of migrating cells, contributing to changes in cell shape and polarity [6]. Integrins are also involved in the regulation of matrix-degrading proteases, a key step for the invasive phenotype. There are several excellent reviews on the role of integrins in cell migration and invasion [6–8], and therefore, this subject will not be addressed in the present review. Furthermore, several studies have described the correlation between a malignant phenotype and an altered integrin distribution on tumor cell surfaces [9]. The role of integrins in metastatic dissemination is also very well documented [10,11], and is beyond the scope of this review.

3. Angiogenesis

The term angiogenesis usually defines the growth of sprouts from capillary blood vessels that depends on a delicate balance between pro- and anti-angiogenic factors. In mammals, physiological angiogenesis is restricted to specific situations, including growth, tissue regeneration and reproduction. In contrast, some angiogenesis-dependent diseases, such as tumor growth, age-related macular degeneration and atherosclerosis, have been described [12].

Angiogenesis is primarily driven by tissue hypoxia that upregulates hypoxic factor-1 (HF-1) expression [7,13], which in turn induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression, a potent mitogen for endothelial cells [7,14]. Briefly, the angiogenic cascade includes degradation of basement membrane (BM) by matrix metalloproteases (MMPs) expressed by endothelial cells (EC), EC proliferation and tube formation, synthesis of a new BM, tube stabilization by pericytes and vascular smooth muscle cells and maturation into capillaries [15]. In addition, extracellular matrix degradation by MMPs plays a key role in the control of angiogenesis either by releasing VEGF from the ECM and facilitating EC migration, or by releasing angiogenesis inhibitors from larger extracellular matrix components such as endostatin from collagen XVIII [16,17], and angiostatin from plasminogen [15,18]. Angiogenesis is also influenced by integrins expressed on endothelial cells, vascular smooth muscle cells, fibroblasts, and platelets. These cells process signals from their

microenvironment and respond by altering their cell-cell and cell-matrix adhesion, which allows migration and vascular remodeling over a period of days to weeks [19].

On the other hand, tumor angiogenesis is not particularly effective. Tumor vessels are structurally and biologically different with leaky characteristics that facilitate tumor cell dissemination by blood or lymphatic vessels [4,20]. Unlike in quiescent EC, the $\alpha_v\beta_3$ integrin is highly expressed by tumor EC, which helps the binding of new ECs to the provisional matrix components, including vitronectin and fibronectin that are deposited in the tumor microenvironment [4]. Accordingly, small integrin binding proteins have been tested for their ability to inhibit tumor angiogenesis. We will review the work that has been done with snake venom disintegrins in this field.

4. Disintegrins from Snake Venoms

Snake venom disintegrins are mostly derived from proteolytically processed precursor forms having a metalloprotease domain, named the snake venom metalloproteases (SVMPs). Members of this protein family have been classified according to their multi-domain structure into P-I, P-II and P-III classes [21]. Members of the P-I class are formed by a metalloprotease domain only while P-II proteins have a metalloproteinase and a disintegrin domain. P-III proteins have an additional cysteine-rich domain following the disintegrin region and in some cases, a lectin domain [22]. These last two classes (P-II and P-III) can be subdivided further according to the proteolytic processing of their domains and their ability to form dimeric structures [23]. Based on this classification, processed RGD-disintegrins are derived from the P-IIa class, while homo- and heterodimeric disintegrins are released in general from SVMPs belonging to the P-IIc and P-IIe classes, respectively. P-III SVMPs originate the disintegrin-like proteins (DC, for Disintegrin, Cys-rich proteins) formed by covalently linked-disintegrin-like and Cys-rich domains [21]. By means of phylogenetic analysis, Calvete *et al.* [24] provided strong evidence that the diversity of disintegrins could be due to an accelerated evolution of surface-exposed residues with the inference that the RGD motif is the ancestral integrin-recognition motif from which other disintegrins have emerged via single-base substitutions to generate KGD-, MGD-, WGD-, and VGD-integrin binding motifs as well as others. The diversity of the integrin-binding loop, along with other conserved residues among disintegrin molecules, gives rise to different integrin specificities (Table 1). However, disintegrin structural complexity does not derive only from venom genomic structure and transcriptional regulation events but also from post-translational modifications that could be responsible for dimerization and disulfide bonding as previously suggested [21].

DC proteins are usually found in a processed form in snake venoms without the catalytic domain but they are not further separated into independent proteins due to a disulfide bond that connects both domains. The active RGD loop of P-II-derived disintegrins is modified into a cysteine-contained loop (D/ECD) in the DC proteins [25]. It has been recently suggested that distinct disulfide pairing strongly contributes to the conformation of the D domain, which could consequently influence the binding properties and specificities of DC proteins [26]. Depending on the disulfide pairing, the D domain may assume at least two types of conformation, a C-shaped or an I-shaped scaffold; the former was suggested to play a key role in substrate recognition by the catalytic domain [27]. The D domain also has adhesive properties to some proteins such as collagen I, as recently demonstrated.

Integrin binding ability is apparently more related to the Cys-rich domain [28,29] which was also shown to bind von Willebrand factor therefore helping substrate targeting for proteolysis by the metalloprotease domain [30]. In addition, the hyper-variable region (HVR), considered the major structurally distinct region among the P-III SVMPs and suggested to play a key role in target selection due to its protein-protein adhesive properties, is located in the Cys-rich domain [29]. The importance of HVR was recently evidenced for two elapidic SVMPs from *Naja atra* venom. Atragin, a SVMP with a C-shaped D domain, but not its homolog K-like, which has an I-shaped scaffold, inhibits the migration of both mouse fibroblasts and Chinese hamster ovary CHOK1 cells [26]. Synthetic peptides from the HVR of both atragin and K-like proteins showed similar results, since only the peptide from atragin HVR inhibited cell migration toward fibronectin [26].

