

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

TAMARA DA ROCHA MACHADO FERREIRA

**Análise de expressão do gene ADAM23 em tumores
do Sistema Nervoso Central (SNC) e estudo de sua
função em gliomas e em melanomas.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
16/07/2012

TAMARA DA ROCHA MACHADO FERREIRA

Análise de expressão do gene ADAM23 em tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) e estudo de sua função em gliomas e em melanomas.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

Co-orientador: Dr. Érico Tosoni Costa

Versão corrigida da tese
(A versão defendida se encontra na secretaria de Pós Graduação do IQ-USP)

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Machado-Ferreira, Tamara da Rocha
M149a Análise de expressão do gene ADAM23 em tumores do sistema nervoso central (SNC) e estudo de sua função em gliomas e em melanomas / Tamara da Rocha Machado-Ferreira. -- São Paulo, 2012.
170p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Camargo, AnaMaria Aranha

Co-orientador : Costa, Érico Tosoni

1. Biologia molecular 2. Câncer 3. Biologia celular I. T. II. Camargo, Ana Maria Aranha, orientador. III. Costa, Érico Tosoni, co-orientador.

574.88 CDD

Ao meu avô Elias Rodrigues da Rocha (in memoriam), erudito de quem herdei a paixão pela leitura e busca de conhecimento. Foi um dos maiores incentivadores para que eu me tornasse doutora.

Ao Maurício pelas palavras de conforto e encorajamento, pela paciência, pela sabedoria que eu tanto admiro. Você foi fundamental nessa conquista.

Aos meus pais, pela dedicação e abnegação na minha criação e de meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao único e verdadeiro Deus, no qual existo e encontro sentido para todas as coisas. A Ele toda honra e glória, sempre.

À minha orientadora Dra. Anamaria Aranha Camargo, por investir seu tempo na minha formação. Sua dedicação e capacidade em tudo o que faz são exemplos pra mim.

Ao meu co-orientador Dr. Érico Tosoni Costa, pelo tempo dedicado e pela orientação nos experimentos.

À minha amiga Fel, com quem tive a felicidade de compartilhar todas as etapas deste doutorado, e a quem sou imensamente grata pela companhia e pela ajuda em tudo. Te admiro demais!

A todos os amigos e colegas do LMBG, pela ajuda direta ou indireta no projeto, e pela companhia no dia a dia.

Aos colegas do Ludwig, pelo apoio e ajuda em diversos momentos.

Ao Dr. Enrique Boccardo, pela orientação em muitos experimentos.

À Dra. Suely Marie e Dra Sueli Oba-Shinjo pela doação das amostras de gliomas utilizadas no projeto.

À Fapesp pelo financiamento do projeto.

“ Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas”.

Rm 11:36

RESUMO

Machado-Ferreira, T.R.. **Análise de expressão do gene ADAM23 em tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) e estudo de sua função em gliomas e em melanomas.** 2012. 170p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O gene ADAM23 está epigeneticamente silenciado em tumores de mama de estágios mais avançados e o seu silenciamento nesses tumores confere ao paciente um maior risco de desenvolvimento de metástases e um pior prognóstico. O silenciamento do gene ADAM23 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 reduz a capacidade proliferativa e aumenta a capacidade migratória e invasiva das células em modelo tridimensional de cultura. No entanto, paradoxalmente, o silenciamento do gene ADAM23 nessa linhagem reduz a capacidade tumorigênica e metastática das células em ensaios *in vivo* utilizando animais imunodeficientes. Ensaios subsequentes utilizando misturas de células positivas e negativas para a expressão de ADAM23 revelaram que as células negativas estimulam a proliferação, migração e invasão das células positivas e que a heterogeneidade tumoral em relação à expressão de ADAM23 é importante para a disseminação e colonização metastática. Este trabalho teve como objetivo validar a associação entre o silenciamento do gene ADAM23 em tumores primários e a progressão tumoral, e também encontrar um modelo celular alternativo para a realização de ensaios funcionais que comprovassem o papel do gene ADAM23 na proliferação, migração, e invasão celular, bem como a existência de interação celular entre células ADAM23 positivas e negativas. A análise da expressão do gene ADAM23 em amostras de gliomas de diferentes estágios através de PCR em Tempo Real revelou que a expressão desse gene diminui ao longo da progressão tumoral e está bastante reduzida em tumores de grau avançado. Porém, ao contrário do observado em tumores de mama, o silenciamento do gene ADAM23 em gliomas não é causado por hipermetilação de sua região promotora nem por mutações em sua região codificante, ou perda de heterozigose. Infelizmente, não foi possível selecionar clones derivados da linhagem celular de glioblastoma U87MG com silenciamento estável do gene ADAM23 para a realização de ensaios funcionais. Aparentemente, o silenciamento de ADAM23 nessa linhagem resulta na parada do ciclo celular na fase G0/G1, impedindo a seleção de clones com silenciamento estável do gene. O mesmo fenômeno não foi observado na linhagem de melanoma SKmel-37, permitindo a seleção de clones com silenciamento estável de ADAM23 e a realização de ensaios funcionais. Curvas de proliferação em monocamada e ensaios de incorporação de MTT em modelo tridimensional *in vitro* demonstraram que o silenciamento de ADAM23 na linhagem SKmel-37 diminui sua taxa de proliferação em 20-50%. Ensaios de citometria de fluxo demonstraram que o silenciamento de ADAM23 interfere na expressão das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ na membrana celular, resultando em diminuição de 50% na afinidade aos ligantes de matriz e aumento significativo na capacidade de migração e invasão no colágeno. Ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando misturas de células SKmel-37 ADAM23 positivas e negativas também confirmaram a existência de interação entre os dois subtipos celulares. Ensaios *in vitro* de migração e invasão no colágeno revelaram que células ADAM23 negativas induzem a migração e a invasão de células positivas e, em ensaios de tumorigênese *in vivo*, observamos que os tumores formados a partir da injeção de uma mistura de células positivas e negativas apresentam crescimento semelhante ao dos tumores formados a partir da injeção de células ADAM23 positivas.

Palavras-chave: ADAM23, proliferação, migração, invasão e metástase.

ABSTRACT

Machado-Ferreira, T.R.. Analysis of ADAM23 gene expression in tumors of the Central Nervous System (CNS) and study of its function in melanoma and glioma. 2012. 170p. PhD Thesis - Postgraduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo.

The ADAM23 gene is epigenetically silenced in breast tumors of more advanced stages and its silencing in these tumors gives the patient a greater risk of developing metastasis and a worse prognosis. The ADAM23 gene silencing in the MDA-MB-435 breast tumor cell line reduces the proliferative capacity and increases migratory and invasive abilities of cells in three-dimensional culture models. Yet, paradoxically, the ADAM23 gene silencing in this line reduces tumorigenic and metastatic abilities of cells in *in vivo* assays using immunodeficient animals. Subsequent tests using ADAM23 positive and negative cells mixtures revealed that negative cells stimulate proliferation, migration and invasion of positive cells and the heterogeneity of ADAM23 expression in tumors is important for the spreading and metastatic colonization. This study aimed to validate the association between ADAM23 gene silencing in primary tumors and tumor progression as well as find an alternative cellular model for performing functional tests to prove the role of the ADAM23 gene in proliferation, migration and cell invasion, and to prove the existence of cell interaction between ADAM23 positive and negative cells. The analysis of ADAM23 gene expression in samples from different stages of gliomas by RT-PCR revealed that the expression of this gene decreases over tumor progression and is greatly reduced in tumors of advanced degree. However, unlike that observed in breast tumors, the ADAM23 gene silencing in gliomas is not caused by hypermethylation of its promoter region or by mutations in its coding region, or by loss of heterozygosity. Unfortunately, it was not possible to select clones derived from the U87MG glioblastoma cell line with stable silencing of the gene ADAM23 for the functional testing. Apparently, the silencing of ADAM23 in this cell line results in cell cycle arrest in G0/G1 phase, preventing the selection of clones with stable gene silencing. The same phenomenon was not observed in SKmel-37 melanoma cell line, allowing selection of clones with stable silencing of ADAM23 and functional testing. Monolayer proliferation curves and *in vitro* MTT incorporation assays in three-dimensional models showed that ADAM23 silencing in the SKmel-37 cell line reduces their rate of proliferation by 20-50%. Flow cytometry assays demonstrated that ADAM23 silencing interferes with the expression of $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ integrins in the cell membrane, resulting in a 50% decrease in binding affinity to the matrix and a significant increase in migratory and invasive abilities on collagen. *In vitro* and *in vivo* assays using ADAM23 positive and negative SKmel-37 cell mixtures also confirmed the existence of interaction between the two cell subsets. *In vitro* invasion and migration on collagen assays revealed that ADAM23 negative cells induce migration and invasion of positive cells. Furthermore, in *in vivo* tumorigenic tests we found that tumors formed from injection of a mixture of positive and negative cells exhibit growth similar to the tumors formed after injection of ADAM23 positive cells.

Keywords: ADAM23, proliferation, migration, invasion and metastasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DE DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM (A <i>DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE</i>).....	22
FIGURA 2- CURVAS DE SOBREVIDA DE ACORDO COM O PERFIL DE METILAÇÃO DAS 2 REGIÕES DE ILHAS DE CPG UPSTREAM AO GENE ADAM23.	33
FIGURA 3- REGIÃO DO CROMOSSOMO 2 MOSTRANDO O GENE ADAM23 E OS MARCADORES D2S422, D2S369 E D2S 2358.	45
FIGURA 4- REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE ADAM23 EM GBM.	61
FIGURA 5- AUSÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DE ADAM23 NAS AMOSTRAS DE GBM.	64
FIGURA 6- A ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GENÔMICA DE ADAM23 NÃO DETECTOU MUTAÇÕES EM SEUS EXONS.	66
FIGURA 7- EXEMPLOS DE GRÁFICOS DA ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS COM OS MARCADORES DE MICROSSATÉLITES.	69
FIGURA 8- A EXPRESSÃO DE ADAM23 NÃO SE CORRELACIONA COM A EXPRESSÃO DOS MICRORNAS HSA-MIR-32, HSA-MIR-92A E HSA-MIR-92B NAS AMOSTRAS DE GLIOBLASTOMAS.	74
FIGURA 9- MÉDIA DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS HSA-MIR-32, HSA-MIR-92A E HSA-MIR-92B NAS AMOSTRAS DE GBM COM MAIOR EXPRESSÃO DE ADAM23 (ADAM23+) OU MENOR EXPRESSÃO DE ADAM23 (ADAM23-).....	75
FIGURA 10- DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE ADAM23 NAS CÉLULAS U87/PRS04.	78
FIGURA 11- EXPRESSÃO RELATIVA DO TRANSCRITO PRIMÁRIO DE ADAM23 NAS CÉLULAS U87MG E EM SEUS DERIVADOS, POR PCR EM TEMPO REAL.	79
FIGURA 12- O SILENCIAMENTO DE ADAM23 NÃO INFLUENCIA A CAPACIDADE DE ADESÃO DAS CÉLULAS U87MG AO COLÁGENO E À VITRONECTINA.	80
FIGURA 13- ANÁLISE DOS NÍVEIS ATIVOS E TOTAIS DA INTEGRINA AVB3 NAS CÉLULAS U87MG E DE SEUS DERIVADOS ADAM23 NEGATIVOS POR FACS.	82
FIGURA 14- PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE SILENCIAMENTO DO GENE ADAM23 ATRAVÉS DA TRANSFEÇÃO COM DUPLEXES DE SIRNA.	84
FIGURA 15- ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS U87MG/SIRNA-ADAM23.....	86
FIGURA 16- EXPRESSÃO RELATIVA DO TRANSCRITO PRIMÁRIO DE ADAM23 EM CÉLULAS SKMEL-37 E EM SEUS DERIVADOS, POR PCR EM TEMPO REAL.	88
FIGURA 17- O SILENCIAMENTO DE ADAM23 DIMINUI A CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS SKMEL-37.	90
FIGURA 18- ADAM23 É IMPORTANTE NA VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS SKMEL-37 EM MODELO TRIDIMENSIONAL.	92

FIGURA 19- ANÁLISE DOS NÍVEIS ATIVOS E TOTAIS DA INTEGRINA AVB3 NAS CÉLULAS SKMEL-37 E DE SEUS DERIVADOS ADAM23 NEGATIVOS POR FACS.	94
FIGURA 20- ANÁLISE DOS NÍVEIS TOTAIS DA INTEGRINA AVB5 NAS CÉLULAS SKMEL-37 E DE SEUS DERIVADOS ADAM23 NEGATIVOS POR FACS.	95
FIGURA 21- O SILENCIAMENTO DE ADAM23 ESTÁ RELACIONADO COM A DIMINUIÇÃO NA ADESÃO À VITRONECTINA (VN), COLÁGENO (COL), FIBRONECTINA (FN) E FIBRINOGENIO (FB).....	97
FIGURA 22- ALTERNÂNCIA ENTRE RECEPTORES CELULARES PREFERENCIAIS DE VITRONECTINA – AVB3 OU AVB5 – É DEPENDENTE DA EXPRESSÃO DE ADAM23.	99
FIGURA 23- ENSAIOS DE MIGRAÇÃO EM POÇOS TRANSWELL REALIZADOS COM AS CÉLULAS ADAM23 POSITIVAS E ADAM23 NEGATIVAS.	100
FIGURA 24- O SILENCIAMENTO DE ADAM23 FAVORECE A INVASÃO DAS CÉLULAS SKMEL-37 NA MATRIZ DE COLÁGENO.....	102
FIGURA 25- ENSAIO TUMORIGÊNICO EM ANIMAIS BALB/C NUDE.	106
FIGURA 26- CÉLULAS ADAM23 NEGATIVAS FAVORECEM A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS ADAM23 POSITIVAS EM COLÁGENO	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- EXPRESSÃO DAS ADAMS HUMANAS EM DIFERENTES TIPOS DE TUMORES-----	27
TABELA 2- SEQUENCIA DOS PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 23 E 25 DA SEQUÊNCIA GENÔMICA DA ADAM23. -----	44
TABELA 3- SEQUENCIA DOS PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA CORRESPONDENTES AOS MARCADORES DA REGIÃO CROMOSSÔMICA DA ADAM23.-----	45
TABELA 4- SEQUENCIA DOS PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES GAPDH E HMBS. -----	53
TABELA 5- MARCADORES DE MICROSATÉLITES ESCOLHIDOS PARA A ANÁLISE DE LOH. -----	68
TABELA 6- RESULTADOS DAS ANÁLISES DO DNA GENÔMICO DE LINFÓCITOS CORRESPONDENTES ÀS AMOSTRAS DE GLIOMAS. -----	70
TABELA 7- DESEQUILIBRO ALÉLICO DAS AMOSTRAS DE GLIOMAS ANALISADAS.-----	71
TABELA 8- ENSAIO TUMORIGÊNICO EM ANIMAIS BALB/C NUDE. -----	104

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	15
1.1 ASPECTOS GENÉTICOS DA FORMAÇÃO E PROGRESSÃO TUMORAL	15
1.2 A FAMÍLIA ADAM	21
1.3 ADAMs E CÂNCER	26
1.4 ADAM23 E SEUS PARCEIROS MOLECULARES	30
1.5 EXPRESSÃO DA ADAM23 EM TUMORES	31
1.6 EVIDÊNCIAS DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE ADAM23 EM TUMORES	36
2- OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3- METODOLOGIA	40
3.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA ADAM23 EM GLIOMAS	40
3.1.1 Amostras de gliomas	40
3.1.2 Extração de RNA	40
3.1.3 Síntese de cDNA	41
3.1.4 PCR em Tempo Real das amostras de gliomas	41
3.2 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELA INATIVAÇÃO DO GENE ADAM23 EM GLIOMAS	42
3.2.1 Análise do padrão de metilação do DNA da região promotora do gene ADAM23	42
3.2.2 Ensaio de detecção de mutação do gene ADAM23 em amostras de glioblastomas humanos	43
3.2.3 Análise da perda de heterozigose (LOH - Loss of Heterozygosity) do gene ADAM23 em amostras de gliomas	44
3.2.4 Análise da expressão dos microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b em amostras de GBM	47
3.3 SILENCIAMENTO DE ADAM23 POR INTERFERÊNCIA DE RNA NAS LINHAGENS U87MG E SKMEL-37	47
3.3.1 Silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG com o vetor retroviral pRS-shRNA-ADAM23	47
3.3.2 Silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG com os duplexes de RNA de interferência (siRNA-ADAM23)	50
3.3.3 Silenciamento de ADAM23 com o vetor pAVU6+27-shRNA-ADAM23 na linhagem SKmel-37	51
3.4 ENSAIOS FUNCIONAIS	51
3.4.1 Cultura de células	51
3.4.2 Isolamento de clones de células U87MG ou SKmel-37 e suas derivadas	52
3.4.3 Análise da expressão relativa do gene ADAM23 nas células U87MG ou SKmel-37 e suas derivadas	52
3.4.4 Ensaio de FACS para análise dos níveis de ativação da integrina $\alpha v \beta 3$	53
3.4.5 Ensaio de adesão celular <i>in vitro</i>	54
3.4.6 Ensaio de migração celular em transwell	55
3.4.7 Análise do ciclo celular das células U87MG/siRNA-ADAM23	56
3.4.8 Ensaio de proliferação bidimensional (monocamada)	57
3.4.9 Formação de esferóides	57

3.4.10 Ensaio de Invasão em colágeno-----	57
3.4.11 Ensaio de incorporação de MTT em bead de colágeno-----	58
3.4.12 Ensaio tumorigênico em animais Balb/c Nude-----	59
3.4.13 Ensaio de Invasão em colágeno com esferóides heterotípicos -----	59
4- RESULTADOS-----	60
4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE ADAM23 EM GLIOMAS -----	60
4.2 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DIMINUIÇÃO NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ADAM23 EM GLIOMAS-----	62
4.2.1 <i>Análise do padrão de metilação do DNA da região promotora do gene ADAM23.</i> -----	62
4.2.2 <i>Deteção de mutações na região codificante do gene ADAM23 em amostras de glioblastomas humanos</i> -----	65
4.2.3 <i>Análise da perda de heterozigose (LOH - Loss of Heterozygosity) do gene ADAM23 em amostras de gliomas</i> -----	66
4.2.4 <i>Análise da expressão dos miRNAs hsa-miR-92a, hsa-miR-92b e hsa-miR-32 nas amostras de GBM</i> -----	71
4.3 SILENCIAMENTO DO GENE ADAM23 POR INTERFERÊNCIA DE RNA NA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG -----	76
4.3.1 <i>Efeitos de ADAM23 na adesão das células U87MG aos ligantes de matriz extracelular</i> -----	80
4.3.2 <i>Efeitos de ADAM23 nos níveis totais e na ativação da integrina $\alpha\beta3$ na linhagem U87MG</i> -----	81
4.3.3 <i>Efeito da redução de expressão de ADAM23 no ciclo celular das células U87MG</i> -----	82
4.4 SILENCIAMENTO DO GENE ADAM23 POR INTERFERÊNCIA DE RNA NA LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO SKMEL-37-----	87
4.4.1 <i>Efeitos do silenciamento de ADAM23 na capacidade proliferativa da linhagem Skmel-37 in vitro</i> -----	89
4.4.1.1 <i>Ensaios de proliferação em monocamada</i> -----	89
4.4.1.2 <i>Ensaios de proliferação em modelo tridimensional</i> -----	91
4.4.2 <i>Efeitos de ADAM23 na ativação da integrina $\alpha\beta3$ e nos níveis totais das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ na linhagem Skmel-37</i> -----	92
4.4.3 <i>Efeitos de ADAM23 na adesão celular aos ligantes de matriz extracelular</i> -----	96
4.4.4 <i>Efeitos da ADAM23 na capacidade migratória das células SKmel-37</i> -----	99
4.4.5 <i>Efeitos de ADAM23 na capacidade invasiva das células SKmel-37 em colágeno</i> -----	101
4.4.6 <i>Efeitos da cooperação entre as células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas nos processos de proliferação e invasão celulares</i> -----	103
4.4.6.1 <i>Efeitos da cooperação celular em ensaio tumorigênico in vivo</i> -----	103
4.4.6.2 <i>Efeitos da cooperação celular nos ensaios de invasão em colágeno</i> -----	106
5- DISCUSSÃO-----	109
5.1 EXPRESSÃO DO GENE ADAM23 EM GLIOMAS -----	109
5.2 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELA INATIVAÇÃO DO GENE ADAM23 EM GLIOMAS -----	110
5.3 PAPEL FUNCIONAL DE ADAM23 -----	114
6- CONCLUSÕES -----	127

7-REFERÊNCIAS	129
LISTA DE ANEXOS	143
ANEXO 2	167
SÚMULA CURRICULAR	167

1-INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos genéticos da formação e progressão tumoral

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo e apesar da quantidade extraordinária de esforço e dinheiro investidos, a erradicação ou o controle da doença ainda não foram alcançados (Jemal et al., 2008). Entender quais são os eventos relacionados ao câncer é indispensável para identificar indivíduos mais suscetíveis à doença e tomar medidas preventivas e também para o desenvolvimento de formas de diagnóstico e tratamento mais eficazes.