Disintegrins and DC proteins are rich in Cys residues, which are mainly involved in disulfide bonds, resulting in proteolysis-resistant molecules. This is a crucial feature for a sustained half-life in the blood. DisBa-01, a recombinant disintegrin from *Bothrops alternatus* venom, could be detected up to 6 h hours after i.p. injection in mice [31]. Despite the high content of disulfide bonds, RGD-disintegrins can be produced in an active form in bacteria [32,33], thus allowing the production of large quantities as needed for *in vivo* tests. Recombinant DC proteins are more difficult to express in an active form in bacteria. However, the production of Cys-rich domains from P-III SVMPs in active form has been reported [29].

5. Effects of Disintegrins on Leukocyte Migration

Neutrophils can be recruited from blood circulation toward sites of inflammation due to signals from injured tissues. To reach these sites, neutrophils must express new receptors, including some integrins, on their cell surface that will allow their adhesion to the endothelium and subsequent migration into tissues [34]. In addition to several constitutively expressed integrins such as $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_V\beta_3$ and $\alpha_9\beta_1$, these cells express α_2 -, α_3 -, α_4 -, and $\alpha_5\beta_1$ integrins upon activation [35,36], triggering integrin-signaling pathways that mediate actin polymerization, cytoskeletal organization, spreading and migration [37]. Accordingly, disintegrins were first tested as integrin inhibitors of neutrophil migration as potential anti-inflammatory candidates. However, the results showed that integrin-binding by disintegrins could also activate neutrophils and protect these cells from apoptosis [38,39], demonstrating the complexity of disintegrin effects.

Coelho *et al.* [38] first demonstrated the dual effect of the monomeric RGD-disintegrin jarastatin (JT), from *Bothrops jararaca* venom, on neutrophil chemotaxis. Jarastatin inhibited neutrophil migration toward fMLP, IL-8 and jarastatin itself in a concentration-dependent manner. However, JT also induced neutrophil chemotaxis when used as chemoattractant [38]. In addition, it was demonstrated that this disintegrin induced several downstream integrin-mediated signaling events such as actin polymerization, activation of focal adhesion kinase (FAK) and extracellular-regulated kinase-2 (erk-2) nuclear translocation, which resulted in a delay of spontaneous neutrophil apoptosis [40]. JT also inhibited neutrophil migration *in vivo* after intraperitoneal carrageenan injection [38]. Ocellatusin, an RGD-disintegrin from *Echis ocellatus* venom, also strongly induces neutrophil chemotaxis [41]. Later, the same group demonstrated that EC3, a heterodimeric MLD-disintegrin from *Echis carinatus* venom, also inhibited neutrophil chemotaxis and activated FAK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K);

however, in contrast to JT, EC3 inhibited Erk-2 translocation and had a pro-apoptotic effect [39]. Antibody competition assays showed that JT and EC3 effects are mediated by different neutrophil integrins. JT binds preferentially to $\alpha_M\beta_2$ while EC3 is a ligand for $\alpha_9\beta_1$ in neutrophils [39,42]. In contrast, it has been recently shown that activation of $\alpha_9\beta_1$ integrin by VLO5, a dimeric disintegrin from *Vipera lebetina obtusa* venom [43], inhibits neutrophil spontaneous apoptosis by up-regulating the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-x_L and by increasing the degradation of pro-apoptotic protein Bad [36]. The two dimeric disintegrins EC3 and VLO5 are an interesting example of how subtle the structural differences that lead to distinct biological effects can be. Both disintegrins are very similar and have the VGD motif on the A-subunit while the B-subunit has a single amino acid replacement N-terminally to the MLD adhesive motif. This MLD motif has been suggested to be responsible for the different binding specificities and biological effects. An alanine residue in EC3 (AMLD) is replaced in VLO5 by a threonine residue (TMLD), which could result in distinct affinities and effects, despite their binding to the same integrin receptor [36].

RGD-disintegrins were also demonstrated to activate human T lymphocytes via integrin signaling [44]. Flavoridin, from *Trimeresurus flavoviridis*, kistrin, from *Agkistrodon rhodostoma*, and echistatin, from *Echis carinatus* venoms, which all bind to $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, induced T cell proliferation and CD69 expression in parallel with FAK and PI3K activation and NF- κ B nuclear translocation [44].

Alternagin-C (ALT-C), an ECD-containing disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* venom induced neutrophil effects similar to those of JT [45]. It inhibited neutrophil migration in a concentration-dependent fashion despite being itself chemotactic to this cell type. ALT-C also induced significant cytoskeleton dynamic changes with polymerization of F-actin, FAK and PI3K activation, and erk-2 translocation as well. These effects were reproduced by an ECD-containing peptide derived from the ALT-C primary sequence [45,46]. Interestingly, ALT-C was demonstrated to be an inhibitor of $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion to collagen I. Jararhagin-C, the released DC domain from the SVMP jararhagin isolated from *Bothrops jararaca* venom, also induced *in vivo* leukocyte rolling after topical application on murine cremaster muscle. These observations together confirm the key role for the $\alpha_2\beta_1$ integrin in neutrophil migration [47].

The complexity of the DC proteins was further demonstrated by the work of Menezes and co-authors, showing that the recombinant Cys-rich domain of HF3 metalloprotease from *Bothrops jararaca* venom is able to activate leukocyte rolling in the microcirculation [29]. This protein was expressed in bacteria without the disintegrin-like domain thus providing convincing evidence of that DC proteins activity resides on the Cys-rich region. In addition, synthetic peptides derived from the HVR region of the Cys-rich domain of HF3 reproduced the same effect, which was also inhibited by anti- $\alpha_M\beta_2$ antibodies, confirming the integrin-mediated activity of the C domain in leukocytes.

6. Effects of Disintegrins on Endothelial Cell Migration and Angiogenesis

Triflavin from *Trimeresurus flavoviridis* venom was one of the first RGD-disintegrins shown to inhibit angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* [48]. Triflavin (0.4 μ M) strongly inhibited EC migration toward vitronectin and fibronectin nearly thirty orders of magnitude greater than the anti- $\alpha_v\beta_3$ monoclonal antibodies [48]. Triflavin was also more effective in inhibiting TNF- α -induced angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay. Similar results were obtained

with another RGD-disintegrin, rhodostomin, from *Agkistrodon rhodostoma* venom, which inhibits endothelial cell migration, invasion and tube formation evoked by bFGF in matrigel both *in vitro* and *in vivo* [49]. Rhodostomin effects were inhibited by anti- $\alpha_v\beta_3$ but not by anti- $\alpha_v\beta_5$ antibodies, thus supporting the hypothesis that the effects of RGD-disintegrins are mediated by blockade of the vitronectin receptor.

Native or recombinant contortrostatin (CN), a homodimeric RGD-disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom, is another example of anti-angiogenic disintegrin as demonstrated by several *in vitro* and *in vivo* models [50–52]. Liposomal delivery of CN has proven to be effective as an anti-angiogenic and anti-tumor agent in human ovarian and breast cancer animal models [52]. Similar results were obtained with vicrostatin, a quimeric recombinant CN variant, which was also demonstrated to induce apoptosis in tubulogenic HUVEC seeded between two matrigel layers [53]. A monomeric recombinant RGD-disintegrin from *Bothrops alternatus* venom, DisBa-01, produces similar effects in the matrigel plug model in nude mice [33]. In addition to inhibition of EC migration, saxatilin, an RGD disintegrin from *Gloydus saxatilis* also inhibited the migration of vitronectin-induced smooth muscle cells [54,55].

However, the complexity of disintegrin specificity and the process of migration do not allow for the conclusion that blocking the vitronectin receptor is sufficient for inhibiting cell migration. Echistatin, but not eristostatin (two short RGD-disintegrins), inhibits *in vivo* angiogenesis in the CAM assay [56]. There are at least three KTS-disintegrins that inhibit $\alpha_1\beta_1$ integrin binding to its cognate ligands, collagen I and IV (Table 1) [57,58], and also inhibit EC migration toward these substrates [59]. Lebestatin is an example of a KTS-disintegrin isolated from *Macrovipera lebetina* that inhibits EC migration and VEGF-induced *in vivo* angiogenesis [59]. The presence of a WGD motif in CC8, a heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus*, increases its inhibitory effect on $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins [60].

There are few reports regarding the effects of ECD-disintegrins on endothelial cell migration. Acurhagin-C, an ECD-disintegrin-like protein from *Agkistrodon acutus* venom, dose-dependently blocked HUVEC migration toward a vitronectin-coated membrane. Furthermore, acurhagin-C elicited endothelial anoikis via disruption of the $\alpha_v\beta_3$ /FAK/PI3K survival cascade and subsequent initiation of the procaspase-3 apoptotic signaling pathway [61]. Similarly, ALT-C also inhibits EC migration both *in vitro* and *in vivo* [62,63].

7. Effects of Disintegrins on Tumor Cell Migration

The ability of most snake venom disintegrins to inhibit cell adhesion has stimulated scientists to study these proteins as inhibitors of tumor cell dissemination. A volume of papers dealing with this subject can be found in the literature, most on RGD-disintegrin effects (Table 1). Morris *et al.* [64], were one of the first investigators to test eristostatin, an RGD-disintegrin from *Eristocophis macmahoni*, on individual metastasis steps such as cell arrest, extravasation and migration. Eristostatin treatment did not prevent tumor cell extravasation or migration [55]. However, it was shown later that eristostatin inhibited melanoma cell motility, an effect mediated by fibronectin-binding integrins [56]. Interestingly, this disintegrin, contrary to other RGD-disintegrins, did not inhibit angiogenesis, as stated before [56].

DisBa-01, an $\alpha_v\beta_3$ integrin-blocking RGD-disintegrin, inhibits not only endothelial cell *in vivo* migration [33] but also the *in vitro* migratory ability of fibroblasts and two tumor cell lines in a concentration-dependent fashion (Figure 1A). These three cell lines were compared in terms of integrin content by flow cytometry. Interestingly, the content of $\alpha_v\beta_3$ is relatively low in these three cell lines compared to the amount of $\alpha_2\beta_1$. Among the tested cell lines, human fibroblasts are the most sensitive to DisBa-01 and, coincidentally, also have the highest content of $\alpha_v\beta_3$ integrin (Figure 1B). However, a change in receptor density after disintegrin treatment is a possibility that cannot be excluded.

Figure 1. A (top) Effects of Disba-01 on the migration of three different cell lines. The cells were plated on the migration inserts in the presence of increasing concentrations of DisBa-01 for 22 h. Migration was expressed as a percentage of the control (100%). Cells were counted with a microscope (ten random fields per experiment). Results represents mean \pm standard error of three individual experiments, *** $p < 0.0001$. **B** (bottom) Integrin profile of the cells tested in the migration assay using DisBa-01. Fibroblasts (FH) express $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, α_6 , and β_1 . MDA-MB-231 breast tumor cells express $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, α_6 , α_2 , and β_1 . DU-145 prostate tumor cells express more $\alpha_v\beta_5$, α_6 , α_2 , β_1 , and less $\alpha_v\beta_3$ and α_4 . The presence of integrin receptors on the cell surface was determined by flow cytometry with FITC-anti- $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, α_6 , α_4 , α_2 , β_1 and α_v subunit integrin antibodies.