O câncer é um processo de várias etapas que culmina na transformação de uma célula normal em uma célula maligna através do acúmulo de alterações em seu genoma. Estas alterações no genoma celular levam à desregulação e ao funcionamento anormal de genes envolvidos em processos de proliferação celular, diferenciação celular, sobrevivência celular e integridade genômica (Hahn et al., 1999; Hahn & Weinberg, 2002). Hanahan e Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000) propuseram seis alterações essenciais que caracterizam a fisiologia tumoral: 1- auto-suficiência quanto a fatores de crescimento, 2- insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação, 3- evasão da apoptose, ou morte celular programada, 4- potencial replicativo infinito, 5- angiogênese sustentada e 6- invasão tecidual e metástase. Outras características da célula tumoral foram incluídas recentemente, como a capacidade de evasão do sistema imune, a reprogramação metabólica, a capacidade de gerar resposta inflamatória e a instabilidade genômica (Hanahan & Weinberg, 2011).

Os proto-oncogenes são genes que quando alterados no tumor, promovem um crescimento celular descontrolado. Estes genes são fenotipicamente

dominantes, requerendo uma mutação que gere ganho de função ou um ganho cromossomal para que se tornem oncogênicos. Dentre os mais estudados estão MYC (gene que codifica um fator de transcrição), ERBB2 (Her-2/neu, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Já os genes supressores tumorais possuem propriedades antiproliferativas e requerem inativação de ambos os alelos para que a indução do tumor ocorra, o que pode acontecer via mutação pontual, deleção ou silenciamento epigenético. Dois grupos de genes são considerados supressores tumorais: 1) os *gatekeepers* ou genes protetores, que regulam o ciclo celular, como o TP53 (*Tumor Protein 53*), CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, p16) e RB (*Retinoblastoma Protein*); e 2) os *caretakers* ou genes de manutenção, que reparam danos ao DNA, mantendo a integridade genômica e evitando a instabilidade genética, como BRCA1 (*Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein*) e BRCA2 (*Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein*) (Cairns, 1975; Frank, 2003; Kinzler & Vogelstein, 1997). As alterações nos genes deste último grupo não conferem vantagens proliferativas à célula, mas facilitam a ocorrência de mutações nos proto-oncogenes e genes *gatekeepers*, as quais darão início à tumorigênese.

O câncer, portanto, é resultado do acúmulo de eventos genéticos (que alteram a sequência ou estrutura do DNA) e epigenéticos (que alteram a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA) resultando na alteração do genoma celular. Essas alterações genômicas modificam a expressão e/ou função de proteínas que por sua vez alteram a fisiologia celular levando ao processo tumorigênico (Hanahan & Weinberg, 2000).

Os eventos genéticos podem ser classificados em dois tipos: gênicos e cromossômicos. Mutações pontuais e pequenas inserções e deleções são eventos

gênicos, que podem vir a alterar ou interromper a sequência de aminoácidos e levar à produção de uma proteína com ganho ou perda de função. Um exemplo típico é a mutação em BRAF (*B-Raf protein*), que resulta em uma quinase constitutivamente ativa contribuindo para o crescimento celular anormal (Wan et al., 2004) e a mutação que impede a ligação da proteína P53 às suas sequências de controle transcricional, impedindo a sua função de inibição de crescimento celular e indução de morte em caso de estresse celular (Vogelstein et al., 2000). Os eventos cromossômicos podem ser divididos em numéricos (quando resultam em alteração da ploidia) e estruturais (translocações, ampliações e deleções). O caso da proteína BCR–ABL é um exemplo de alteração cromossômica. Esta proteína é resultado da translocação entre os cromossomos 9 e 22, conhecido como cromossomo Philadelphia (Nowell, 2007), e resulta em uma tirosina quinase constitutivamente ativa que é responsável pela leucemia mielóide crônica (Groffen et al., 1984; Shtivelman et al., 1985). Outro exemplo de alteração cromossômica ocorre com o gene N-MYC, envolvido na etiologia do neuroblastoma, onde sua amplificação tem sido associada a uma rápida progressão tumoral com baixo prognóstico para os pacientes (Seeger et al., 1985; Tsuda et al., 1988).

Os mecanismos epigenéticos envolvem a metilação de DNA, a modificação de histonas e a expressão de RNAs não codificantes, como os miRNAs. O genoma tumoral é marcado por uma hipometilação global e uma hipermetilação específica de ilhas CpG nas regiões promotoras (Jones & Baylin, 2002). A hipometilação global em tumores abrange extensas regiões do genoma e ocorre principalmente nas seqüências de DNA repetitivo e regiões intergênicas. A hipometilação possui um papel importante na tumorigênese à medida que aumenta a instabilidade genômica através do favorecimento de recombinações mitóticas com a conseqüente perda de

heterozigozidade e promoção de rearranjos cromossômicos. Ela também favorece a reativação dos elementos transponíveis do genoma e a perda dos padrões normais de imprinting parental (Eden et al., 2003; Ehrlich, 2003; Howard et al., 2008; Jones & Baylin, 2002). Além disso, a hipometilação do DNA pode ativar oncogenes, como ocorre com R-Ras (*Ras-related protein*) em tumores gástricos, MASPIN (*mammary serine protease inhibitor*) e S-100P (*S100 calcium binding protein P*) em tumores de pâncreas e MAGE (*melanoma-associated antigen*) em linhagens de melanoma (De Smet et al., 1996; Kim et al., 2006; Nishigaki et al., 2005; Sato et al., 2004).

Em contraste à hipometilação, que aumenta a instabilidade genômica e ativa proto-oncogenes, a hipermetilação específica de ilhas CpG nas regiões promotoras contribui para a tumorigênese através do silenciamento de genes supressores tumorais. A metilação do DNA ocorre através da adição de um grupo metil à citosina de um dinucleotídeo CpG. As ilhas CpG encontradas são regiões ricas nestes dinucleotídeos (geralmente acima de 50% dos nucleotídeos da região), diferenciando-se do restante do genoma. A metilação das ilhas CpG contidas nas regiões promotoras dos genes leva ao silenciamento destes genes, diminuindo ou inibindo a sua expressão. Os genes RB (*Retinoblastoma Protein*), p16 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), MLH1 (*MutL homolog 1*) e BRCA1 (*Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein*) são exemplos de genes supressores tumorais que são silenciados através da hipermetilação de suas regiões promotoras (Baylin, 2005; Greger et al., 1989; Jones & Baylin, 2002, 2007).

Modificações de histonas podem levar tanto à ativação quanto à repressão gênica, dependendo dos resíduos modificados e do tipo de modificação (Sharma et al., 2010). A acetilação de histonas é um mecanismo de estímulo à transcrição e ocorre através da adição de um grupo acetil aos resíduos de lisina dos octâmeros de

histonas, o que resulta na facilitação do acesso às regiões promotoras da transcrição (Hebbes et al., 1988; Kouzarides, 2007). A desacetilação de histonas é o processo de remoção dos grupos acetil, resultando na repressão transcricional. Estes processos são realizados pelas acetiltransferases de histonas (HATs) e desacetilases de histonas (HDACs), respectivamente. As HDACs são frequentemente super expressas em diversos tipos de câncer (Halkidou et al., 2004; Song et al., 2005). O processo de metilação das histonas é realizado por metiltransferases de histonas (HMTs) que atuam em resíduos de arginina e lisina principalmente da histona 3. A trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) é encontrada nos promotores de genes transcricionalmente ativos (Liang,G. et al. (2004)) (Liang et al., 2004) enquanto que a trimetilação de H3K9 (H3K9me3) e H3K27 (H3K27me3) estão presentes nas regiões promotoras de genes transcricionalmente inativos (Kouzarides, 2007). O padrão de metilação das histonas influencia a metilação do DNA, contribuindo para uma menor ou maior compactação da cromatina, respectivamente. Aberrações no padrão de metilação de H3K9 e H3K27 estão associadas ao silenciamento gênico em vários tipos de câncer (Nguyen et al., 2002; Valk-Lingbeek et al., 2004).

O posicionamento dos nucleossomos também demonstra a importância da estrutura da cromatina na regulação da atividade gênica. Regiões livres de nucleossomos (NFRs) presentes nas regiões 5' e 3' dos genes facilitam a organização e montagem da maquinaria de transcrição, assim, a perda de nucleossomo *upstream* ao sítio de início de transcrição de um gene está relacionada com sua ativação (Shivaswamy et al., 2008; Yuan et al., 2005), enquanto que sua presença se relaciona com a repressão gênica (Schones et al., 2008). Além disso, a presença de formas variantes de histonas (H3.3 e H2A.Z) nos nucleossomos

também influencia a estabilidade do nucleossomo nas regiões promotoras e consequentemente a atividade gênica (Santenard & Torres-Padilla, 2009).

Os microRNAs também estão relacionados com o desenvolvimento tumoral, sendo encontrados super expressos ou com baixa expressão em vários tipos tumorais e interagindo com diversos mecanismos celulares (Baek et al., 2008; Zhang et al., 2007). MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs (19-22 nucleotídeos) não codificantes com importantes funções regulatórias em processos fisiológicos e patológicos (Kutter & Svoboda, 2008). A desregulação da expressão de miRNA em tumores está bem estabelecida, ligada ao crescimento celular, controle do ciclo celular, evasão de apoptose, invasão celular e metástase e angiogênese (Croce, 2009).

As forças combinadas destes eventos genéticos e epigenéticos conferem ao tumor uma diversidade fenotípica crucial para o desenvolvimento e progressão tumoral, através do surgimento de subpopulações clonais com diferentes características e capacidades. As capacidades migratórias e invasivas do tumor são determinantes para a formação de metástase, colonizando outros órgãos distantes do local de origem do tumor primário. A metástase é o indício maior de malignidade do tumor, sendo sinal de mau prognóstico para o paciente devido à dificuldade na remoção cirúrgica e na eficiência de seu tratamento, na maioria dos casos.

A disseminação metastática engloba a invasão do tecido local, a intravasão e sobrevivência na circulação, a adesão e extravasão, adentrando o parênquima de órgãos distantes, a adaptação ao novo microambiente e a proliferação formando um tumor secundário (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003; Gupta et al., 2005; Nguyen et al., 2009). A metástase é um processo bastante ineficiente, pois a maioria das células tumorais que adentram a corrente sanguínea não resulta em nódulos

metastáticos (Tarin et al., 1984; Weiss, 1990). Para que este processo seja bem sucedido a célula precisa cumprir cada uma destas etapas com eficiência, e somente subpopulações ou clones com características muito específicas possuem as qualidades que o definem como metastáticos. Desta maneira, se torna cada vez mais importante a melhor compreensão dos mecanismos celulares necessários para a eficiência do processo metastático e o estudo dos genes envolvidos neste processo, a fim de descobrir novos alvos e estratégias para o tratamento e cura do câncer.

1.2 A família ADAM

A Família ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*), também chamada de MDC (*Metaloproteinase-like, Disintegrin-like, Cystein-rich proteins*), é um subgrupo da superfamília de Metzincinas, que faz parte do grande grupo de metaloproteases dependentes de zinco. As ADAMs compreendem 40 membros que foram descritos em vertebrados e em várias outras espécies incluindo *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Xenopus laevi*. No genoma humano são encontrados 25 membros desta família, sendo que 4 deles aparentemente são pseudogenes (Puente & López-Otín, 2004).

As proteínas que fazem parte da família ADAM são glicoproteínas transmembranas ou secretadas, formadas por multidomínios. Entre eles está o domínio de metaloprotease, que tem a função de clivagem proteolítica, e o de disintegrina, que tem a função de adesão celular. Os outros domínios que formam a proteína são: uma seqüência sinal que direciona a proteína ao seu sítio de atividade; um pró-domínio que tem função de bloquear a atividade protease; uma região rica em cisteína que também tem função de adesão; um domínio EGF-like com função

pouco caracterizada; um domínio transmembrana que ancora a proteína à membrana da célula; e uma cauda citoplasmática que atua como sinalizador intracelular (Primakoff & Myles, 2000) (Figura 1).

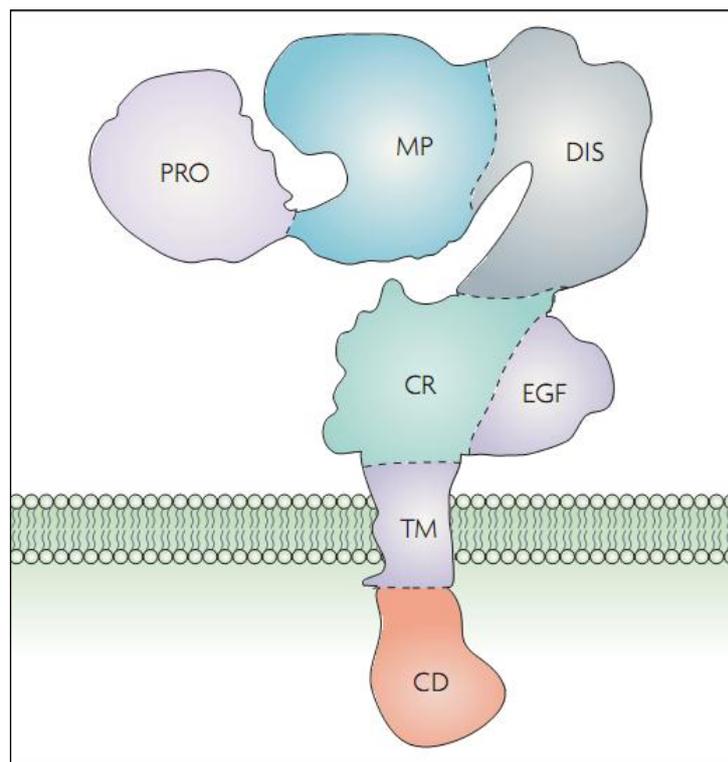


Figura 1- Diagrama esquemático da estrutura de domínios das proteínas da família ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*). PRO: pró-domínio, que atua no dobramento inicial da proteína e regula a atividade de protease. MP: domínio de metaloprotease, com função de clivagem dos substratos. DIS: domínio de disintegrina, responsável pela modulação da adesão celular. CR: região rica em cisteína, também com função de adesão. EGF: domínio EGF-like, com função pouco caracterizada. TM: domínio transmembrana. CD: domínio citoplasmático, ou cauda citoplasmática, com função na sinalização intracelular. Figura adaptada de *Gillian Murphy, Nature Reviews | câncer, Dezembro de 2008*.

Para que o domínio de metaloprotease seja ativo é necessária a presença da seqüência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Em metaloproteases de matriz (MMPs), os três resíduos de histidina (H) deste sítio constituem os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico (E) é o sítio ativo. Algumas proteínas da família ADAM possuem este domínio inativo por apresentarem um ou mais resíduos de aminoácidos diferentes nesta região, incompatíveis com a atividade enzimática. Este é o caso das ADAMs 2-7, 11, 14, 16, 18, 22, 23, 27 e 29. As ADAMs, 1, 8-10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33, que possuem a seqüência consenso conservada no domínio de metaloprotease, têm um papel biológico importante no processamento de proteínas da superfície celular e da matriz extracelular. Estes processamentos são críticos no remodelamento da superfície celular, na regulação da disponibilidade de fatores de crescimento e na modulação da capacidade das células de responderem a estímulos extracelulares (Stamenkovic, 2000).

Um bom exemplo da função catalítica das ADAMs é o papel desempenhado pela ADAM17 (ou TACE). Esta proteína foi o primeiro membro da família ADAM a ter sua atividade estudada, mostrando sua importante contribuição na ativação do fator de necrose tumoral α (TNF α) através da clivagem de seu precursor na membrana (Black et al., 1997; Moss, Jin, Milla, et al., 1997). Outras moléculas clivadas pela ADAM17 são: a proteína precursora amilóide (APP), o fator de crescimento de transformação α (TGF α), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento epidermal ligante de heparina (HB-EGF), a proteína Notch, o receptor ErbB4, os receptores I e II para TNF, e muitas outras (Alfandari et al., 2009; Blobel, 2005; Edwards et al., 2008). A ADAM10 é outro membro da família ADAM muito bem caracterizado quanto a sua atividade proteolítica. Esta proteína possui um

importante papel no desenvolvimento neurológico através da ativação proteolítica do receptor de Notch e clivagem de seu ligante Delta (Edwards, et al., 2008). Outros substratos da ADAM10 incluem: a proteína precursora amilóide (APP), o fator de crescimento epidermal (EGF), a proteína príon celular (PrPC), o receptor do fator de crescimento epidermal ERBB2 (HER2/neu), dentre outros (Liu et al., 2006; Postina et al., 2004; Reiss & Saftig, 2009; Sahin et al., 2004; Vincent et al., 2001).

É interessante notar que diferentes membros desta família podem processar o mesmo substrato, e da mesma maneira, uma única ADAM pode processar diferentes substratos. A atividade proteolítica das ADAMs é inibida pelo pró-domínio, uma sequência de aminoácidos contendo um resíduo de cisteína altamente conservado que se liga ao zinco no sítio ativo da enzima, impedindo a catálise do substrato (modelo de “Cysteine Switch” de ativação/repressão da atividade das metaloproteases) (Springman et al., 1990; Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Foi comprovado que o modelo de Cysteine Switch é importante na inibição da atividade da ADAM12 (Loechel et al., 1999), mas não da ADAM17 (Leonard et al., 2005). A clivagem do pró- domínio das ADAMs é feita por uma furina, ainda dentro do complexo de Golgi (Loechel et al., 1998; Moss et al., 1997).

As ADAMs são as únicas proteínas de superfície celular que atuam tanto na proteólise quanto em processos de adesão (Seals & Courtneidge, 2003). O domínio de disintegrina presente nas ADAMs é responsável pela adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, agindo como ligante de integrinas na superfície celular (Sagane et al., 1998). As disintegrinas foram inicialmente descritas como proteínas solúveis e pequenas, que fazem parte do veneno da cobra *Viperidae*, interferindo eficientemente na agregação de plaquetas através da sua ligação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Essa ligação ocorre via sequência RGD (Arg-Gly-Asp), e resulta no

impedimento da ligação das plaquetas com seus ligantes naturais, tal como o fibrinogênio.