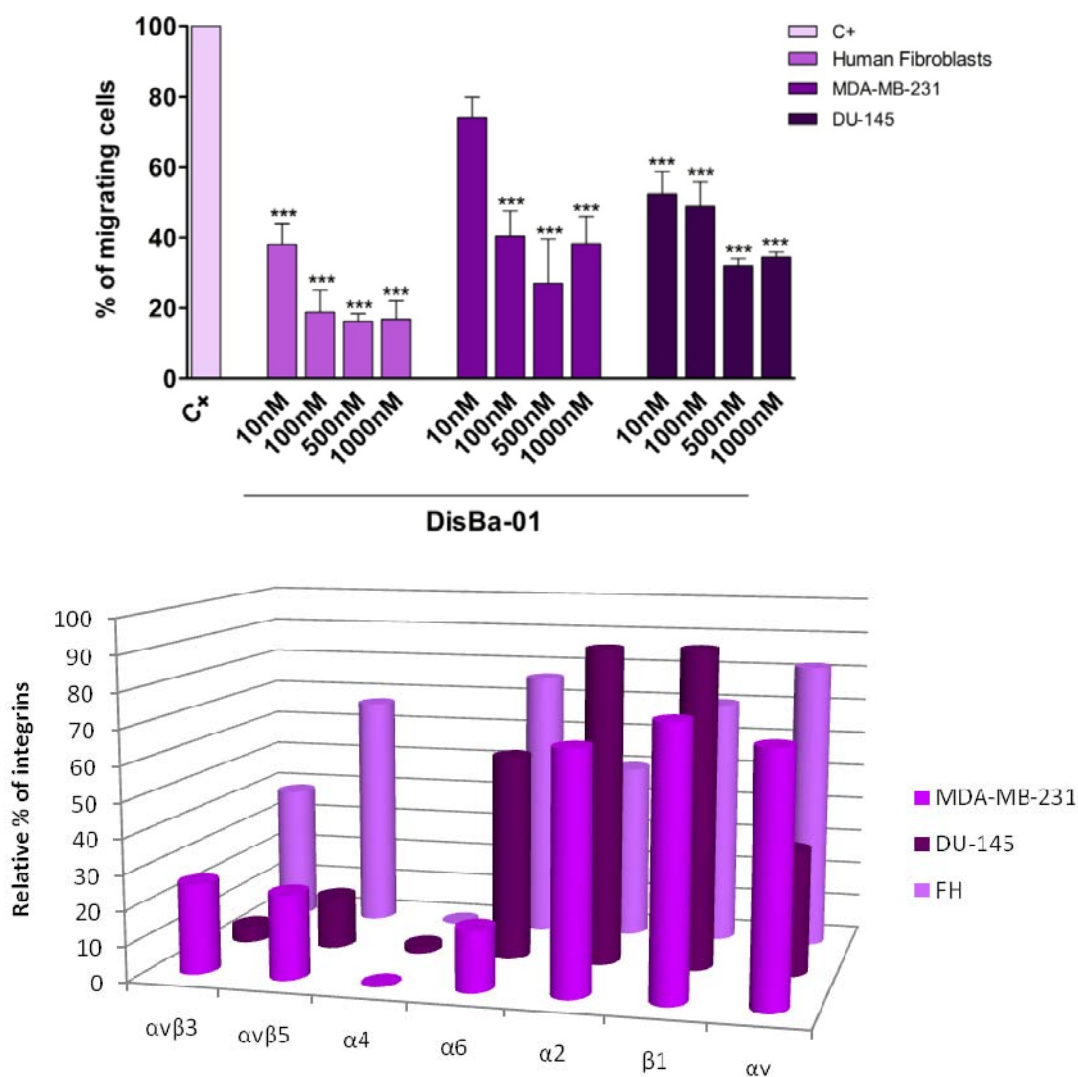


Table 1 summarizes the effects of several disintegrins and DC proteins on tumor-related cell migration in different systems and the range of tested concentrations. The diversity of *in vitro* and *in vivo* assays makes a quantitative comparison difficult. Most tested proteins are effective in a micromolar range for *in vivo* assays while nanomolar concentrations are used in *in vitro* tests. From the data in the literature, it seems that disintegrins are general inhibitors of cell migration and invasion, despite being unspecific ligands, such as the RGD-disintegrins, or integrin-specific binding proteins, such as the KTS-disintegrins (Table 1). The disintegrin-like, Cys-rich proteins may also be included as integrin blockers of cell migration. Since integrin receptors are also quite indiscriminate as they support cell adhesion to several substrates, it seems highly reasonable that the general RGD-disintegrin scaffold of the integrin-binding motif could be employed as a prototype for drug design for new anti-metastatic therapies via blocking both tumor cell adhesion and tumor angiogenesis. In fact, at least two antagonists of platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ fibrinogen receptor that are currently being used in anticoagulant therapy (eptifibatide and aggrastat) were based on a snake venom disintegrin structure.

Table 1. Structural determinants, preferential integrin and the effects of disintegrins and disintegrin-like proteins on migration-dependent tumor cell activities.