Nas disintegrinas de veneno de cobra, a seqüência RGD se encontra dentro de um extenso e flexível *loop*, que junto com as regiões adjacentes forma o domínio de ligação à integrina, no entanto, somente a ADAM15 humana contém a seqüência RGD em seu domínio de disintegrina (Kratzschmar et al., 1996). Zhang e colaboradores (Zhang et al., 1998) determinaram a especificidade da interação desta ADAM com a integrina $\alpha\beta_3$, dependente do domínio RGD, sugerindo o envolvimento da ADAM15 nos processos de adesão célula-célula mediados por $\alpha\beta_3$. Eto e colaboradores (Eto et al., 2002) verificaram que além da interação com $\alpha\beta_3$, a ADAM15 interage com a integrina $\alpha_9\beta_1$ de uma maneira independente de RGD, mas dependente da seqüência (RX6DLPEF), localizada próxima à seqüência RGD no domínio de disintegrina. Essa nova seqüência também é encontrada nos outros membros desta família, com exceção das ADAMs 10 e 17.

Alguns experimentos mostram a relação entre ADAMs e integrinas indicando o seu papel na adesão e migração celular. Por exemplo, foi visto que a interação entre ADAM17 e a integrina $\alpha_5\beta_1$ em células HeLa inibe a migração celular (Bax et al., 2004; Huang et al., 2005). Em outro ensaio, foi observado que a expressão de ADAM12 inibe a migração celular através da ligação com $\alpha_4\beta_1$, aparentemente de uma maneira independente da atividade de metaloprotease (Huang, et al., 2005). Em 2005, Beck e colaboradores (Beck et al., 2005) determinaram a ação da ADAM15 como inibidora da interação célula-matriz mediada por integrina $\alpha\beta_3$ em ensaios de adesão celular com linhagens tumorais de ovário. Nath e colaboradores (Nath et al., 1999) haviam verificado em 1999, que a super-expressão da ADAM15 nessas células resulta na diminuição da adesão à vitronectina e diminui a mobilidade

celular. Por outro lado, os ensaios realizados por Huang e colaboradores (Huang, et al., 2005) mostraram que a interação da ADAM9 com a integrina $\alpha 6\beta 1$ aumentou a migração celular, e esta mesma ADAM, em sua forma alternativa solúvel, é responsável pelo fenótipo altamente invasivo numa variedade de linhagens celulares, através de sua interação com $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 2\beta 1$ (Mazzocca et al., 2005).

1.3 ADAMs e Câncer

Alterações no padrão de expressão de vários membros da família ADAM têm sido observadas em diferentes tipos de tumores e relacionadas com o desenvolvimento e progressão tumoral (Arribas et al., 2006; Mochizuki & Okada, 2007) (tabela 1). Alguns exemplos são: a super-expressão da ADAM10, que promove o crescimento de neoplasias orais e gástricas (Ko et al., 2007); a super-expressão da ADAM 9, que foi descrita em câncer de mama, pâncreas, fígado e estômago e pode estar envolvida no desenvolvimento de tumores através da ativação do EGFR (receptor para o fator de crescimento epidermal) (Peduto et al., 2005) e também da interação com a integrina $\alpha 6\beta 4$ (Mazzocca, et al., 2005); a ADAM17, que é super expressa em uma variedade de tumores, incluindo câncer de mama, câncer de ovário e carcinoma renal (Lendeckel et al., 2005; Roemer et al., 2004; Tanaka et al., 2005); e a super expressão da ADAM12 em câncer de mama (Kveiborg et al., 2005).

Tabela 1- Expressão das ADAMs humanas em diferentes tipos de tumores.

▲: Expressão aumentada; ▼: expressão diminuída; + possui atividade proteolítica; - não possui atividade proteolítica;

ADAM	Sequência Referência	Atividade Proteolítica	Expressão em tumores	Funções em tumores
ADAM2	NM_001464.3	-		
ADAM6	AK093400.1	-		
ADAM7	NM_003817.2	-	▲	Melanomas
ADAM8	NM_001109.3	+	▲	Pulmão, Rim, Cérebro, Próstata, Pâncreas, Cabeça e Pescoço
ADAM9	NM_003816.2	+	▲	Mama, Pâncreas, Estômago, Pele, Fígado, Pulmão, Próstata, Melanoma, Rim, Cérvix,
ADAM10	NM_001110.2	+	▲	Cavidade oral, Estômago, Ovário, útero, Cólon, Leucemia, Próstata, Melanoma, Pâncreas
ADAM11	NM_002390.4	-		
ADAM12	NM_003474.3	+	▲	Cérebro, Mama, Fígado, Estômago, Cólon, Pulmão, Bexiga, Melanoma, Laringe
ADAM15	NM_207191.1	+	▲	Mama, Próstata, Pulmão, Estômago, Pâncreas, Melanoma
ADAM17	NM_003183.4	+	▲	Mama, Ovário, Rim, Cólon, Próstata, Pulmão, Fígado, Estômago, Pâncreas, Melanoma, Cabeça e pescoço
ADAM18	NM_014237.1	-		
ADAM19	NM_023038.3	+	▲	Cérebro, Rim, Endométrio, Ovário
ADAM20	NM_003814.4	+	▲	Estômago
ADAM21	NM_003813.2	+		
ADAM22	NM_004194.2	-	▼	Cérebro
ADAM23	NM_003812.2	-	▼	Cabeça e pescoço, Mama, Estômago, Colorectal, Pâncreas
ADAM28	NM_014265.4	+	▲	Mieloma
ADAM29	NM_014269.3	-	▲	Pulmão, Mama, Rim, Cabeça e pescoço, Condrosarcoma, Bexiga
ADAM30	NM_021794.2	+		
ADAM32	NM_145004.4	-		
ADAM33	NM_025220.2	+	▲	Estômago,
			▼	Mama

Clivagem de IGFBP-3, proliferação celular, metástase
Adesão celular

Proliferação e Migração celular através da regulação de IL-18

Algumas proteínas da família ADAM também estão relacionadas com o desenvolvimento de melanomas humanos. Por exemplo, foi visto que as ADAMs 10 e 17 estão mais expressas em cortes histológicos de melanomas do que em tecido normal de pele (Anderegg et al., 2009). Outro estudo também demonstrou que a ADAM10 é mais expressa em metástases de melanoma humano do que em melanomas humanos primários (Lee et al., 2010). Singh e colaboradores demonstraram a superexpressão das ADAMs 9, 10, 12, 15, e 17 em mais de 10 linhagens de melanomas humanos, através de hibridização em arrays de cDNA (Singh et al., 2009). Zigrino e colaboradores também demonstraram a superexpressão da ADAM9 na periferia de melanomas humanos através de imunohistoquímica (Zigrino et al., 2005). E mais recentemente, uma análise de mutação das ADAMs em amostras de melanomas revelou mutações freqüentes das ADAMs 7 e 29 nestas amostras, relacionadas com alteração da adesão celular e aumento da capacidade migratória destas células (Wei et al., 2011).

Em gliomas, a maioria dos estudos realizados aponta a importância da atividade proteolítica das ADAMs na progressão do tumor. Wildeboer e colaboradores (Wildeboer et al., 2006) usaram substratos específicos para ADAM8 e ADAM19, e demonstraram que os níveis de expressão e a atividade proteolítica dessas ADAMs estão correlacionados com a atividade invasiva nas amostras de gliomas humanos analisadas. He e colaboradores (He et al., 2011) mostraram que a super expressão da ADAM8 em amostras de gliomas está relacionada com um mau prognóstico clínico. Em experimentos realizados nas linhagens tumorais, 9L (gliosarcoma de rato) e U87 (glioma humano), foi visto que a ADAM17 tem sua expressão aumentada sob condições de hipóxia, e que a sua atividade está correlacionada com o aumento da capacidade de invasão tumoral, e a ativação do

EGFR (Zheng et al., 2007). Outras ADAMs também são relacionadas com a progressão tumoral em gliomas, através da clivagem de substratos importantes, como o CD44, que é clivado pela ADAM10 e contribui para a migração e invasão das células de linhagem de glioblastoma humano, U251MG (Murai et al., 2004) e o HB-EGF (fator de crescimento ligado a heparina EGF-like), que é altamente expresso em glioblastomas humanos e parece estar envolvido na proliferação desse tumor após clivagem pela ADAM12 (Kodama et al., 2004).

A atividade de disintegrina das ADAMs também parece estar envolvida na progressão dos gliomas. Em 2006, D'Abaco e colaboradores (D'Abaco et al., 2006) observaram a expressão da ADAM22 em tecido cerebral normal e em alguns gliomas de baixo grau, mas não observaram sua expressão em gliomas de alto grau de malignidade. A expressão de ADAM22 foi capaz de inibir a proliferação celular dos gliomas *in vitro*, através de interações com a integrina $\alpha\beta 3$ e dímeros de integrinas contendo $\alpha 6$ ou $\alpha 9$ (D'Abaco, et al., 2006).

De maneira geral, as ADAMs atuam na progressão de diferentes tipos de tumores através da modulação fisiológica da expressão de proteínas de superfície celular, seja através da atividade de metaloprotease dessas proteínas, induzindo aumento de proliferação e migração celular através da clivagem de seus substratos, ou através de seu domínio de disintegrina, modulando o controle de adesão e migração celular via interação com moléculas de adesão e integrinas (Anderegg, et al., 2009; Lee, et al., 2010; Singh, et al., 2009).

1.4 ADAM23 e seus parceiros moleculares

O alvo dos estudos funcionais deste trabalho é a proteína ADAM23 (ou MDC3). O gene que codifica essa proteína é bastante expresso no SNC (principalmente no hipocampo e cerebelo) e no coração (Ghilardi et al., 2008; K. Sagane, et al., 1998; Sun et al., 2004). Em ratos, foi observado que esse gene é expresso em todos os estágios do desenvolvimento pós-natal e há indícios de que a proteína ADAM23 esteja envolvida com o desenvolvimento neuronal (Y. Sun et al., 2007). O papel de ADAM23 durante o desenvolvimento embrionário é importante, visto que animais com mutações em ambos os alelos do gene ADAM23 são inviáveis após o nascimento (K. Mitchell et al., 2001).

Sun e colaboradores (Sun, et al., 2004) caracterizaram dois transcritos adicionais do gene ADAM23, gerados por splicing alternativo e denominados ADAM23 β e ADAM23 γ , em adição à isoforma ADAM23 α inicialmente descrita (K. Sagane, et al., 1998). ADAM23 β difere-se de ADAM23 α em alguns dos aminoácidos que formam o domínio transmembrana, compartilhando 54% (13 de 24 resíduos) de similaridade neste domínio. ADAM23 γ difere-se de ADAM23 α e ADAM23 β pela ausência do domínio transmembrana e cauda citoplasmática, o que sugere que esta isoforma é secretada. Esses transcritos também são expressos em altos níveis no SNC e diferencialmente expressos durante o desenvolvimento cerebral, sugerindo papéis funcionais diferentes para cada isoforma (Sun, et al., 2004).

O domínio metaloproteinase de ADAM23 encontra-se inativo pela ausência de três resíduos de histidina e um resíduo de ácido glutâmico, essenciais para a atividade enzimática, sugerindo-se que a função biológica de ADAM23 seja modulada principalmente por seu domínio de disintegrina (Sagane, et al., 1998). Neste aspecto foi descrita a interação do domínio de disintegrina da ADAM23 com a

integrina $\alpha\beta 3$, mediada pela sequência de aminoácidos (AVNECDIT) (Cal et al., 2000). Este estudo mostrou que a interação entre ADAM23 e $\alpha\beta 3$ é específica e resulta em adesão celular, que é bloqueada com o uso de anticorpos anti- $\alpha\beta 3$. Neste contexto, Goldsmith e colaboradores verificaram que a proteína ADAM23 está predominantemente localizada nos sítios de contato intercelular, e medeia interações célula-célula no SNC de mamíferos (Goldsmith et al., 2004).

Outros parceiros moleculares de ADAM23 recentemente descritos são dois membros da família LGI (do inglês, *Leucine-rich glioma inactivated*), LGI-1 e LGI4 (Piepoli et al., 2006; Sagane et al., 2008) e a Proteína Prion Celular (PrPC) (Costa et al., 2009). Embora LGI-1 e LGI4 também interajam com as ADAMs 11 e 22 (Owuor et al., 2009; Sagane, et al., 2008), foi demonstrado que ADAM23 é o principal receptor para LGI1, pois na ausência de ADAM23, o crescimento de neuritos *in vitro* mediada por LGI1 é bastante diminuído assim como, a arborização dendrítica (Owuor, et al., 2009). A Proteína Prion Celular é outra proteína que interage com ADAM23. Foi demonstrado que PrPC e ADAM23 se co-localizam na membrana plasmática de neurônios hipocâmpais de camundongos e células de neuroblastomas, e que sua interação é direta e mediada pelo domínio de desintegrina da ADAM23 (Costa, et al., 2009). Estes dados sugerem possíveis papéis regulatórios de ADAM23 sobre os processos biológicos modulados por estes ligantes, mas poucas evidências sobre a real função fisiológica de ADAM23 foram apresentadas.

1.5 Expressão da ADAM23 em tumores

Em trabalhos publicados por nosso laboratório verificamos que o promotor do gene ADAM23 está hipermetilado em linhagens tumorais e tumores primários de mama, associando-se esta metilação com a ausência de expressão do RNA

mensageiro e da proteína ADAM23 (Costa et al., 2004; Verbisck et al., 2009). Além disso, foi observado que a frequência de metilação do gene ADAM23 é maior entre tumores de estágios mais avançados e que esses tumores apresentam uma maior densidade de metilação na região promotora do gene ADAM23, sugerindo que a expressão deste gene seja epigeneticamente inibida durante a progressão tumoral (Costa, et al., 2004). Em uma análise posterior e mais detalhada, analisamos o perfil de metilação de duas regiões (região 1 e 2) localizadas *upstream* ao sítio de início da transcrição do gene ADAM23, em 94 tumores ductais invasivos de mama. A hipermetilação na região 1 do promotor da ADAM23 foi verificada em 31% dos casos e na região 2 em 15% dos casos, sendo que 8,5% dos casos apresentaram hipermetilação nas duas regiões (Verbisck, et al., 2009).

A presença de metilação nessas regiões foi associada a uma pior evolução da doença e ao desenvolvimento de metástase à distância nas pacientes incluídas no estudo. A análise univariada revelou a taxa de sobrevida livre de metástases e sobrevida global específica em 5 anos das pacientes com o gene ADAM23 hipermetilado em uma das regiões eram significativamente menor do que as que não apresentaram ADAM23 hipermetilada. Pacientes que apresentaram hipermetilação nas duas regiões do gene ADAM23 tiveram um pior prognóstico em relação às pacientes que apresentaram apenas uma região hipermetilada ou ausência de metilação nas duas regiões (Verbisck, et al., 2009).

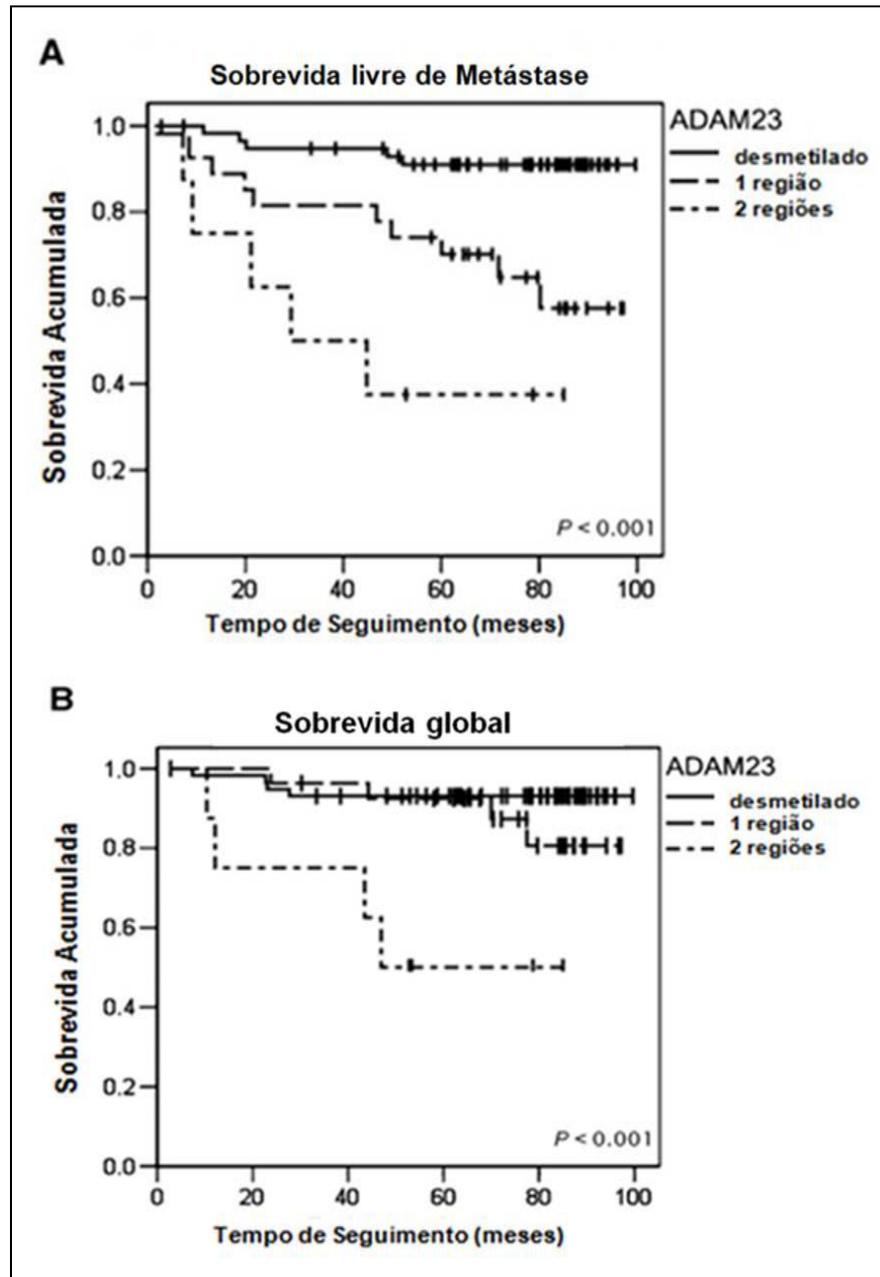


Figura 2- Curvas de sobrevida de acordo com o perfil de metilação das 2 regiões de ilhas de CpG upstream ao gene ADAM23. A estratificação em 3 grupos mostra a sobrevida quando as regiões estão desmetiladas, quando somente 1 região está metilada ou quando as 2 regiões se encontram metiladas. Foi utilizado o método de Kaplan-Meier. A, Sobrevida livre de metástase. B, Sobrevida global. *Figura publicada por Verbisck e colaboradores, Cancer Research, Junho de 2009.*

Na análise multivariada, a hipermetilação deste gene se revelou um fator prognóstico independente das demais variáveis para a sobrevida livre de metástases e sobrevida global específica em 5 anos. Pacientes que apresentaram ADAM23 hipermetilada nas duas regiões tiveram um risco aproximadamente 10 vezes maior de desenvolver metástases e de morrer em decorrência da doença do que as que não apresentaram metilação (Verbisck, et al., 2009). Estes resultados demonstram que a hipermetilação do gene ADAM23 está fortemente associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama e sugerem que o silenciamento da ADAM23 possa ser utilizado como um marcador molecular de prognóstico em câncer de mama.

O silenciamento de ADAM23 também foi relatado em outros tipos de tumores. Em 2005, Takada e colaboradores (Takada et al., 2005) observaram em seus ensaios de CGH-array (*Array-based comparative genomic hybridization*) que 3,1% das linhagens celulares de câncer gástrico e 2,6% dos tumores gástricos primários analisados apresentavam deleção homozigota de ADAM23 (2q 33.3). Foi verificado que a expressão de ADAM23 estava ausente ou bastante reduzida no restante das linhagens celulares analisadas, sendo restaurada após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina. A análise do perfil de metilação da região promotora de ADAM23 mostrou que esta região estava hipermetilada em 61,3% das linhagens celulares e em 43,8% dos tumores primários analisados.

Um estudo que analisou a presença de hipermetilação em ilhas CpG de tumores pancreáticos mostrou que ADAM23 estava hipermetilada em 57% das linhagens tumorais pancreáticas e em 29% dos tumores primários. A hipermetilação foi relacionada com a redução da expressão de ADAM23, visto por meio de RT-PCR

quantitativo, e o tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina restaurou a expressão de seu mRNA (Hagihara et al., 2004).

A hipermetilação da região promotora de ADAM23 também foi observada em tumores de cabeça e pescoço (42% das amostras), sendo que quando analisados os tumores de laringe separadamente, foi possível constatar uma associação entre a presença de ADAM23 hipermetilada e estágios mais avançados do tumor (estágios 3 e 4), sugerindo um papel para ADAM23 na tumorigênese de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2007).

Mais recentemente, Choi e colaboradores (Choi et al., 2009) observaram uma associação entre a redução da expressão de ADAM23 e a hipermetilação de sua região promotora em linhagens e amostras de câncer coloretal. Das 31 linhagens celulares analisadas, 28 (88%) não expressavam ou expressavam muito pouco mRNA de ADAM23, e 91% destas linhagens estavam hipermetiladas na região promotora deste gene. Quando amostras de tumores coloretais foram analisadas por MSP (*Methylation Specific PCR*), 47% estavam hipermetiladas para ADAM23.

Em 2011, Bret e colaboradores (Bret et al., 2011) analisaram a expressão de ADAMs em amostras de mieloma múltiplo e outras células da medula óssea. Este estudo mostrou que as células plasmáticas normais da medula óssea não expressam ADAM23 e o mesmo foi visto para a maioria das amostras primárias de mieloma múltiplo. No entanto, uma minoria das amostras de mieloma múltiplo apresentou uma expressão aberrante de ADAM23 e esta expressão foi relacionada com um mau prognóstico da doença em 2 séries independentes de pacientes.

1.6 Evidências da função biológica de ADAM23 em tumores

Funcionalmente, a proteína ADAM23 atua como uma molécula de adesão e interage especificamente com quatro diferentes ligantes de membrana descritos, ambos muito expressos em diversos tecidos, incluindo GBMs: LGI1, LGI4 (Piepoli, et al., 2006; Sagane et al., 2008), PrPC (Costa et al., 2009) e a integrina $\alpha\beta 3$ (Cal et al., 2000), portanto, é possível que o silenciamento de ADAM23 esteja relacionado com alterações nas propriedades funcionais mediadas por estes ligantes.

Em um trabalho recente publicado por nosso grupo, utilizando a linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 como modelo, foram gerados derivados clonais que não expressavam níveis detectáveis de mRNA para este gene utilizando a metodologia de siRNA (aqui denominados 435-siRNA) (Verbisck et al., 2009). Ensaios de adesão e migração celular *in vitro* evidenciaram que as células 435-siRNA apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes na avidéz celular para proteínas purificadas de matriz ligantes de $\alpha\beta 3$ (em baixas concentrações) e um aumento de aproximadamente 4 vezes em sua capacidade migratória em relação às células parentais ou às células transfectadas com o vetor vazio (Verbisck et al., 2009). Estes efeitos celulares foram atribuídos a um aumento dos níveis da integrina $\alpha\beta 3$ na conformação ativa induzido pela ausência da expressão do ligante ADAM23, sugerindo que ADAM23 pudesse atuar como um modulador negativo da atividade desta integrina (Verbisck et al., 2009).

Neste mesmo trabalho, ensaios de parada pulmonar (do inglês, “*pulmonary tumor cell arrest*”) foram realizados a fim de avaliar a capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 *in vivo* em função da expressão de ADAM23. Para tanto, foram injetadas células MDA-MB-435 ou 435-siRNA na veia lateral caudal de camundongos imunodeficientes Scid/CB17. Após 4 horas foi observado um maior

seqüestro pulmonar das células 435-siRNA, sugerindo que na ausência de ADAM23 a linhagem MDA-MB-435 apresenta uma maior parada nos capilares sanguíneos pulmonares, o que pode refletir uma maior capacidade metastática destas células *in vivo* (Verbisck et al., 2009). Estes resultados sugerem um íntimo envolvimento do gene ADAM23 com o controle da progressão dos tumores de mama e, possivelmente, com etapas do processo de formação de metástases.

No entanto, em experimento *in vivo* realizado em camundongos imunodeficientes Balb/c Nude, as células 435-siRNA demonstraram ter um potencial tumorigênico menor do que as células MDA-MB-435. Após 10 semanas da inoculação das células intradermicamente no dorso dos animais somente 5 de 15 (33%) animais do grupo ADAM23 negativo desenvolveram tumores palpáveis, enquanto que 14 de 15 (93%) dos animais do grupo ADAM23 positivo o fizeram. Um terceiro grupo de animais inoculados com uma mistura de 1/1 de células 435-siRNA e MDA-MB-435 (denominado grupo ADAM23 heterotípico) apresentou tumores em 10 de 11 (91%) animais injetados (Costa et al., manuscrito em preparação). Além disso, a cinética de crescimento dos tumores ADAM23 negativos foi significativamente menor do que a dos outros dois grupos, com uma inibição de crescimento de 60-70% (Costa et al., manuscrito em preparação).

Curiosamente, em outro ensaio tumorigênico *in vivo*, as células foram injetadas no *fat pad* mamário de fêmeas Balb/c Nude e os tumores foram retirados quando alcançaram 1 cm de diâmetro. Os animais foram mantidos vivos ainda por 60 dias após a excisão dos tumores e então sacrificados e analisados quanto à ocorrência de metástases no pulmão. As metástases macroscópicas foram observadas em 55% (11/20) dos animais do grupo heterotípico, 36% (5/14) nos animais do grupo ADAM23 positivo e 22% (2/9) nos animais do grupo ADAM23

negativo (Costa et al., manuscrito em preparação). Esses resultados indicam que a heterogeneidade de ADAM23 nos tumores pode aumentar o potencial metastático além de compensar a deficiência proliferativa das células ADAM23 negativas, o que sugere a existência de um mecanismo de cooperação celular entre células ADAM23 positivas e negativas.

Neste ponto, tornou-se fundamental validar a associação entre o silenciamento do gene ADAM23 em tumores primários e a progressão e agressividade da doença, bem como encontrar um modelo celular alternativo para a realização de ensaios funcionais que comprovassem o envolvimento do gene ADAM23 na proliferação, adesão, migração, e invasão celular e a existência de cooperação celular entre células ADAM23 positivas e negativas.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste em estabelecer uma relação causal entre a redução dos níveis de expressão do gene ADAM23 e a progressão tumoral em modelos celulares de glioma (U87MG) e melanoma (SKmel-37).

2.2 Objetivos específicos

- 1- Analisar a expressão da ADAM23 em amostras de gliomas de diferentes graus através de PCR em Tempo Real correlacionando sua expressão com a progressão tumoral;
- 2- Analisar os possíveis mecanismos responsáveis pela redução da expressão de ADAM23 em GBM;
- 2- Gerar células U87MG e SKmel-37 com expressão reduzida de ADAM23 através da técnica de RNAi e caracterizá-las quanto aos níveis de expressão de ADAM23 comparativamente com as células controle (vetor vazio e parental) por PCR em Tempo Real;
- 3- Analisar os efeitos de ADAM23 no comportamento proliferativo, adesivo, migratório e invasivo das células U87MG-siRNA e SKmel-37-siRNA *in vitro*;
- 4- Analisar a capacidade tumorigênica e o efeito proliferativo de ADAM23 no modelo de SKmel-37 *in vivo*;
- 5- Verificar o efeito da cooperação entre as células ADAM23 positivas e negativas em ensaios de proliferação e invasão celular;

3- METODOLOGIA

3.1 Análise da expressão da ADAM23 em Gliomas

3.1.1 Amostras de gliomas

Todas as amostras de pacientes utilizadas neste estudo foram obtidas através de colaboração com o grupo da Professora Suely Marie do LIM15 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes e aprovação do comitê de ética da Instituição. Para a realização do estudo da expressão de ADAM23 foram selecionadas 18 amostras de glioma grau I, 20 amostras de glioma grau II, 16 amostras de glioma grau III e 46 amostras de glioma grau IV. As 10 amostras não tumorais de cérebro utilizadas como referência foram obtidas de peças cirúrgicas de pacientes em tratamento para epilepsia.

3.1.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os procedimentos foram realizados com materiais próprios para uso exclusivo de RNA. A coloração do gel de agarose foi feita utilizando-se o reagente GelRed (Biotium, Inc) , que foi visualizado em luz ultravioleta. Foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S evidentes, sendo a primeira banda duas vezes mais intensa do que a segunda.

A quantificação do RNA foi feita pela leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que DO 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm

foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas.

3.1.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada empregando-se o sistema da SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200U da enzima transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen), utilizando 250ng do iniciador oligo (dT) e 50ng de random primers (Invitrogen) em uma reação com volume final de 20 μ l contendo tampão 1X da transcriptase reversa, 40U de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen), 5mM de DTT e 500 μ M da mistura de todos os dNTPs. Inicialmente, uma mistura contendo RNA, água, dNTPs e iniciadores foi incubada a 65°C por 5 minutos para abertura de possíveis estruturas secundárias nas moléculas de RNA. Em seguida, foram adicionados à mistura os demais reagentes e esta foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguindo-se a síntese de cDNA a 50°C por 60 minutos. Por fim, a inativação da enzima foi conduzida a 72°C por 15 minutos.

3.1.4 PCR em Tempo Real das amostra de gliomas

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystem) utilizando o sistema de *Syber Green* para detecção. Para cada amostra foram feitas duplicatas contendo: 3 μ l de cDNA (diluído 1:50), 3 μ l de primers (senso e antisenso, 200 nM) e 6 μ l de *SyberGreen*. As amostras foram amplificadas em 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de anelamento e amplificação a 60°C. Em seguida foi feita uma curva de dissociação com 15 segundos a 95°C seguidos de 30 segundos a 60°C e outros 15

segundos a 95°C. A especificidade das reações foi avaliada através de curva de dissociação e gel de poliacrilamida. A sequência dos primers utilizados foi;

Forward - 5' CCA CTC GAT TCC AAG GGT AAA GT 3'

Reverse - 5' ATG CAG GTG GCT TCA TTA CTA CAC 3'

Para avaliar a expressão diferencial foi utilizado o método de quantificação relativa, adotando como amostra de referência um *pool* de amostras de cDNA de cérebro normal e como genes normalizadores a β -actina, HPRT, BCRP e Gus β . O programa GeNorm foi utilizado para determinar os genes normalizadores mais estáveis, e gerar fatores de normalização de expressão para cada amostra. Para o cálculo da expressão relativa foi adotada a fórmula proposta por Pfaffl (Pfaffl, 2001) que leva em consideração a eficiência de amplificação dos primers no cálculo da expressão relativa. Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste t de Student não pareado bicaudal.

3.2 Análise dos possíveis mecanismos responsáveis pela inativação do gene

ADAM23 em gliomas

3.2.1 Análise do padrão de metilação do DNA da região promotora do gene ADAM23

O DNA genômico foi extraído através do método convencional de fenol/clorofórmio (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). A qualidade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro (O.D. 260 e 280 nm) e visualização em gel de agarose 1 %.

Os DNAs das amostras de gliomas foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio de acordo com Herman e colaboradores (Herman, Graff,

Myohanen, Nelkin, & Baylin, 1996). Para o sequenciamento, as amostras tratadas com o bissulfato de sódio foram amplificadas por PCR *nested* e clonadas como descrito por Costa e colaboradores (Costa et al., 2004). A seguir 10 clones de cada amostra foram seqüenciados de acordo com a técnica descrita por Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando-se o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems). Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.2.2 Ensaio de detecção de mutação do gene ADAM23 em amostras de glioblastomas humanos

Para o ensaio de detecção de mutação do gene ADAM23, foram sintetizados pares de oligonucleotídeos nas regiões intrônicas que flanqueiam cada exon do gene e incluem os sítios doadores e aceptores de splicing. Para cada par de primer o senso ou o antisenso continha uma sequência de nucleotídeos complementar ao primer M13/puc para facilitar o sequenciamento. Para a amplificação dos exons 1 ao 27 (com exceção dos exons 23 e 25) foram utilizadas as mesmas sequências de primers já descritos para essa finalidade (Sjoblom et al., 2006). Os exons 23 e 25 foram amplificados com as sequências descritas abaixo, com a sequência correspondente ao vetor M13/puc sublinhada:

Tabela 2- Sequencia dos primers para a amplificação dos exons 23 e 25 da sequência genômica da ADAM23.

Primer	Sequencia
Exon 23 F	5' <u>GTA AAA CGA CGG CCA GTG</u> CCT CTT CGG TTT TGT GAA G 3'
Exon 23 R	5' GGC TAG GAG AAT GGC TGA AA 3'
Exon 25 F	5' <u>GTA AAA CGA CGG CCA GTT</u> AGG GTG TGC AGA ATT TGA AGG 3'
Exon 25 R	5' ATA TCG GAA GCA CAC CCA GT 3'

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 12,5 µl contendo 0,5 U de Taq Platinum (Invitrogen), 10 ng de DNA genômico, 1,25 µl de tampão correspondente, 1,4 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTP, 0,4 µM de primer senso e 0,4 µM de primer antisenso. A amplificação de cada amostra ocorreu em 35 ciclos de 40 segundos de desnaturação a 95°C, 40 segundos de anelamento a 60°C e 1 minuto de amplificação a 72°C.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação. Os produtos amplificados foram sequenciados de acordo com a técnica descrita por Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando-se o Kit *Big Dye terminator* (Applied Biosystems). Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.2.3 Análise da perda de heterozigose (LOH - Loss of Heterozygosity) do gene ADAM23 em amostras de gliomas

Para verificar se houve perda de heterozigose nas amostras de GBM, foram escolhidos três marcadores genéticos mapeados na região cromossômica 2q33, na qual o gene ADAM23 se localiza. Os marcadores escolhidos foram: D2S422, D2S369 e D2S2358 (Figura 3).

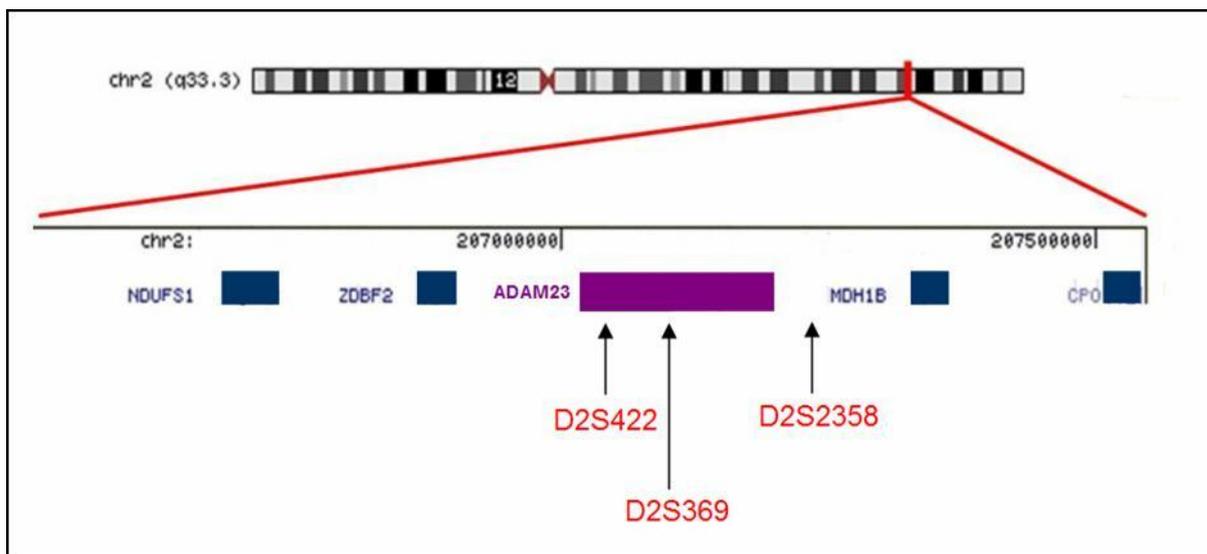


Figura 3- Região do cromossomo 2 mostrando o gene ADAM23 e os marcadores D2S422, D2S369 e D2S 2358.

Os marcadores foram amplificados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos que contém um fluoróforo na extremidade 5' do oligonucleotídeo forward. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas abaixo:

Tabela 3- Sequencia dos primers para a amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos marcadores da região cromossômica da ADAM23.

Primer	Sequencia
D2S422.forward	5' <u>6-FAM</u> GCTGGCATGATAAATTGCTT 3'
D2S422.reverse	5' AAATGGCCACTCCCTAAAAC 3'
D2S369.forward	5' <u>VIC</u> AGTTTTGACCACATGGC 3'
D2S369.reverse	5'CCTCAGGAAAGTTTTATATGTATG3'
D2S2358.forward	5' <u>PET</u> ACTTGGCCTCCTAAAGCACTAAGAT3'
D2S2358.reverse	5' GGCTAAACACCCAACACTTGAC 3'

Para a padronização das condições de amplificação de cada um dos fragmentos foram testadas três concentrações de DNA genômico (20 ng, 50 ng e 100 ng), duas concentrações de oligonucleotídeos (5 μ M e 10 μ M) e duas temperaturas de anelamento (55°C e 60°C).

Cada reação de PCR continha o DNA genômico, os oligonucleotídeos, 5 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen), 1X tampão correspondente, 2,5mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs e H₂O MilliQ para um volume final de 10 μ l. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos antes de serem submetidas a trinta ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C ou 60°C por 15 segundos e amplificação a 72°C por 30 segundos. No final da reação a enzima foi inativada por incubação a 72°C durante 10 minutos e as amostras foram mantidas a 4°C no escuro para evitar a perda da fluorescência. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo GelRed (Biotium, Inc) e visualizados sob luz UV.

Em seguida, os produtos dos PCRs foram diluídos (1:5, 1:10 e 1:15) e destas diluições 0,5 μ l foram adicionados à uma solução contendo 0,5 μ l do marcador (Liz 600 Size Standard, Applied) e 9 μ l de formamida (Hi-Di formamide, Applied). Estas soluções foram desnaturadas a 95°C por três minutos e imediatamente incubadas a 4°C até serem aplicadas no ABI 3130 para a separação dos fragmentos por eletroforese. A análise dos fragmentos foi feita utilizando o *GeneMapper[®] Software version 4.0* (Applied), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.4 Análise da expressão dos microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b em amostras de GBM

Para a análise da expressão de hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b nas 12 amostras de glioblastomas analisadas foram utilizados os kits *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total de cada amostra foi amplificado com o *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied) contendo oligonucleotídeos específicos para a síntese de cDNA dos microRNAs escolhidos. A reação de Real Time PCR foi realizada utilizando-se *TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (Applied) juntamente com os oligonucleotídeos e sondas específicos para cada microRNA fornecidos no kit da Applied.