Disintegrin	Structure	Adhesive motif	Preferred integrin	Cognate ligand	Relevant inhibitory activity (conc.*)	Ref.
salmosin 2	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (5 μg)	[65]
saxatilin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis (100 nM)	[54]
jarastatin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_M\beta_2$	Vn, Fn, ICAM-1	melanoma lung metastasis ** (1 μM)	[66]
flavoridin	monomeric medium	RGD	$\alpha_5\beta_1$	Fn	melanoma lung metastasis ** (1 μM)	[66]
kistrin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma lung metastasis ** (1 μM)	[66]
colombistatin	monomeric medium	RGD	nd	Fn	tumor cell migration (IC50 = 1.8 μM)	[67]
trigramin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	bone metastasis ** (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	[68]
DisBa-01	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma metastasis ** (2 mg/Kg)	[33]
eristostatin	monomeric short	RGD	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fg	melanoma metastasis (25 μg)	[69]
echistatin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	osteoclast migration (10 nM)	[70]
triflavin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (0.1–0.4 μM)	[48]
contortrostatin	Homodimeric	RGD	$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$	Fn	tumor angiogenesis ** (60 $\mu\text{g}/\text{day}$)	[71]
alternagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_2\beta_1$	collagen I	angiogenesis ** (1 μM)	[63]
leberagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_6$	Vn, Fn	melanoma cell adhesion (100 nM)	[72]
acurhagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (0.4 μM)	[61]
VLO5	heterodimeric	VGD, MLD	$\alpha_9\beta_1$	TN, VCAM	glioblastoma growth (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	[73]
obtustatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis ** (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	[74]
viperistatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	melanoma cell transmigration (1–4 μM)	[75]
lebestatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis ** (0.1–0.5 $\mu\text{g}/\text{embryo}$)	[59]

Legend: Vn, vitronectin; Fn, fibronectin; Fg, fibrinogen; TN, tenascin; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule-1; VCAM, vascular cell adhesion molecule. * Effective inhibitory concentration; ** *in vivo* assays.

It has been suggested that the adhesive properties of the disintegrin-like, Cys-rich proteins could be primarily due to the Cys-rich domain, which was demonstrated to bind vWF [30,76]. Interestingly, half of integrin α subunits possess a von Willebrand factor A domain (also called I domain), which is in close proximity to the ligand-binding site [77]. Therefore, it is possible that the DC proteins could bind

to the integrins presenting this domain, thus increasing specificity. However, this possibility remains to be demonstrated.

8. ADAMs and Cell Migration

Studies of the snake venom disintegrin effects on cell migration were conducted in parallel with those on mammalian ADAMs. The ADAM (*A Disintegrin And Metallopeptidase*) family of proteins comprises a snake venom-homolog group of multidomain proteins that play important roles in many biological processes, including cell migration, development and fertilization [78–82]. Structurally, the ADAM disintegrin and Cys-rich domains are more related to the DC proteins from SVMPs than the RGD-disintegrins. The disintegrin and Cys-rich domains of ADAM9 were shown to increase keratinocyte migration and MMP-9 activity in a wound healing *in vitro* model, an effect mediated by $\beta 1$ integrin receptors [83]. More recently, it was reported that knockout animals for ADAM9 showed accelerated wound repair compared to controls, due apparently to the increased migration of keratinocytes [84]. Interestingly, ADAM15, the unique RGD-disintegrin among the ADAMs, suppressed CHO cell motility by inducing integrin $\alpha_5\beta_1$ expression on the cell surface, thereby enhancing cell adhesion [85]. Additionally, it was demonstrated that the recombinant disintegrin domain of ADAM15 completely inhibited endothelial cell migration and tube formation in a three-dimensional fibrin gel [86]. More recently, the recombinant disintegrin domain of ADAM9 was demonstrated to strongly inhibit MDA-MB-231 breast tumor cell invasion on matrigel *in vitro* [87], thus suggesting a key role for this domain in the process of tumor cell invasion. Moreover, ADAM9 silencing completely inhibited breast tumor cell *in vitro* invasion on matrigel [88]. Recently, it was demonstrated that *in vivo* gene silencing of ADAM9 reduced tumor metastasis [89]. These studies and others in the field with different ADAMs [90–92], reinforce the importance of integrins as critical targets for drug design, as well as the potential of disintegrins as lead pharmaceutical compounds.

9. Concluding Remarks

Cell adhesion and migration are crucial steps for metastasis development, processes in which the integrins are strongly involved. Snake venom disintegrins have been shown to inhibit metastasis by effectively blocking integrin activities. Apparently, the lack of specificity of these molecules seems to be a positive factor in inhibition of cell adhesion. However, tumor cells have demonstrated their ability to overcome FAK-dependent anchorage and the subsequent anoikis by activating parallel routes such as those mediated by Src and p130CAS [4,93]. It would be interesting to determine if disintegrins can also block these pathways in order to inhibit tumor metastasis completely. A search for new molecules that impair other survival mechanisms of tumor cells may be necessary to achieve improved results in anti-metastatic therapy. Also fascinating is the possible ability of disintegrins to interfere with collective cell migration, which differs from the single cell process mainly by the fact that cells remain coupled by cell-cell junctions while moving. This process depends on simultaneous coordination of cell polarization and was demonstrated to be relevant for cancer invasion and metastasis [94–96]. The potential for disintegrins to inhibit collective tumor cell migration remains to be determined.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marcia R. Cominetti and Oscar H. P. Ramos for critically reading the manuscript and the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, SP, Brazil) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

References

1. Barkan, D.; Green, J.E.; Chambers, A.F. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur. J. Canc.* **2010**, *46*, 1181–1188.
2. Fokas, E.; Engenhardt-Cabillic, R.; Daniilidis, K.; Rose, F.; An, H.X. Metastasis: The seed and soil theory gains identity. *Canc. Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 705–715.
3. Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Canc.* **2009**, *9*, 239–252.
4. Desgrosellier, J.S.; Cheresh, D.A. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev.* **2010**, *10*, 9–22.
5. Miranti, C.K.; Brugge, J.S. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 83–90.
6. Ulrich, F.; Heisenberg, C.P. Trafficking and cell migration. *Traffic* **2009**, *10*, 811–818.
7. Geiger, T.R.; Peeper, D.S. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1796*, 293–308.
8. Hood, J.D.; Cheresh, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Canc.* **2002**, *2*, 91–100.
9. Rathinam, R.; Alahari, S.K. Important role of integrins in the cancer biology. *Canc. Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 223–237.
10. Sahai, E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 87–96.
11. Brooks, S.A.; Lomax-Browne, H.J.; Carter, T.M.; Kinch, C.E.; Hall, D.M. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* **2010**, *112*, 3–25.
12. Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273–286.
13. Chen, W.T.; Huang, C.J.; Wu, M.T.; Yang, S.F.; Su, Y.C.; Chai, C.Y. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2005**, *35*, 207–213.
14. Cross, M.J.; Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 201–207.
15. Chung, A.S.; Lee, J.; Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Canc.* **2010**, *10*, 505–514.
16. O'Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W.S.; Flynn, E.; Birkhead, J.R.; Olsen, B.R.; Folkman, J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **1997**, *88*, 277–285.
17. Zetter, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 407–424.