Os controles endógenos utilizados foram os *small RNA nuclear* RNU44 e RNU6B. O programa GeNorm foi utilizado para determinar o gene de referência mais estável entre os 2 normalizadores testados, e gerar fatores de normalização de expressão para cada amostra. O nível de expressão dos microRNAs foi calculado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystem User Bulletin #2, PN4303859) (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen et al., 2000).

3.3 Silenciamento de ADAM23 por interferência de RNA nas linhagens U87MG e SKmel-37

3.3.1 Silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG com o vetor retroviral pRS-shRNA-ADAM23

Para silenciar o gene ADAM23 foi utilizado o vetor retroviral pSuper.retro.puro (OligoEngine). Esse vetor incorpora-se no genoma celular e induz a síntese de transcritos de siRNA (*small interference RNA*) pela RNA polimerase III, que

reconhece o promotor do gene H1-RNA contido no vetor. O transcrito de RNA resultante não é poliadenilado, e possui um sinal de término de transcrição que consiste em 5 timidinas em sequência. A clivagem do transcrito no sítio de término da transcrição ocorre depois da segunda uridina, formando um transcrito com dois 3' overhanging T ou U, como ocorre com os siRNAs sintéticos.

As regiões complementares ao gene ADAM23 foram clonadas no vetor de acordo com as instruções do fabricante. Essas construções foram selecionadas com o auxílio do programa OligoEngine e previamente testadas em linhagens tumorais de mama (Verbisck et al., 2009) obtendo-se silenciamento superior a 80% em relação a linhagem transfectada com o vetor vazio.

Os oligonucleotídeos (senso e antisenso) contendo as regiões complementares ao gene ADAM23 foram anelados e clonados no vetor, entre os sítios de Bgl II e Hind III, posicionando o oligo senso na posição correta *downstream* ao TATA box do promotor do gene H1, para gerar o siRNA duplex. A sequência desse oligo senso inclui a sequência de 19-nt correspondente ao gene ADAM23 nas duas orientações (senso e antisenso) separadas por uma sequência espaçadora de 9-nt. O transcrito resultante do vetor recombinante dobra-se sobre si mesmo formando uma estrutura em grampo com um loop. Estudos indicam que essa estrutura é rapidamente clivada dentro da célula para produzir um siRNA funcional.

Essas construções foram propagadas em bactérias, purificadas em média escala através de kits comerciais da Qiagen e sequenciadas de acordo com a técnica descrita por Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando-se o Kit *Big Dye terminator* (Applied Biosystems). Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

A construção pSuper.retro.RNAi-ADAM23 foi inserida em células empacotadoras anfotrópicas Phoenix através de transfecção utilizando-se o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou Fugene (Roche). Resumidamente 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de petri de 60 mm de diâmetro em meio DMEM contendo 10% SFB. Após 24 horas as células foram transfectadas com 5 µg do vetor vazio ou vetor contendo a sequência de ADAM23-RNAi em 10 µl de Lipofectamine 2000 ou Fugene 6 de acordo com as instruções do fabricante. No dia seguinte, o meio dessas células foi trocado por meio fresco e neste mesmo dia as células U87MG foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² na densidade de 2×10^5 células por garrafa, em meio DMEM contendo 10% de SFB.

Após 48 horas da transfecção das células empacotadoras Phoenix, o sobrenadante viral foi coletado e filtrado em filtro de 0.45 µm ou centrifugado por 3.000 rpm durante 3 minutos. Esse sobrenadante foi acrescido de Polibrene (8µg/ml). As células U87MG tiveram o seu meio aspirado e foram submetidas à incubação com o sobrenadante viral durante 24 horas. Essas mesmas células foram selecionadas com 1 µg/ml de Puromicina 48 horas após a transdução, e foram mantidas na presença do antibiótico por 14 dias.

As populações de células U87MG/pRS-ADAM23-RNAi selecionadas foram coletadas para extração de seu RNA e síntese de cDNA para a confirmação da redução nos níveis de expressão do gene ADAM23 através de PCR em Tempo Real.

3.3.2 Silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG com os duplexes de RNA de interferência (siRNA-ADAM23)

Os duplexes sintéticos de RNAi foram sintetizados (Integrated DNA technologies, IDT) baseados na mesma sequência siRNA-ADAM23 (*small interfering RNA*) contida nas construções plasmidiais.

As transfecções dos duplexes sintéticos de RNAi na linhagem U87MG foram realizadas utilizando-se o kit Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

Vinte e quatro horas antes da transfecção com os duplexes, 3×10^5 células foram plaqueadas em placas de 60 cm de diâmetro, em meio DMEM contendo 10 % de SFB. No dia da transfecção, 50nM ou 100 nM de RNAi foram incubados com 10 μ l de Lipofectamine RNAi Max em 0.5ml de meio Opti-MEM[®] durante 30 minutos à temperatura ambiente, para permitir a formação dos complexos RNAi-lipossomos. Em seguida, os complexos foram adicionados gentilmente sobre as células lavadas e mantidas em meio DMEM sem antibiótico contendo 10% de SFB.

As placas contendo as células transfectadas foram armazenadas em estufa a 37°C e os experimentos realizados 24 horas ou 48 horas após a transfecção. Em cada experimento realizado com as células transfectadas com os duplexes, uma amostra de células foi recolhida para a extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação da expressão da ADAM23 através de PCR em Tempo Real.

3.3.3 Silenciamento de ADAM23 com o vetor pAVU6+27-shRNA-ADAM23

na linhagem SKmel-37

Os vetores pAVU6+27-shRNA-ADAM23 (Verbisck, et al., 2009) ou pAVU6+27 (vetor vazio) foram utilizados para transfectar as células SKmel-37. As células foram transfectadas com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a seleção com G418 (1mg/ml) os clones foram isolados como descrito no item 3.4.2. O RNA dessas células foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA como descrito nos itens 3.1.2 e 3.1.3 e em seguida a expressão de ADAM23 foi analisada através de PCR em Tempo Real, como descrito no item 3.1.4, utilizando-se as células SKmel-37 como referência.

3.4 Ensaios funcionais

3.4.1 Cultura de células

As linhagens de glioma humano U87MG, melanoma humano SKmel-37 e a empacotadora viral Phoenix foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Manssas, VA, USA). As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO₂ (estufa de CO₂ - Forma Scientific).

As linhagens U87MG e Phoenix foram incubadas em meio DMEM contendo 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino) e quando necessário foram dissociadas com o auxílio de tripsina (solução 0,1% em PBS e 1mM de EDTA) sendo previamente lavadas com PBS (tampão fosfato contendo KCl 2,7mM, NaCl 137mM, Na₂PO₄ anidro 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, CaCl₂.2H₂O 0,68mM e MgCl₂.6H₂O 0,49mM, pH 7,2). A linhagem SKmel-37 foi mantida em meio RPMI com 10% de SFB.

O antibiótico Puomicina (Invitrogen) foi utilizado para a seleção (1 µg/ml) das células que receberam os plasmídeos pRS ou pRS-shRNA-ADAM23. O antibiótico

G418 (Invitrogen) foi utilizado para a seleção (1 mg/ml) e manutenção (0,3 mg/ml) das células SKmel-37 modificadas com o vetor pAVU6+27- shRNA

3.4.2 Isolamento de clones de células U87MG ou SKmel-37 e suas derivadas

As células foram submetidas à diluição limitante para isolamento de clones da seguinte maneira:

Trinta células foram ressuspensas em 10 ml de meio DMEM ou RPMI contendo 10% de SFB, e 100 µl foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Desta maneira era esperado que a cada 3 poços 1 contivesse 1 única célula. Cada poço foi observado e somente os poços que continham 1 única célula foram marcados e mantidos em incubação durante 2 semanas para crescimento dos clones. Os clones foram transferidos para placa de 48 poços, 24 poços e finalmente para garrafas de 25 cm². Os clones isolados foram coletados para extração de seu RNA e síntese de cDNA para a confirmação da redução nos níveis de expressão do gene ADAM23 através de PCR em Tempo Real.

3.4.3 Análise da expressão relativa do gene ADAM23 nas células U87MG ou SKmel-37 e suas derivadas

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystem) utilizando o sistema de *SyberGreen* para detecção. Para cada amostra foram feitas duplicatas contendo cada uma: 20 ng de cDNA, 5 µl de primers em concentração de 200 nM e 10 µl de *SyberGreen*, para um volume final de 20 µl de reação. As amostras foram amplificadas em 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de anelamento e amplificação a

60°C. Em seguida foi feita uma curva de dissociação com 15 segundos a 95°C seguidos de 30 segundos a 60°C e outros 15 segundos a 95°C. A especificidade das reações foi avaliada através de curva de dissociação e gel de poli(acrilamida).

Para avaliar a expressão diferencial do gene ADAM23 nos diferentes clones e populações de células foi utilizado o método de quantificação relativa, adotando a população de células selvagem ou a população de células contendo o vetor vazio como referência. O gene normalizador utilizado foi o GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) ou HMBS (*hydroxymethylbilane synthase*).

Tabela 4- Sequencia dos primers para a amplificação dos genes GAPDH e HMBS.

Primer	Sequencia
GAPDH F	5' GTC CAC TGG CGT CTT CAC CA 3'
GAPDH R	5' GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC 3'
HMBS F	5' GGC AAT GCG GCT GCA A 3'
HMBS R	5' GGG TAC CCA CGC GAA TCA C 3'

Para o cálculo da expressão relativa foi adotada a fórmula proposta por Pfaffl (2001) que leva em consideração a eficiência de amplificação dos primers no cálculo da expressão relativa.

3.4.4 Ensaio de FACS para análise dos níveis de ativação da integrina $\alpha\beta 3$

Para a análise dos níveis de ativação da integrina $\alpha\beta 3$ as células foram tripsinizadas, lavadas com meio 10% SFB e incubadas em estufa a 37°C durante 30 minutos para a recomposição das proteínas da membrana celular. Em seguida, 5×10^5 células foram incubadas na presença dos anticorpos LM609 (que reconhece os níveis totais da integrina $\alpha\beta 3$ presente na membrana, MAB1976, Chemicon

International), AP5 (que reconhece a integrina $\alpha\beta 3$ somente na sua forma ativada, GTI-N7P, GTI Diagnostics) ou P1F6 (que reconhece os níveis totais da integrina $\alpha\beta 5$ presente na membrana, ab24694, Abcam)

Para a incubação com o anticorpo LM609 (diluído 1:100), as células foram ressuspensas em 80 μ l de PBS gelado contendo 0,5 % BSA, para a incubação com o anticorpo AP5 (diluído 1:10), as células foram ressuspensas em 80 μ l de PBS gelado contendo 0,5 % BSA e 1,3 mM de CaCl_2 e para a incubação com o anticorpo P1F6 (diluído 1:1000) as células foram ressuspensas em 80 μ l de PBS gelado contendo 0,5 % BSA. As incubações foram realizadas no gelo durante 45 minutos.

Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 80 μ l de PBS gelado contendo o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com FITC (GE Healthcare) ou o anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao fluoróforo Alexa-488 (Molecular Probes), ambos diluídos 500 vezes em PBS. As amostras foram incubadas no gelo e no escuro durante 30 minutos e em seguida lavadas com PBS. O pellet de células foi ressuspensado em 500 μ l de PBS e imediatamente analisado no citômetro FACSCalibur, utilizando o programa Cell Quest (Becton Dickinson).

3.4.5 Ensaio de adesão celular *in vitro*

Os ensaios de adesão foram realizados em placas de 96 poços, tratadas previamente com os ligantes de interesse (vitronectina e colágeno). A preparação das placas com os ligantes foi feita 24 horas antes do ensaio, adicionando-se aos poços as soluções contendo vitronectina (5 μ g/ml) ou colágeno (5 μ g/ml) em meio DMEM sem soro. As placas permaneceram a 4°C durante toda a noite e em seguida

o meio contendo os ligantes foi aspirado e a solução de bloqueio (PBS contendo 2,5 % BSA) foi adicionada aos poços. A reação de bloqueio ocorreu a 37°C durante 1 hora, e em seguida os poços foram lavados com meio DMEM sem soro.

No dia do ensaio as células foram dissociadas com auxílio de tripsina, lavadas com DMEM ou RPMI sem soro duas vezes e em seguida 5×10^4 células foram adicionadas a cada poço da placa de 96 poços preparada anteriormente com os ligantes. A placa permaneceu em estufa a 37°C durante 2 horas e em seguida as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7 % e coradas com solução contendo 0.1% cristal violeta e 2% etanol. A quantificação das células aderidas foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, após a solubilização do corante das células em solução 2% SDS.

Nos ensaios com bloqueio das integrinas, as células foram incubadas com os anticorpos LM609 (que reconhece os níveis totais de $\alpha\beta3$ na membrana) e P1F6 (que reconhece os níveis totais de $\alpha\beta5$ na membrana) durante 20 minutos a 4°C antes de serem plaqueadas sobre os ligantes. Os ensaios foram realizados 3 vezes, com duplicatas de cada condição. O teste t de Student, não pareado e bicaudal foi utilizado para as análises estatísticas.

3.4.6 Ensaio de migração celular em *transwell*

Nos ensaios de migração, os insertos com poros de 8 μ m de diâmetro foram inseridos em placas de 24 poços, contendo 300 μ l de DMEM sem soro contendo 10 μ g/ml Vitronectina. A placa foi armazenada a 4°C durante 24 horas e em seguida foi tratada com solução de bloqueio (PBS contendo 2,5 % BSA). A reação de bloqueio ocorreu durante 1 hora a 37°C e em seguida os poços foram lavados com DMEM sem soro.

As células foram dissociadas com auxílio de tripsina, lavadas com meio sem soro duas vezes e em seguida 5×10^5 células foram adicionadas na parte superior do inserto. As células foram incubadas nessas condições em estufa a 37°C durante 7 horas e ao término do ensaio as células que não migraram, foram aspiradas. Os insertos foram transferidos para novos poços da placa de 24 poços, contendo $300 \mu\text{l}$ de solução de formaldeído 3,7 %, com o objetivo de fixar as células que migraram para a parte inferior do inserto. Após 20 minutos, as células foram lavadas com PBS, mergulhando os insertos delicadamente em um recipiente contendo PBS. A parte superior do inserto foi seca com o auxílio de um cotonete para remover as células que não migraram e o PBS.

Cada inserto foi colocado sobre $40 \mu\text{L}$ de DAPI (diluído 1000 vezes em PBS) e incubado no escuro durante 10 minutos. As células foram visualizadas em microscópio de luz UV e diferentes campos de cada poço foram fotografados e quantificados. Os ensaios foram realizados 3 vezes para cada condição. O teste t de student foi utilizado para a análise estatística.

3.4.7 Análise do ciclo celular das células U87MG/siRNA-ADAM23

As células U87MG foram transfectadas com os duplexes (como descrito no item 3.3.2) e 72 horas depois da transfecção as células foram lavadas com PBS contendo EDTA, soltas com o auxílio de tripsina e 1×10^6 células de cada condição foram fixadas com etanol 70 % durante 2 horas em freezer -20°C .

Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS sem EDTA, e incubadas em solução contendo 0,1% Triton X, $100 \mu\text{g/ml}$ de RNase A, e $50 \mu\text{g/ml}$ de Iodeto de Propídeo (PI). As células foram incubadas a 37°C , sob agitação

constante, durante 30 minutos e em seguida analisadas no citômetro FACSCalibur, utilizando o programa FlowJo.

3.4.8 Ensaio de proliferação bidimensional (monocamada)

Para os ensaios de proliferação 2D as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço, em placa de 24 poços. No dia seguinte (Dia 1) as células foram dissociadas com auxílio de tripsina, ressuspendidas em meio contendo Trypan Blue (para verificar viabilidade celular) e contadas em câmara de Neubauer. O mesmo procedimento se repetiu nos outros dias (Dias 2 a 5). Os ensaios foram realizados 3 vezes, com duplicatas de cada condição. A análise estatística da curva de proliferação foi feita utilizando-se o teste ANOVA one way.

3.4.9 Formação de esferóides

Para a formação de esferóides as células foram plaqueadas em superfície não aderente (1% agarose) por 48h. As células Skmel-37 e derivadas foram plaqueadas na densidade de 8×10^4 por poço em placa de 48 poços contendo cada um deles uma camada basal de 300 microlitros de 1% agarose já polimerizada. Dois dias depois os esferóides estavam prontos para utilização nos experimentos. Todas as células plaqueadas originaram um único esferóide/poço.

3.4.10 Ensaio de Invasão em colágeno

Para os ensaios de invasão, os esferóides gerados por células Skmel e suas derivadas foram inseridos em matriz de colágeno em baixa densidade (1,5 mg/ml) preparadas em placas de 48 poços. Cada poço continha uma camada basal de 300

µl de 1% agarose polimerizada e, sobre ela, 300 µl de matriz de colágeno. Os esferóides foram transferidos com pipetas imediatamente antes da matriz se solidificar. Após a solidificação da matriz de colágeno, foi adicionado 500 µl de meio em cada poço sobre ambas as camadas. Os esferóides foram fotografados imediatamente após a inserção na matriz, e nos dias posteriores para acompanhamento da invasão celular. O microscópio utilizado foi o Olympus IX70 e a câmera foi a Olympus DP30BW. As fotos foram tiradas em aumento de 40x ou 100x em resolução de 1360 x 1024 e analisadas pelo programa ImageJ para a medição da distância de invasão. Os ensaios foram realizados 3 vezes, com duplicatas de cada condição. O teste ANOVA one way foi utilizado para a análise estatística.

3.4.11 Ensaio de incorporação de MTT em *bead* de colágeno

Cada *bead* de colágeno foi formado com 10 µl de solução de 3 mg/ml colágeno contendo 1×10^4 células. Os 10 µl desta solução foram colocados em solução de óleo mineral e deixados por 30 minutos em temperatura ambiente até a polimerização do colágeno em forma de gota ou esfera (*bead*). Em seguida as *beads* foram lavadas com RPMI e incubadas em placas com coating de 1% agarose e meio R10 por 12 horas.

Em seguida as *beads* foram transferidas para poços de placa de 48 poços com coating de 1% agarose e 200 µl de R10 + 20 µl de MTT (Mosmann T. 1983). Após 4 horas de incubação em estufa a 37°C, retirou-se o meio e adicionou-se 300 µl de DMSO (dimetilsulfóxido). Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, usou-se 100 µl de cada poço para leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os ensaios foram realizados 3 vezes, com duplicatas de cada condição. O teste ANOVA one way foi utilizado para a análise estatística.

3.4.12 Ensaio tumorigênico em animais Balb/c Nude

Os 16 animais Balb/c Nude foram comprados do Biotério Central da FMUSP. Todos os experimentos com os camundongos foram conduzidos de acordo com os padrões éticos e a realização do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação Antônio Prudente. Foram injetadas 1 milhão de células SkvV (grupo ADAM23 positivo), Skcl2 (grupo ADAM23 negativo) ou 50% SkvV + 50% Skcl2 (grupo ADAM23 Heterogêneo 50%) em 50 µl de PBS intradermicamente na região dorsal esquerda de cada animal. A cada semana os tumores foram medidos com auxílio de paquímetro e a média de 2 diâmetros/tumor foi utilizada na curva de crescimento tumoral de cada grupo. Ao final de 52 dias os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. O teste ANOVA one way foi utilizado para a análise estatística.

3.4.13 Ensaio de Invasão em colágeno com esferóides heterotípicos

Para a realização deste ensaio as células SKmel/GFP foram produzidas através da transdução com o vetor pCLEGFP, gentilmente cedido pelo Dr Bryan Strauss (Incor/HCFMUSP). O protocolo de transdução foi mesmo descrito no item 3.1, alterando-se o vetor. As células foram selecionadas com 1 mg/ml de G418 durante 1 semana e analisadas em FACS para análise de sua fluorescência.

Em seguida os esferóides foram formados como já descrito no item 3.4.9 e o ensaio de invasão realizado como descrito no item 4.10. As fotos foram tiradas em aumento de 40x ou 100x em resolução de 1360 x 1024 e analisadas pelo programa ImageJ para a medição da distância de invasão. Os ensaios foram realizados 3 vezes, com duplicatas de cada condição. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística.

4- RESULTADOS

4.1 Análise da expressão do gene ADAM23 em Gliomas

A expressão do gene ADAM23 foi analisada em amostras de glioma através da técnica de PCR em Tempo Real. O cálculo da expressão relativa do gene ADAM23 nos gliomas foi realizado de acordo com a fórmula proposta por Pfaffl ((M. W. Pfaffl, 2001), que leva em consideração a eficiência de amplificação dos primers, que neste caso foi de 100% ($E=2$). A amostra referência utilizada foi um pool de amostras de cDNA de cérebro normal e os genes β -actina, HPRT, BCRP e Gus β foram utilizados para a geração de um fator de normalização de expressão para cada amostra pelo programa GeNorm.

As amostras de gliomas utilizadas para a análise do padrão de expressão do gene ADAM23 foram divididas em 4 grupos de acordo com o grau do tumor: 18 amostras de gliomas de grau I, 20 amostras de grau II, 16 amostras de grau III, 46 amostras de gliomas de grau IV, os glioblastomas (GBM) e 23 amostras não tumorais que foram obtidas de peças cirúrgicas de pacientes em tratamento para epilepsia.

A análise de expressão relativa da ADAM23 nesses tumores revelou uma diminuição estatisticamente significativa de aproximadamente 3 vezes nos tumores grau I ($p < 0,001$) e grau II ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo normal. A diminuição da expressão de ADAM23 foi ainda maior e igualmente significativa nos grupos de graus III ($p < 0,001$) e IV ($p < 0,001$), com expressão reduzida em 3,6 e 6,25 vezes, respectivamente, comparando-se ao grupo normal. Isto mostra uma correlação inversamente proporcional entre o nível de expressão desse gene e o

grau tumoral (Figura 4), ou seja, quanto maior o grau do tumor, menor a expressão do gene ADAM23.

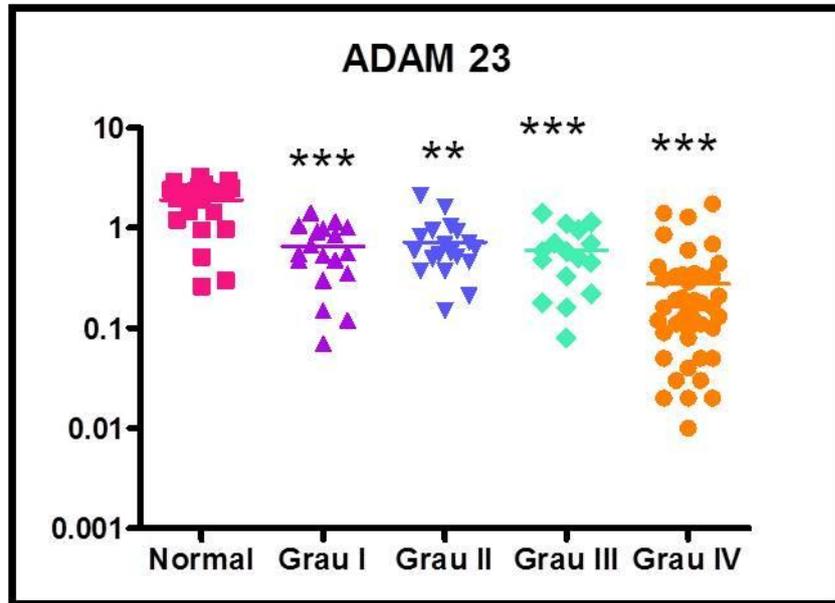


Figura 4- Redução da expressão de ADAM23 em GBM. Expressão relativa de ADAM23 em 18 amostras de gliomas de grau I, 20 amostras de grau II, 16 amostras de grau III, 46 amostras de GBM23 e 20 amostras cerebrais não tumorais. Os cDNAs das amostras foram amplificados por PCR em Tempo Real e para o cálculo da expressão relativa foi adotada a fórmula proposta por Pfaffl (M. Pfaffl, 2001). O teste t de Student não pareado e bicaudal foi utilizado para o cálculo estatístico.

***- $p < 0,001$ comparando-se com o grupo normal. **- $p < 0,01$ comparando-se com o grupo normal.

4.2 Análise dos possíveis mecanismos responsáveis pela diminuição nos níveis de expressão do gene ADAM23 em gliomas

4.2.1 Análise do padrão de metilação do DNA da região promotora do gene ADAM23.

A hipermetilação das ilhas CpG contidas na região promotora dos genes é um dos mecanismos mais estudados de inibição da expressão gênica em tumores. Em diversos tipos de tumores e linhagens celulares a região promotora do gene ADAM23 está hipermetilada, resultando na diminuição de sua expressão. Por este motivo, nossa primeira estratégia foi analisar o perfil de metilação da região promotora de ADAM23 em busca de indícios de hipermetilação nas amostras de gliomas. A região analisada contém 22 dinucleotídeos CpG localizados aproximadamente -1025 a -549 pb do sítio de início da transcrição do gene ADAM23.

Para a análise foram escolhidas 8 amostras de glioblastomas que apresentaram uma diminuição significativa no nível de expressão de ADAM23 nos ensaios de PCR em Tempo Real e o DNA dessas amostras foi tratado com bissulfito de sódio. O controle da eficiência do tratamento foi feito através da análise de conversão das citocinas que não fazem parte dos dinucleotídeos CpG, as quais estavam todas convertidas.

A região promotora do gene ADAM23 foi amplificada por PCR *nested* e em seguida os produtos de PCR foram clonados e para cada amostra foram sequenciados 10 clones para análise da presença de metilação dos dinucleotídeos CpG, buscando aumentar a representatividade de alelos e avaliar a heterogeneidade intratumoral do padrão de metilação do gene ADAM23.

Como pode ser observado na Figura 5 nenhuma das 8 amostras de GBM apresentou uma porcentagem significativa de CpGs metilados na região analisada, sugerindo que ao contrário do observado nos tumores de mama (Costa, et al., 2004), tumores gástricos (Takada et al., 2005), tumores de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2007), a diminuição dos níveis de expressão do gene ADAM23 em GBM não está diretamente associada a presença de metilação na sua região promotora.

Este resultado está de acordo com os resultados obtidos em um estudo prévio realizado em nosso laboratório no qual 103 amostras de gliomas (incluindo 53 GBMs) foram analisadas através de MSP (PCR específico para Metilação). Este estudo analisou 2 regiões diferentes localizadas na região promotora do gene ADAM23. A região 1 está a 0,5 kb do sítio de início da transcrição do gene ADAM23, contendo os 22 dinucleotídeos CpGs em 479 pb. A segunda região analisada por MSP contém 1067 pb e inclui o exon 1 deste gene. Não foram observadas alterações no padrão de metilação de ambas regiões promotoras do gene ADAM23 em nenhuma das amostras de cérebro normal e de gliomas de diferentes graus (Miuky et al., dados não publicados).

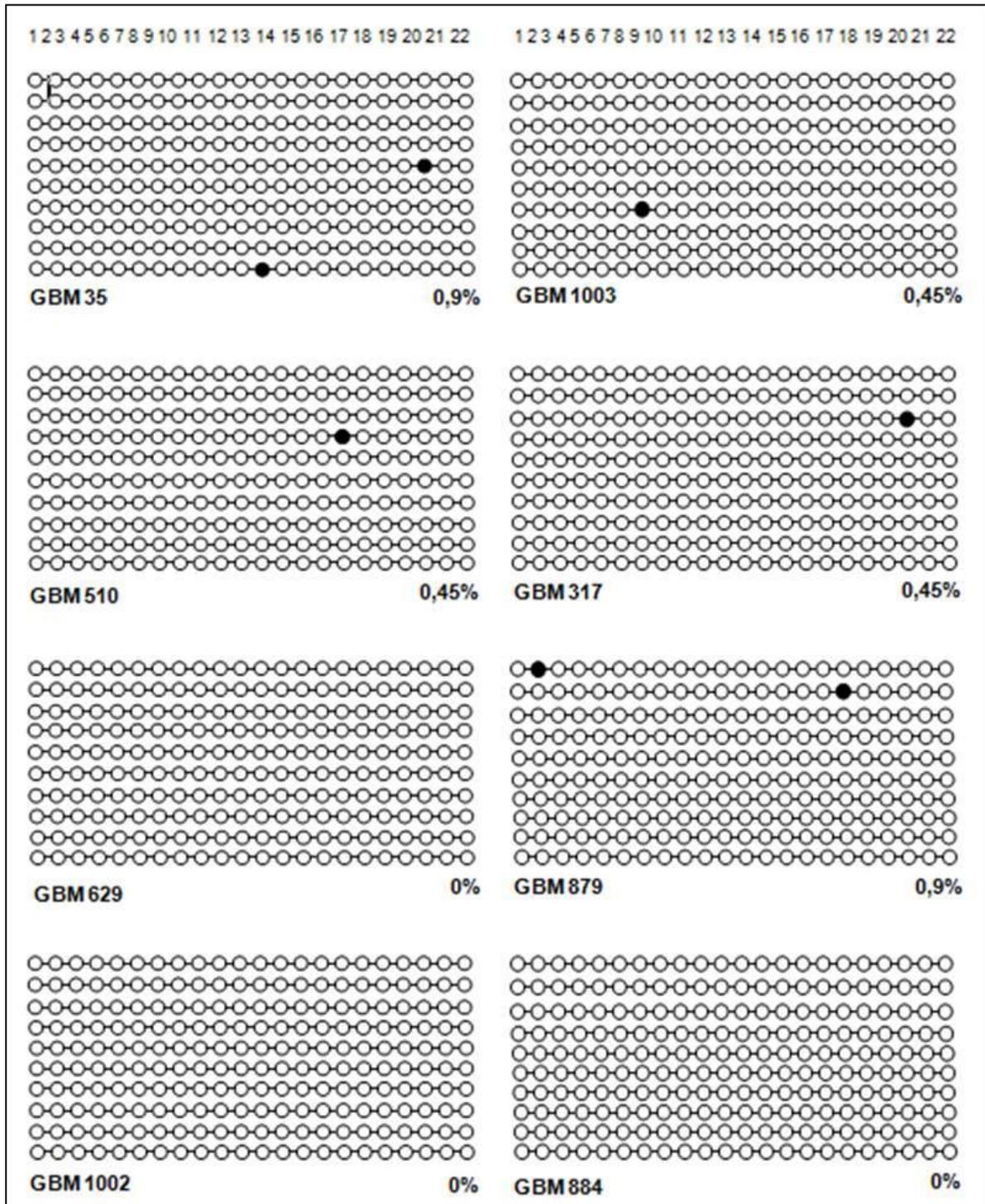


Figura 5- Ausência de metilação na região promotora de ADAM23 nas amostras de GBM. A figura mostra o perfil de metilação de cada amostra, onde cada linha representa um alelo sequenciado e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG metilado (círculos pretos) ou não metilado (círculos brancos). O número da amostra e a porcentagem de metilação estão indicados abaixo de cada conjunto de linhas.

4.2.2 Detecção de mutações na região codificante do gene ADAM23 em amostras de glioblastomas humanos

O passo seguinte à análise de metilação da região promotora do gene ADAM23 foi a procura por mutações na região codificante do gene ADAM23 nas amostras de GBM. Para esta análise foram selecionadas as 5 amostras que apresentaram a menor expressão deste gene nos ensaios de PCR em Tempo Real e que não apresentaram níveis de metilação significativos na região promotora. O DNA genômico destas amostras foi extraído e utilizado em reação de PCR específico para amplificação de cada um dos 27 exons deste gene. Os primers utilizados são complementares às sequências intrônicas que flanqueiam cada um dos exons, permitindo também a análise dos sítios conservados de splicing. Em seguida os produtos de PCR foram sequenciados e suas sequências foram analisadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor. O cromatograma de cada uma das seqüências foi cuidadosamente analisado e comparado à seqüência de RNA referência do gene ADAM23 (Ref. Seq. NM_003812.2).

A análise das sequências e cromatogramas correspondentes revelou a ausência de mutações nos 27 exons do gene ADAM23 em todas as amostras analisadas. A figura 6 mostra, como exemplo, as sequências correspondentes ao exon 3 da ADAM23 nas 5 amostras tumorais alinhadas com a seqüência referência e o cromatograma correspondente de uma dessas amostras.

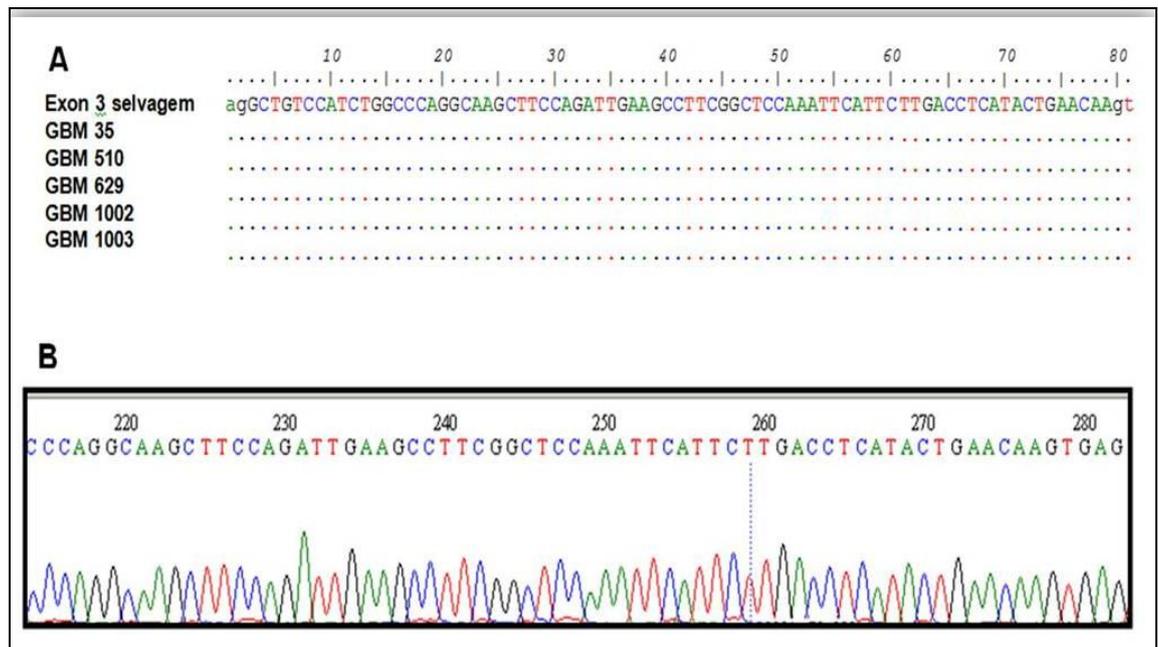


Figura 6- A análise da sequência genômica de ADAM23 não detectou mutações em seus exons. A- Alinhamento da sequência de DNA correspondente ao exon 3 do gene ADAM23. As amostras tumorais estão alinhadas com a sequência selvagem (Ref. Seq. NM_003812.2). B- Cromatograma correspondente ao exon 3 da amostra GBM 510.

4.2.3 Análise da perda de heterozigose (LOH - *Loss of Heterozygosity*) do gene ADAM23 em amostras de gliomas

A perda de heterozigose foi correlacionada com a diminuição da expressão de ADAM23 em tumores gástricos (Takada et al., 2005). Por este motivo nosso próximo passo foi verificar se este é o mecanismo responsável pela baixa expressão deste gene nas amostras de GBM. Para tal, analisamos a ocorrência de perda de heterozigose (LOH) em 5 amostras de GBM que apresentaram baixa expressão do gene ADAM23 nos ensaios apresentados na figura 4 e que não apresentaram níveis significativos de metilação na região promotora ou mutações em regiões codificantes deste gene.

O gene *ADAM23* está localizado no braço longo do cromossomo 2, mais precisamente na posição 2q33. Para analisar se houve deleção desta região nas amostras de GBM, utilizamos marcadores de DNA microssatélite localizados nesta região cromossômica. Os marcadores de microssatélites são regiões de DNA que consistem em repetições de 1 a 6 nucleotídeos em *tandem* e que possuem um alto nível de polimorfismo (Turnpenny & Ellard, 2005). O requisito fundamental para o estudo de LOH é que a amostra analisada seja de um indivíduo heterozigoto para os marcadores escolhidos, permitindo dessa forma a distinção entre os dois alelos com base no número de repetições e no tamanho dos fragmentos amplificados. Desta maneira é possível detectar a perda de um dos alelos na amostra tumoral, quando comparada à amostra normal do mesmo indivíduo. Assim, espera-se que o indivíduo portador de LOH no tecido tumoral apresente a amplificação de dois fragmentos com pesos moleculares distintos e correspondentes a cada um dos alelos nos tecidos normais e amplificação de apenas um desses dois fragmentos nos tecidos tumorais analisados.

Foram escolhidos 3 marcadores de microssatélites localizados na região genômica do gene *ADAM23*: **D2S422**, **D2S369** e **D2S2358** (Figura 3) (Tabela 5) sendo que os marcadores D2S422 e D2S369 estão localizados nos íntrons 2 e 3 do gene *ADAM23*, respectivamente e o marcador D2S2358 se encontra no terceiro íntron do gene *DYTN*, também localizado na região 2q33 como ilustrado na Figura 3.

Tabela 5- Marcadores de microssatélites escolhidos para a análise de LOH.

Marcador	Tipo de Variação (repetição)	Frequência de Heterozigose	Tamanho do fragmento	Fluoróforo
D2S422	trinucleotídeo	-	145-154 pb	6-FAM
D2S369	dinucleotídeo	80%	153-167 pb	VIC
D2S2358	dinucleotídeo	80%	201-213 pb	PET

Para selecionar as amostras heterozigotas para pelo menos um dos marcadores, amplificamos o DNA genômico dos linfócitos normais correspondentes à cada um dos 5 pacientes, com oligonucleotídeos específicos para cada um dos 3 microssatélites sendo o oligonucleotídeo forward para cada microssatélite marcado na extremidade 5' com um fluoróforo distinto (Tabela 5). Os produtos amplificados foram diluídos e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 (Applied) em uma solução contendo formamida e um padrão de peso molecular fluorescente (600 LIZ[®] Size Standard, da Applied) para auxiliar na determinação dos pesos moleculares dos fragmentos amplificados. Os dados foram analisados com o auxílio do software GeneMapper[®] 4.0 e representados em gráficos cujo eixo X corresponde ao peso molecular (em pares de bases) e o eixo Y corresponde à intensidade de fluorescência dos fragmentos analisados (Figura 7). O programa identifica os diferentes alelos do microssatélite com base no peso molecular dos fragmentos que varia em função do número de repetições nucleotídicas.