18. Dong, Z.; Kumar, R.; Yang, X.; Fidler, I.J. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **1997**, *88*, 801–810.
19. Francavilla, C.; Maddaluno, L.; Cavallaro, U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 298–309.
20. Turkbey, B.; Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Bernardo, M.; Choyke, P.L. Imaging of tumor angiogenesis: Functional or targeted? *Am. J. Roentgenol.* **2009**, *193*, 304–313.
21. Fox, J.W.; Serrano, S.M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS. J.* **2008**, *275*, 3016–3030.
22. Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. *Meth. Enzymol.* **1995**, *248*, 345–368.
23. Fox, J.W.; Serrano, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* **2005**, *45*, 969–985.
24. Calvete, J.J.; Domont, G.B.; Padron, G. Meeting report MPSA 2007. *J. Proteomics* **2008**, *71*, 4–10.
25. Ramos, O.H.; Selistre-de-Araujo, H.S. Snake venom metalloproteases—Structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *142*, 328–346.
26. Guan, H.H.; Goh, K.S.; Davamani, F.; Wu, P.L.; Huang, Y.W.; Jeyakanthan, J.; Wu, W.G.; Chen, C.J. Structures of two elapid snake venom metalloproteases with distinct activities highlight the disulfide patterns in the D domain of ADAMalysin family proteins. *J. Struct. Biol.* **2010**, *169*, 294–303.
27. Takeda, S.; Igarashi, T.; Mori, H.; Araki, S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo. J.* **2006**, *25*, 2388–2396.
28. Tanjoni, I.; Evangelista, K.; Della-Casa, M.S.; Butera, D.; Magalhaes, G.S.; Baldo, C.; Clissa, P.B.; Fernandes, I.; Eble, J.; Moura-da-Silva, A.M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha2beta1 integrin and collagen. *Toxicon* **2010**, *55*, 1093–1099.
29. Menezes, M.C.; Paes Leme, A.F.; Melo, R.L.; Silva, C.A.; Della Casa, M.; Bruni, F.M.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M.; Camargo, A.C.; Fox, J.W.; Serrano, S.M. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3915–3921.
30. Serrano, S.M.; Kim, J.; Wang, D.; Dragulev, B.; Shannon, J.D.; Mann, H.H.; Veit, G.; Wagener, R.; Koch, M.; Fox, J.W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: Role in substrate targeting. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39746–39756.
31. Normand, P. Peter Mac Callum Cancer Center, Melbourne, VIC. Personal Communication, 2010.
32. Minea, R.; Swenson, S.; Costa, F.; Chen, T.C.; Markland, F.S. Development of a novel recombinant disintegrin, contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2005**, *34*, 177–183.

33. Ramos, O.H.; Kauskot, A.; Cominetti, M.R.; Bechyne, I.; Salla Pontes, C.L.; Chareyre, F.; Manent, J.; Vassy, R.; Giovannini, M.; Legrand, C.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Crepin, M.; Bonnefoy, A. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 53–64.
34. Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689.
35. Lindbom, L.; Werr, J. Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. *Semin. Immunol.* **2002**, *14*, 115–121.
36. Saldanha-Gama, R.F.; Moraes, J.A.; Mariano-Oliveira, A.; Coelho, A.L.; Walsh, E.M.; Marcinkiewicz, C.; Barja-Fidalgo, C. alpha(9)beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: Involvement of Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys Acta* **2010**, *1803*, 848–857.
37. Williams, M.A.; Solomkin, J.S. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *65*, 725–736.
38. Coelho, A.L.; de Freitas, M.S.; Oliveira-Carvalho, A.L.; Moura-Neto, V.; Zingali, R.B.; Barja-Fidalgo, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Exp. Cell Res.* **1999**, *251*, 379–387.
39. Coelho, A.L.; de Freitas, M.S.; Mariano-Oliveira, A.; Rapozo, D.C.; Pinto, L.F.; Niewiarowski, S.; Zingali, R.B.; Marcinkiewicz, C.; Barja-Fidalgo, C. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell Res.* **2004**, *292*, 371–384.
40. Coelho, A.L.; de Freitas, M.S.; Mariano-Oliveira, A.; Oliveira-Carvalho, A.L.; Zingali, R.B.; Barja-Fidalgo, C. Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. *FASEB. J.* **2001**, *15*, 1643–1645.
41. Smith, J.B.; Theakston, R.D.; Coelho, A.L.; Barja-Fidalgo, C.; Calvete, J.J.; Marcinkiewicz, C. Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*. *FEBS Lett.* **2002**, *512*, 111–115.
42. Barja-Fidalgo, C.; Coelho, A.L.; Saldanha-Gama, R.; Helal-Neto, E.; Mariano-Oliveira, A.; Freitas, M.S. Disintegrins: Integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38*, 1513–1520.
43. Calvete, J.J.; Moreno-Murciano, M.P.; Theakston, R.D.; Kisiel, D.G.; Marcinkiewicz, C. Snake venom disintegrins: Novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.* **2003**, *372*, 725–734.
44. Neto, E.H.; Coelho, A.L.; Sampaio, A.L.; Henriques, M.G.; Marcinkiewicz, C.; de Freitas, M.S.; Barja-Fidalgo, C. Activation of human T lymphocytes via integrin signaling induced by RGD-disintegrins. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 176–184.
45. Mariano-Oliveira, A.; Coelho, A.L.; Terruggi, C.H.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Barja-Fidalgo, C.; de Freitas, M.S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4799–4808.