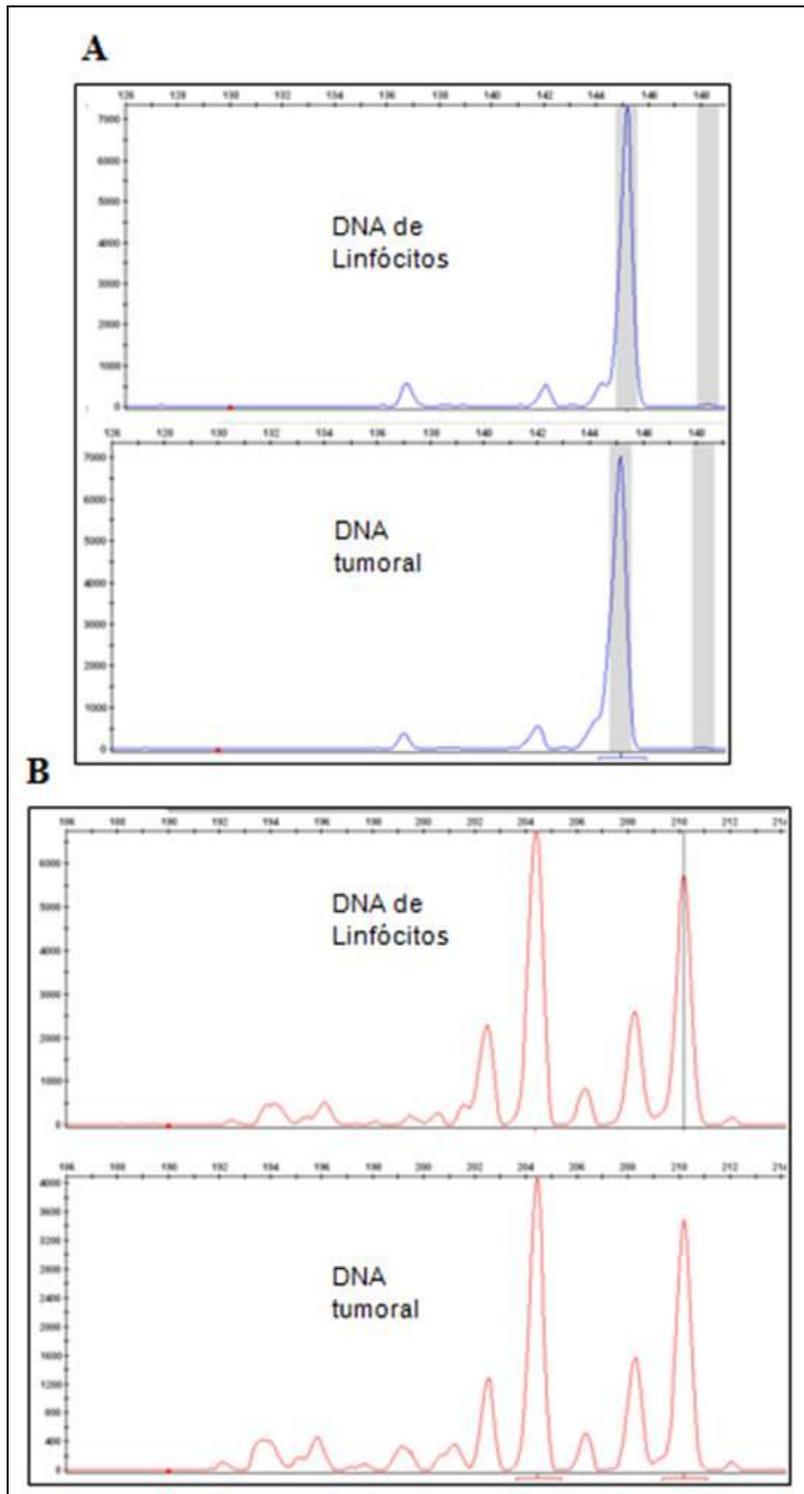


Figura 7- Exemplos de gráficos da análise dos produtos de PCR amplificados com os marcadores de microssatélites. A- Indivíduo homocigoto para o marcador D2S422. B- Indivíduo heterocigoto para o marcador D2S2358

Das 5 amostras de DNA genômico de linfócitos analisadas, 1 foi informativa (heterozigota) para o marcador D2S422, 5 foram informativas para o marcador D2S369 e 4 foram informativas para o marcador D2S2358 (Tabela 6).

Tabela 6- Resultados das análises do DNA genômico de linfócitos correspondentes às amostras de gliomas.

	D2S422	D2S369	D2S2358
GBM35	Homozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto
GBM510	Homozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto
GBM629	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto
GBM1002	Homozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto
GBM1003	Homozigoto	Heterozigoto	Homozigoto

Tendo identificado os indivíduos heterozigotos, partimos para a análise do DNA genômico tumoral dessas amostras. A ocorrência de LOH em uma amostra é observada através da redução da intensidade relativa de fluorescência do fragmento correspondente ao alelo deletado. Desta forma, com o auxílio do software GeneMapper 4.0 calculamos a razão alélica entre a intensidade de fluorescência do alelo 1 pela intensidade de fluorescência do alelo 2 para as amostras normal e tumoral de um mesmo indivíduo e em seguida verificamos a presença de desequilíbrio alélico determinando a razão entre a razão alélica da amostra normal e a razão alélica da amostra tumoral. Foram considerados casos de LOH amostras com valores de desequilíbrio alélico $>1,35$ ou $<0,67$.

Tabela 7- Desequilíbrio Alélico das amostras de gliomas analisadas. A Razão Alélica é a razão entre a intensidade de fluorescência do alelo 1 pela intensidade de fluorescência do alelo 2. O Desequilíbrio Alélico é a razão entre a Razão Alélica da amostra normal pela Razão Alélica da amostra tumoral.

Amostra	Marcador	Desequilíbrio Alélico
GBM35	D2S369	0,98
GBM35	D2S2358	1,08
GBM510	D2S369	1,01
GBM510	D2S2358	1,17
GBM629	D2S422	0,90
GBM629	D2S369	0,98
GBM629	D2S2358	0,95
GBM1002	D2S369	0,96
GBM1002	D2S2358	0,99
GBM1003	D2S369	0,97

A tabela 7 mostra que nenhuma das 5 amostras tumorais analisadas apresentou LOH para a região correspondente ao gene ADAM23. Este resultado foi duplamente verificado no caso das amostras que eram heterozigotas para pelo menos 2 marcadores.

4.2.4 Análise da expressão dos miRNAs hsa-miR-92a, hsa-miR-92b e hsa-miR-32 nas amostras de GBM

MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs (19-22 nucleotídeos) não codificantes com importantes funções regulatórias em processos fisiológicos e patológicos (Kutter & Svoboda, 2008), inclusive em câncer. A desregulação da expressão de miRNA em tumores está bem estabelecida, ligada ao crescimento celular, controle do ciclo celular, evasão de apoptose, invasão celular e metástase e angiogênese (Croce, 2009). A regulação gênica pós transcricional dos miRNAs ocorre através do reconhecimento e clivagem do mRNA alvo que contém em sua

região 3'UTR uma sequência de ligação a um miRNA específico. Após esta ligação, o mRNA alvo é clivado e degradado ou desestabilizado (Ambros, 2001; Chekulaeva & Filipowicz, 2009).

No decorrer deste projeto um grupo de colaboradores liderado pelo Dr Newton Verbisck estudou a região 5'-UTR e 3'-UTR do gene ADAM23 em busca de sequências alvo para miRNAs que pudessem agir na regulação da expressão deste gene. No estudo do Dr. Verbisck (dados não publicados), foram utilizadas 5 ferramentas de busca em bancos de dados de miRNA, para o transcrito NM_003812 (Ref Seq) de ADAM23: GeneMir, PicTar, TargetScan, Diana microT e MiRanda. Ao todo foram encontrados 48 microRNAs para ADAM23, contudo, apenas os microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92b e hsa-miR-92a aparecem em mais de um banco de microRNAs e possuem mais de um sítio conservado nas regiões UTR de ADAMs de diferentes espécies. A região 3'-UTR de ADAM23, que compreende os nucleotídeos 2722-3059, possui a sequência *tgcaata*, que corresponde ao sítio onde os microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92b, hsa-miR-92a podem se ligar.

Apesar do estudo do Dr. Verbisck não ter validado esses dados, decidimos analisar a expressão desses miRNAs em amostras de GBM a fim de verificar se a diminuição da expressão de ADAM23 é regulada por estes miRNAs. Para essa finalidade o RNA total de 12 amostras de GBM foi utilizado para a síntese de cDNA e em seguida as amostras de cDNA foram utilizadas para amplificação de cada miRNA por PCR em Tempo Real utilizando primers e sondas específicos do *TaqMan® MicroRNA Assays* da Applied Biosystems. Os RNAs RNU44 e RNU6B foram utilizados para a normalização das reações com o auxílio do programa GeNorm, que calculou um fator de normalização para cada amostra. A expressão relativa dos microRNAs foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystem User

Bulletin #2, PN4303859) (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen, et al., 2000) como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida analisamos a existência de correlação entre os níveis de expressão do gene ADAM23 e dos diferentes miRNAs nas 12 amostras de GBM, esperando encontrar uma correlação inversamente proporcional que evidenciasse o envolvimento desses miRNAs na regulação dos níveis de expressão do gene ADAM23.

A figura 8 mostra os gráficos de correlação entre a expressão relativa de ADAM23 (eixo y) e a expressão relativa dos miRNAs (eixo x) para cada amostra. Nenhum miRNA testado mostrou correlação entre sua expressão e a expressão de ADAM23, visto pela inclinação da reta e o índice de correlação de cada um ($R^2= 0,001$ para hsa-miR-32; $R^2= 0,0682$ para hsa-miR-92a; $R^2= 0$ para hsa-miR-92b). Separando-se as 12 amostras em 2 grupos, um com maior expressão de ADAM23 (ADAM23+) e outro com menor expressão de ADAM23 (ADAM23 -) verificamos que a média de expressão de hsa-miR-32 e hsa-miR-92b não se altera entre os grupos, enquanto que a média de expressão de hsa-miR-92a é um pouco maior no grupo ADAM23+, contudo esta diferença não é significativa (teste t de Student, não pareado e bicaudal) (Figura 9). Estes dados revelam que nas 12 amostras de GBM testadas os níveis de expressão do gene ADAM23 não estão sendo regulados pelos miRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b.

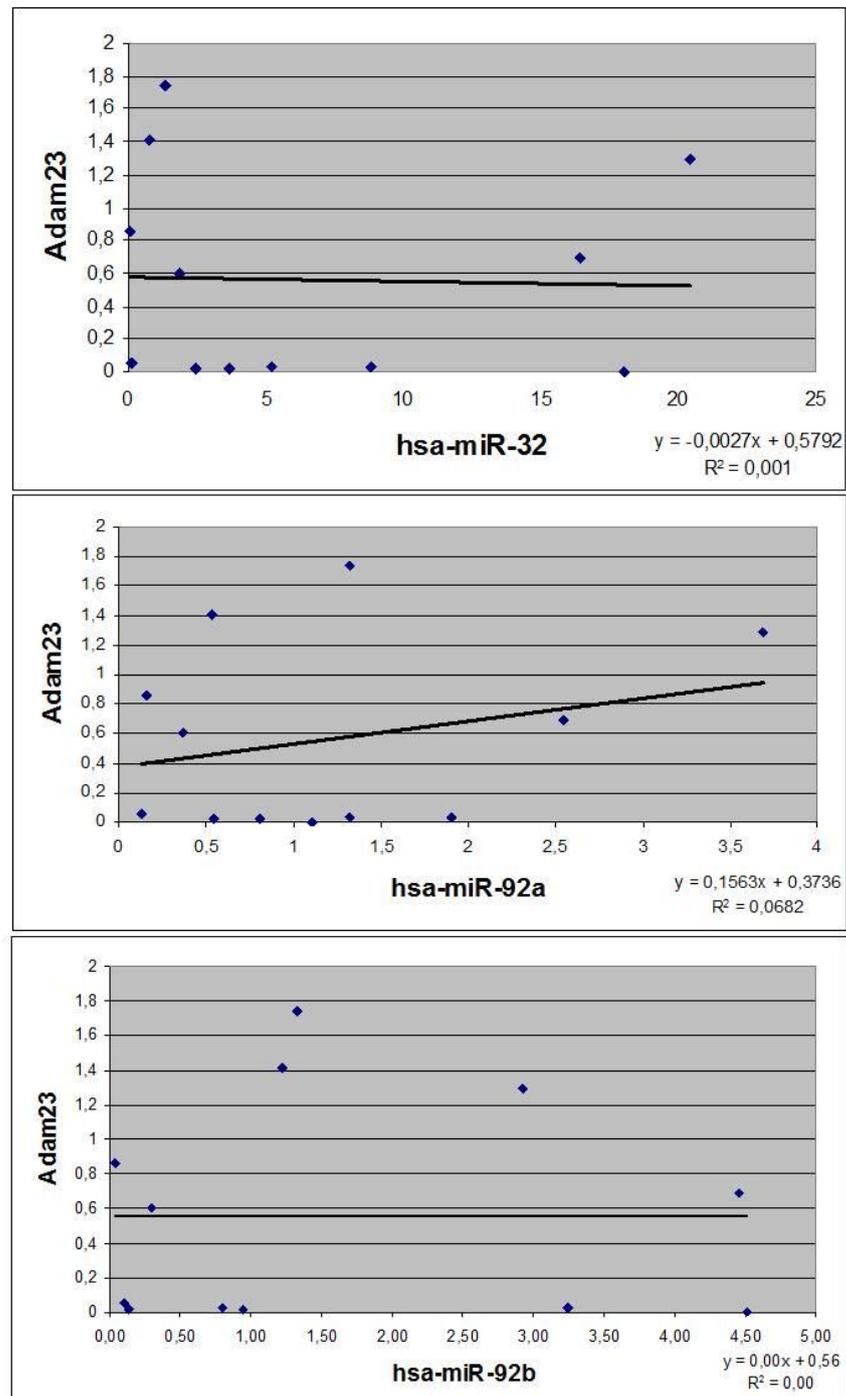


Figura 8- A expressão de ADAM23 não se correlaciona com a expressão dos microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b nas amostras de glioblastomas. O RNA total de 12 amostras de GBM foi utilizado para análise da expressão dos microRNAs através da metodologia contida nos kits *TaqMan® MicroRNA Assays* da Applied Biosystems. O programa GeNorm utilizou os dados dos controles endógenos RNU44 e RNU6B para a geração de fator de normalização para cada amostra e o nível de expressão dos microRNAs foi calculado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os gráficos mostram a correlação entre a expressão de ADAM23 (eixo y) e cada microRNA (eixo x) por amostra.

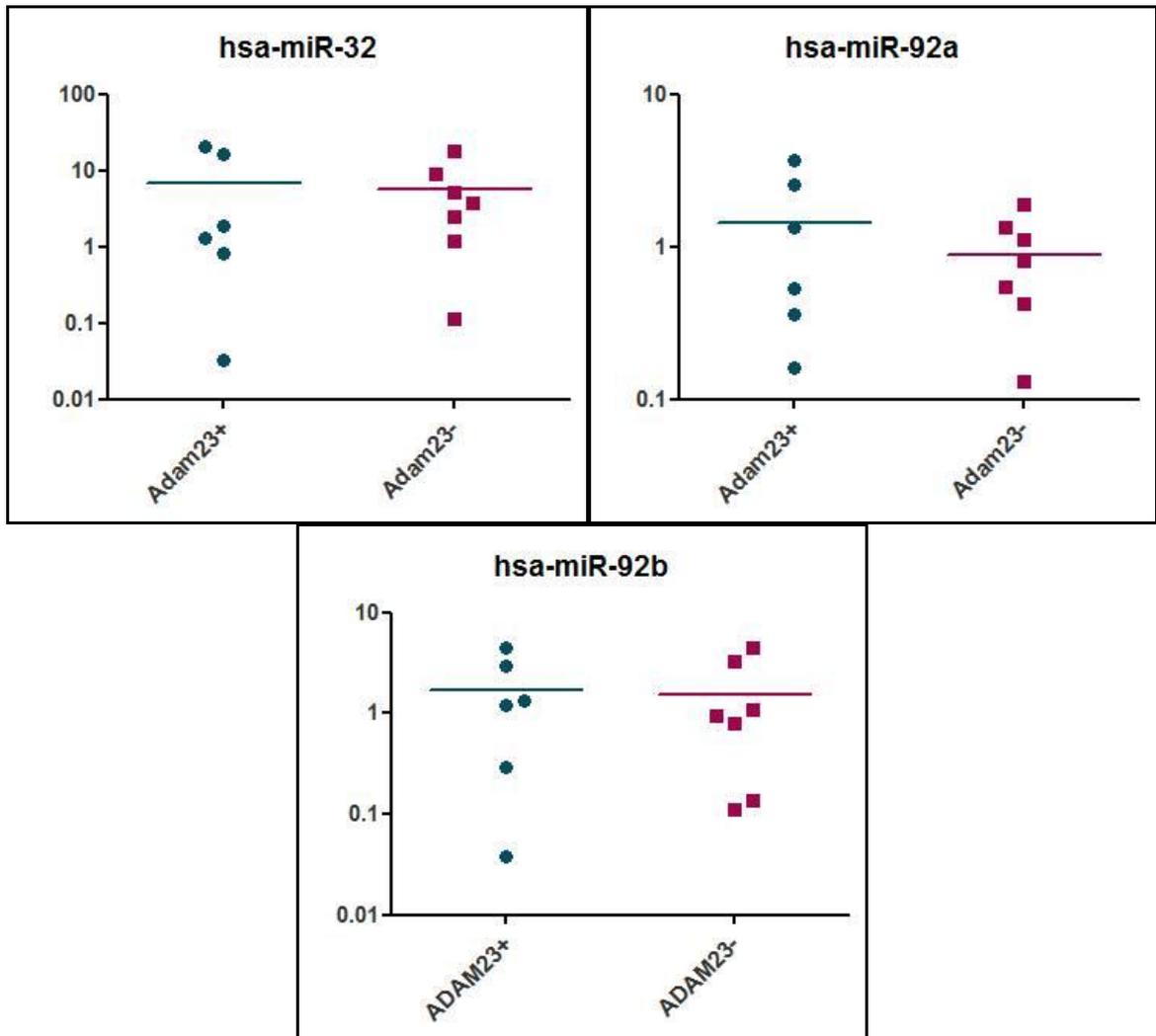


Figura 9- Média da expressão dos microRNAs hsa-miR-32, hsa-miR-92a e hsa-miR-92b nas amostras de GBM com maior expressão de ADAM23 (ADAM23+) ou menor expressão de ADAM23 (ADAM23-). O RNA total de 12 amostras de GBM foi utilizado para análise da expressão dos microRNAs através da metodologia contida nos kits *TaqMan® MicroRNA Assays* da Applied Biosystems. O programa GeNorm utilizou os dados dos controles endógenos RNU44 e RNU6B para a geração de fator de normalização para cada amostra e o nível de expressão dos microRNAs foi calculado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A análise estatística com o teste t de student, bicaudal e não pareado, não acusou diferença na expressão dos miRNAs entre os grupos.

4.3 Silenciamento do gene ADAM23 por interferência de RNA na linhagem de glioma humano U87MG

O silenciamento de ADAM23 pela metodologia de RNA de interferência foi realizado nas células U87MG a fim de gerar ferramentas para o estudo do papel de ADAM23 em tumores, buscando compreender os mecanismos nos quais esta proteína está envolvida e qual a importância de seu silenciamento durante a progressão tumoral. A linhagem U87MG foi escolhida por ser comumente utilizada em ensaios tumorigênicos *in vivo* e por apresentar os maiores níveis de expressão de ADAM23 em relação às demais linhagens de gliomas disponíveis em nosso laboratório.

Para o silenciamento do gene ADAM23 na linhagem U87MG foram utilizadas duas sequências de RNAi (RNAi-04 e RNAi-25) que haviam sido utilizadas previamente pelo nosso grupo para o silenciamento do gene ADAM23 em linhagens tumorais de mama, obtendo-se eficiência de silenciamento superior a 80% em relação às células transfectadas com o vetor vazio (Verbisck et al., 2009). Após a realização de testes de silenciamento na linhagem U87MG optamos por trabalhar com a construção RNAi-04, por ter sido mais eficiente do que a construção RNAi-25 no silenciamento de ADAM23 nesta linhagem.