46. Souza, D.H.; Iemma, M.R.; Ferreira, L.L.; Faria, J.P.; Oliva, M.L.; Zingali, R.B.; Niewiarowski, S.; Selistre-de-Araujo, H.S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 341–350.
47. Clissa, P.B.; Lopes-Ferreira, M.; Della-Casa, M.S.; Farsky, S.H.; Moura-da-Silva, A.M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. *Toxicon* **2006**, *47*, 591–596.
48. Sheu, J.R.; Yen, M.H.; Kan, Y.C.; Hung, W.C.; Chang, P.T.; Luk, H.N. Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1336*, 445–454.
49. Yeh, C.H.; Peng, H.C.; Yang, R.S.; Huang, T.F. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1333–1342.
50. Zhou, Q.; Nakada, M.T.; Arnold, C.; Shieh, K.Y.; Markland, F.S., Jr. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits angiogenesis. *Angiogenesis* **1999**, *3*, 259–269.
51. Markland, F.S.; Shieh, K.; Zhou, Q.; Golubkov, V.; Sherwin, R.P.; Richters, V.; Sposto, R.A. Novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. *Haemostasis* **2001**, *31*, 183–191.
52. Swenson, S.; Costa, F.; Ernst, W.; Fujii, G.; Markland, F.S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin with anti-angiogenic and anti-tumor activity. *Pathophysiol. Haemost. Thromb* **2005**, *34*, 169–176.
53. Minea, R.O.; Helchowski, C.M.; Zidovetzki, S.J.; Costa, F.K.; Swenson, S.D.; Markland, F.S., Jr. Vicrostatin—An anti-invasive multi-integrin targeting chimeric disintegrin with tumor anti-angiogenic and pro-apoptotic activities. *PLoS One* **2010**, *5*, 10929.
54. Jang, Y.J.; Kim, D.S.; Jeon, O.H.; Kim, D.S. Saxatilin suppresses tumor-induced angiogenesis by regulating VEGF expression in NCI-H460 human lung cancer cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 439–443.
55. Sohn, Y.D.; Cho, K.S.; Sun, S.A.; Sung, H.J.; Kwak, K.W.; Hong, S.Y.; Kim, D.S.; Chung, K.H. Suppressive effect and mechanism of saxatilin, a disintegrin from Korean snake (*Gloydius saxatilis*), in vascular smooth muscle cells. *Toxicon* **2008**, *52*, 474–480.
56. Tian, J.; Paquette-Straub, C.; Sage, E.H.; Funk, S.E.; Patel, V.; Galileo, D.; McLane, M.A. Inhibition of melanoma cell motility by the snake venom disintegrin eristostatin. *Toxicon* **2007**, *49*, 899–908.
57. Moreno-Murciano, M.P.; Monleon, D.; Calvete, J.J.; Celda, B.; Marcinkiewicz, C. Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-containing short disintegrin isolated from the venom of *Vipera lebetina obtusa*. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 366–371.
58. Kisiel, D.G.; Calvete, J.J.; Katzhendler, J.; Fertala, A.; Lazarovici, P.; Marcinkiewicz, C. Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the alpha1beta1 integrin. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 478–482.

59. Olfa, K.Z.; Jose, L.; Salma, D.; Amine, B.; Najet, S.A.; Nicolas, A.; Maxime, L.; Raoudha, Z.; Kamel, M.; Jacques, M.; Jean-Marc, S.; Mohamed el, A.; Naziha, M. Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Lab. Invest.* **2005**, *85*, 1507–1516.
60. Calvete, J.J.; Fox, J.W.; Agelan, A.; Niewiarowski, S.; Marcinkiewicz, C. The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on alphaII(b)beta3, alpha(v)beta3, and alpha5beta1 integrins. *Biochemistry* **2002**, *41*, 2014–2021.
61. Wang, W.J. Acurhagin-C, an ECD disintegrin, inhibits integrin alphavbeta3-mediated human endothelial cell functions by inducing apoptosis via caspase-3 activation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1338–1351.
62. Cominetti, M.R.; Terruggi, C.H.; Ramos, O.H.; Fox, J.W.; Mariano-Oliveira, A.; De Freitas, M.S.; Figueiredo, C.C.; Morandi, V.; Selistre-de-Araujo, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18247–18255.
63. Ramos, O.H.; Terruggi, C.H.; Ribeiro, J.U.; Cominetti, M.R.; Figueiredo, C.C.; Berard, M.; Crepin, M.; Morandi, V.; Selistre-de-Araujo, H.S. Modulation of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *461*, 1–6.
64. Morris, V.L.; Schmidt, E.E.; Koop, S.; MacDonald, I.C.; Grattan, M.; Khokha, R.; McLane, M.A.; Niewiarowski, S.; Chambers, A.F.; Groom, A.C. Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp. Cell Res.* **1995**, *219*, 571–578.
65. Kang, I.C.; Chung, K.H.; Lee, S.J.; Yun, Y.; Moon, H.M.; Kim, D.S. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys breviceaudus*) venom. *Thromb. Res.* **1998**, *91*, 65–73.
66. Oliva, I.B.; Coelho, R.M.; Barcellos, G.G.; Saldanha-Gama, R.; Wermelinger, L.S.; Marcinkiewicz, C.; Benedeta Zingali, R.; Barja-Fidalgo, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicon* **2007**, *50*, 1053–1063.
67. Sanchez, E.E.; Rodriguez-Acosta, A.; Palomar, R.; Lucena, S.E.; Bashir, S.; Soto, J.G.; Perez, J.C. Colombistatin: A disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch. Toxicol.* **2009**, *83*, 271–279.
68. Yang, R.S.; Tang, C.H.; Chuang, W.J.; Huang, T.H.; Peng, H.C.; Huang, T.F.; Fu, W.M. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon* **2005**, *45*, 661–669.
69. Danen, E.H.; Marcinkiewicz, C.; Cornelissen, I.M.; van Kraats, A.A.; Pachter, J.A.; Ruiten, D.J.; Niewiarowski, S.; van Muijen, G.N. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **1998**, *238*, 188–196.
70. Nakamura, I.; Tanaka, H.; Rodan, G.A.; Duong, L.T. Echistatin inhibits the migration of murine perfusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. *Endocrinology* **1998**, *139*, 5182–5193.

71. Lin, E.; Wang, Q.; Swenson, S.; Jadvar, H.; Groshen, S.; Ye, W.; Markland, F.S.; Pinski, J. The disintegrin contortrostatin in combination with docetaxel is a potent inhibitor of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. *Prostate* **2010**, *70*, 1359–1370.
72. Limam, I.; Bazaa, A.; Srairi-Abid, N.; Taboubi, S.; Jebali, J.; Zouari-Kessentini, R.; Kallech-Ziri, O.; Mejdoub, H.; Hammami, A.; El Ayeb, M.; Luis, J.; Marrakchi, N. Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell adhesion. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 117–126.
73. Brown, M.C.; Staniszevska, I.; Lazarovici, P.; Tuszyński, G.P.; Del Valle, L.; Marcinkiewicz, C. Regulatory effect of nerve growth factor in alpha9beta1 integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **2008**, *10*, 968–980.
74. Brown, M.C.; Staniszevska, I.; Del Valle, L.; Tuszyński, G.P.; Marcinkiewicz, C. Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *Int. J. Canc.* **2008**, *123*, 2195–2203.
75. Staniszevska, I.; Walsh, E.M.; Rothman, V.L.; Gaathon, A.; Tuszyński, G.P.; Calvete, J.J.; Lazarovici, P.; Marcinkiewicz, C. Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. *Canc. Biol. Ther.* **2009**, *8*, 1507–1516.
76. Serrano, S.M.; Wang, D.; Shannon, J.D.; Pinto, A.F.; Polanowska-Grabowska, R.K.; Fox, J.W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *FEBS. J.* **2007**, *274*, 3611–3621.
77. Moser, M.; Bauer, M.; Schmid, S.; Ruppert, R.; Schmidt, S.; Sixt, M.; Wang, H.V.; Sperandio, M.; Fassler, R. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 300–305.
78. Mochizuki, S.; Okada, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Canc. Sci.* **2007**, *98*, 621–628.
79. Arribas, J.; Bech-Serra, J.J.; Santiago-Josefat, B. ADAMs, cell migration and cancer. *Canc. Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 57–68.
80. Seals, D.F.; Courtneidge, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 7–30.
81. Jia, L.G.; Shimokawa, K.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* **1996**, *34*, 1269–1276.
82. Stone, A.L.; Kroeger, M.; Sang, Q.X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J. Protein Chem.* **1999**, *18*, 447–465.
83. Zigrino, P.; Steiger, J.; Fox, J.W.; Loffek, S.; Schild, A.; Nischt, R.; Mauch, C. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30785–30793.
84. Mauch, C.; Zamek, J.; Abety, A.N.; Grimberg, G.; Fox, J.W.; Zigrino, P. Accelerated wound repair in ADAM-9 knockout animals. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 2120–2130.
85. Chen, Q.; Meng, L.H.; Zhu, C.H.; Lin, L.P.; Lu, H.; Ding, J. ADAM15 suppresses cell motility by driving integrin alpha5beta1 cell surface expression via Erk inactivation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 2164–2173.

86. Trochon-Joseph, V.; Martel-Renoir, D.; Mir, L.M.; Thomaidis, A.; Opolon, P.; Connault, E.; Li, H.; Grenet, C.; Fauvel-Lafeve, F.; Soria, J.; Legrand, C.; Soria, C.; Perricaudet, M.; Lu, H. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Canc. Res.* **2004**, *64*, 2062–2069.
87. Cominetti, M.R.; Martin, A.C.; Ribeiro, J.U.; Djaafri, I.; Fauvel-Lafeve, F.; Crepin, M.; Selistre-de-Araujo, H.S. Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. *Biochimie* **2009**, *91*, 1045–1052.
88. Selistre-de-Araujo, H.S. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. Unpublished work, 2010.
89. Xu, Q.; Liu, X.; Cai, Y.; Yu, Y.; Chen, W. RNAi-mediated ADAM9 gene silencing inhibits metastasis of adenoid cystic carcinoma cells. *Tumour Biol.* **2010**, *31*, 217–224.
90. Alfandari, D.; Cousin, H.; Gaultier, A.; Smith, K.; White, J.M.; Darribere, T.; DeSimone, D.W. Xenopus ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 918–930.
91. Maretzky, T.; Reiss, K.; Ludwig, A.; Buchholz, J.; Scholz, F.; Proksch, E.; de Strooper, B.; Hartmann, D.; Saftig, P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9182–9187.
92. Wild-Bode, C.; Fellerer, K.; Kugler, J.; Haass, C.; Capell, A. A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23824–23829.
93. Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J. Cell Physiol.* **2010**, *223*, 14–26.
94. Ilina, O.; Friedl, P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 3203–3208.
95. Friedl, P.; Noble, P.B.; Walton, P.A.; Laird, D.W.; Chauvin, P.J.; Tabah, R.J.; Black, M.; Zanker, K.S. Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants *in vitro*. *Canc. Res.* **1995**, *55*, 4557–4560.
96. Christiansen, J.J.; Rajasekaran, A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Canc. Res.* **2006**, *66*, 8319–8126.