O vetor retroviral pSuper.retro (OligoEngine) foi escolhido para que a modificação das células U87MG fosse permanente e a taxa de transdução fosse mais eficiente. Para a construção do vetor retroviral foram utilizados oligonucleotídeos (senso e antisenso) contendo as regiões complementares ao gene ADAM23. Esses oligonucleotídeos foram anelados e clonados no vetor, entre os sítios de Bgl II e Hind III, posicionando o oligo senso na posição correta downstream ao TATA box do promotor do gene H1, para gerar o shRNA. A sequência desse

oligonucleotídeo senso inclui a sequência de 19-nt correspondente ao gene ADAM23 nas duas orientações (senso e antisenso) separadas por uma sequência espaçadora de 9-nt. Após a clonagem dos oligonucleotídeos no vetor retroviral, a presença do inserto foi confirmada por sequenciamento.

As células Phoenix anfotrópicas foram transfectadas com a construção p.Super.retro RNAi-04 ou o vetor vazio para a produção de partículas virais e o sobrenadante das células contendo as partículas virais foi utilizado para a transdução das células U87MG. As células U87MG transduzidas foram selecionadas com 1 µg/ml do antibiótico Puromicina durante 14 dias e foram denominadas U87/pRS04 (células que contêm a sequência RNAi-ADAM23) ou U87/pRS (células que contêm o vetor vazio).

As células U87/pRS04 e U87/pRS foram coletadas, seu RNA foi extraído e seu cDNA utilizado para a análise da expressão relativa do gene ADAM23 por PCR em Tempo Real. O gene normalizador utilizado foi o GAPDH e a população de células U87/pRS foi utilizada como amostra referência. A expressão relativa do gene ADAM23 nas células U87/pRS04 apresentou uma redução de 5 vezes em relação às células contendo o vetor vazio (Figura 10)

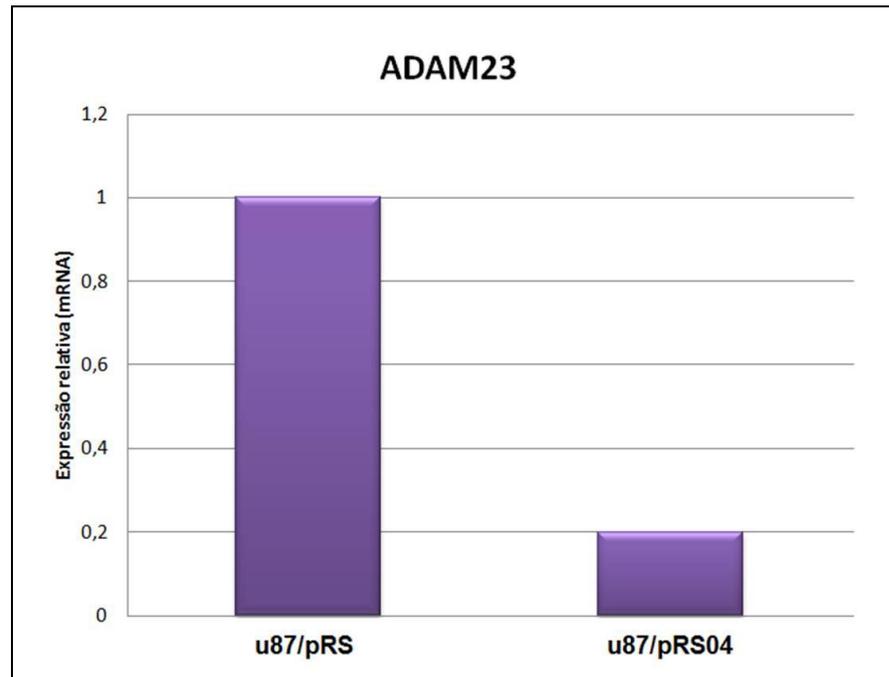


Figura 10- Diminuição da expressão do gene ADAM23 nas células U87/pRS04. Os cDNAs das amostras foram amplificadas por PCR quantitativo e para o cálculo da expressão relativa foi adotada a fórmula proposta por Pfaffl (M. Pfaffl, 2001).

O próximo passo foi obter clones dessa população de células U87/pRS04 que apresentassem diminuição na expressão do gene ADAM23. Para este fim, as células U87/pRS04 e U87/pRS foram submetidas à diluição limitante em placa de 96 poços, de forma que fossem obtidos poços com uma única célula. Esses poços foram selecionados, observados e suas células transferidas para poços de maior diâmetro, até que tivessem em número suficiente para que seu RNA fosse extraído.

O cDNA de cada clone foi utilizado para análise da expressão relativa do gene ADAM23 por PCR em Tempo Real, utilizando o gene GAPDH como normalizador e a população de vetor vazio como referência. Ao todo 14 clones de células U87MG/pRS04 foram isolados e selecionados. Em todos estes derivados

clonais o nível máximo de redução de mRNA de ADAM23 observado não foi superior a 5 vezes em relação às células controle respectivas (Figura 11).

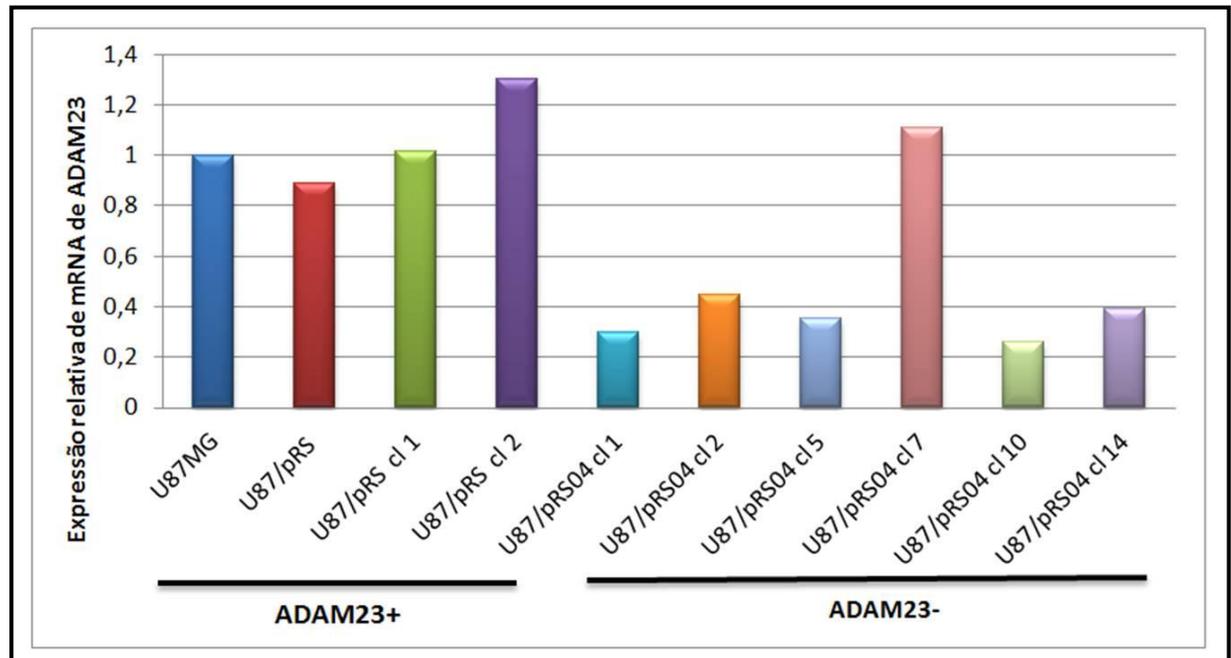


Figura 11- Expressão relativa do transcrito primário de ADAM23 nas células U87MG e em seus derivados, por PCR em Tempo Real. No gráfico são apresentados os controles contendo o vetor vazio (U87/pRS e clones 1 e 2) e os clones com maior redução da expressão de ADAM23 (U87/pRS04 clones 1, 2, 5, 7, 10 e 14). Os clones 1, 5, 10 e 14 apresentaram redução na expressão de ADAM23 de até 5 vezes quando comparados às células parentais U87MG.

4.3.1 Efeitos de ADAM23 na adesão das células U87MG aos ligantes de matriz extracelular

O ensaio de adesão das células U87MG ao Colágeno e à Vitronectina foi realizado a fim de verificar se a ADAM23 exerce papel importante na capacidade adesiva dessas células, corroborando os resultados obtidos com as células MDA-MB-435. Neste modelo, a ausência de ADAM23 resultou em aumento de aproximadamente 2 vezes na capacidade adesiva destas células à Vitronectina (Verbisck, et al., 2009). Para tal, foram escolhidos 2 clones de células com expressão reduzida de ADAM23 (U87/pRS cl 05 e U87/pRS cl 14).

A figura 12 mostra que o silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG não alterou de forma significativa a capacidade de adesão das células aos substratos analisados.

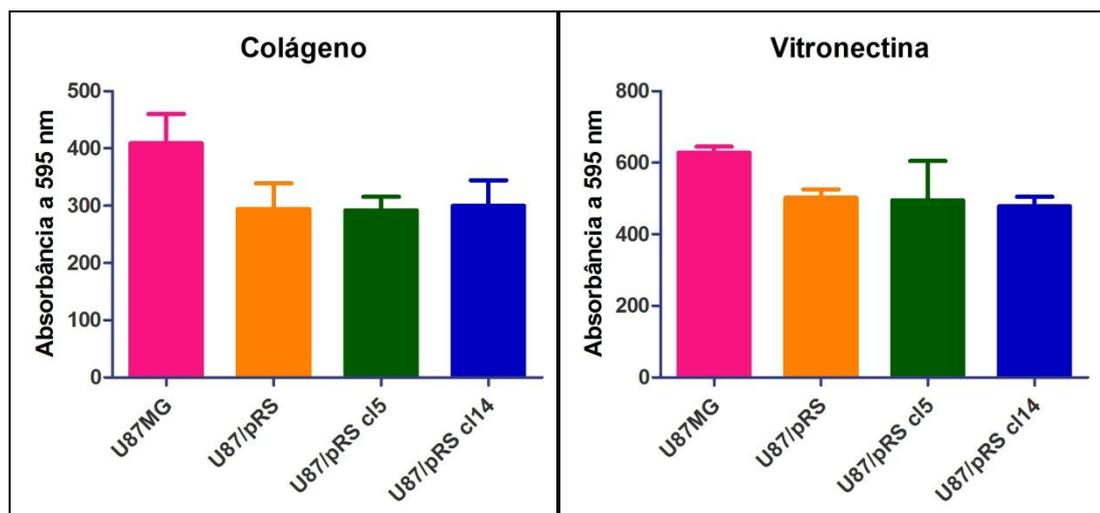


Figura 12- O silenciamento de ADAM23 não influencia a capacidade de adesão das células U87MG ao Colágeno e à Vitronectina. As células U87MG e seus derivados ADAM23 negativos foram plaqueados sobre os ligantes durante 2 horas e em seguida foram lavados, fixados e corados. O

gráfico mostra a média da absorbância do corante a 595 nm. A teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística.

4.3.2 Efeitos de ADAM23 nos níveis totais e na ativação da integrina $\alpha\beta 3$ na linhagem U87MG

Em seguida verificamos se o gene ADAM23 está envolvido na modulação da atividade da integrina $\alpha\beta 3$ na linhagem U87MG, assim como demonstrado em MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009). Para isso, verificamos se as células U87MG ADAM23 negativas apresentavam alteração nos níveis totais e/ou ativados da integrina $\alpha\beta 3$, através de ensaio de citometria de fluxo. Para este ensaio as células U87/pRS e os clones ADAM23 negativos foram incubados na presença dos anticorpos monoclonais AP5 (anticorpo que reconhece especificamente a forma ativada de $\alpha\beta 3$) e LM609 (anticorpo que reconhece os níveis totais, ativo e inativo, da integrina $\alpha\beta 3$).

Na figura 13 podemos observar que a redução na expressão de ADAM23 não alterou os níveis totais e/ou ativos da integrina $\alpha\beta 3$ na linhagem celular U87MG.

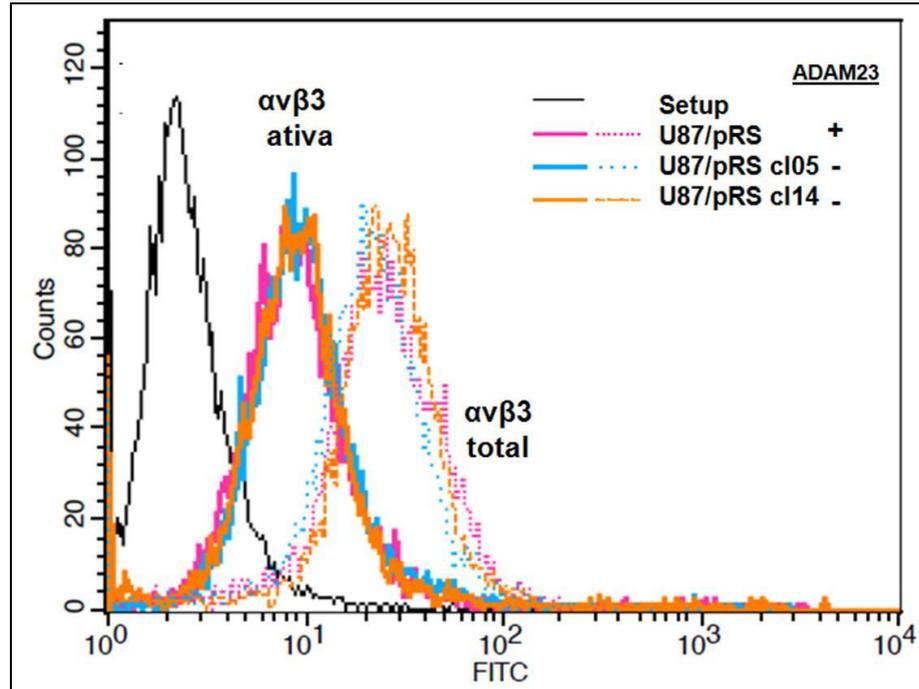


Figura 13- Análise dos níveis ativos e totais da integrina $\alpha\beta 3$ nas células U87MG e de seus derivados ADAM23 negativos por FACS. As células foram incubadas com os anticorpos LM609 (que detecta os níveis totais de $\alpha\beta 3$ na membrana) e AP5 (que detecta somente os níveis ativos de $\alpha\beta 3$) seguido de lavagem e incubação com o anticorpo secundário fluorescente (conjugado com FITC) e análise por citometria de fluxo.

4.3.3 Efeito da redução de expressão de ADAM23 no ciclo celular das células U87MG

O silenciamento de ADAM23 na linhagem U87MG gerou clones com redução de até 5 vezes em sua expressão, contudo, os ensaios funcionais de adesão e ativação de integrina utilizando estes clones não demonstraram um papel importante de ADAM23 nestes processos celulares, ao contrário do que foi observado na linhagem MDA-MB-435 (Costa et al., manuscrito em preparação; Verbisck et al., 2009). Uma explicação para isso é que o silenciamento obtido na linhagem U87MG não seja suficiente para evidenciar as alterações celulares causadas por ADAM23, sendo necessária uma redução muito maior dos níveis expressos de ADAM23, como ocorre com os clones ADAM23 negativos derivados da linhagem MDA-MB-435.

Nosso próximo passo foi testar outra estratégia de RNAi na tentativa de obter um maior silenciamento de ADAM23 nas células U87MG. A estratégia de siRNA, embora seja transiente, permite uma melhor titulação dos efeitos de interferência de RNA e uma análise mais rápida destes efeitos, pois após a transfecção esses duplexes são incorporados diretamente no complexo molecular efetor do silenciamento (Kim et al., 2005). Para tal, foram utilizados duplexes sintéticos de RNA de interferência compostos por 27 nucleotídeos contendo uma sequência específica para o gene ADAM23 (ver em métodos).

As células transfectadas, denominadas de U87-siRNA, foram testadas quanto ao nível de expressão relativa do gene ADAM23 através de PCR em Tempo Real em uma cinética que envolveu os tempos de 2, 6, 16, 24 e 48 horas após a transfecção das células (Figura 14). Nesta figura observamos um valor máximo de redução de expressão do mRNA após 16 horas da transfecção (25 vezes em relação ao controle), sendo que este valor se manteve estável até 24 horas após a transfecção. Após 48 horas as células apresentaram uma redução de expressão de aproximadamente 17 vezes em relação às células controle (células em 0 h ou células transfectadas com sequencia inespecífica, “*scramble*”).

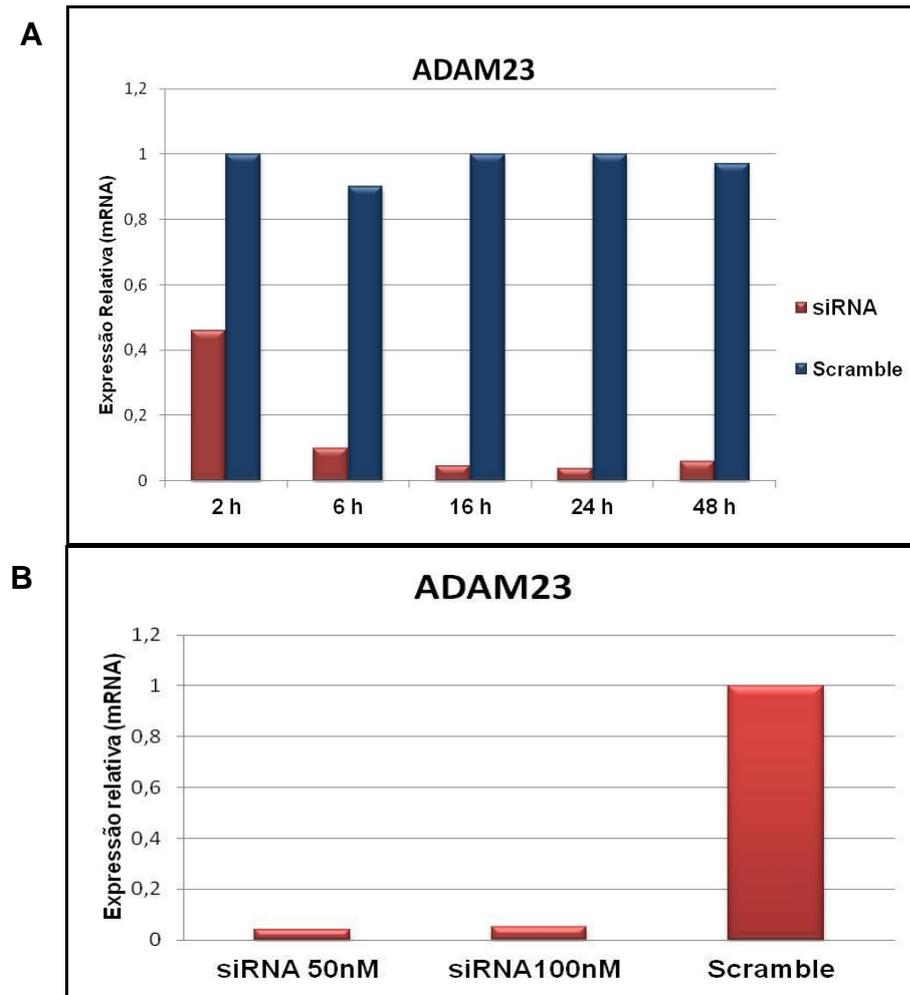


Figura 14- Padronização do ensaio de silenciamento do gene ADAM23 através da transfecção com duplexes de siRNA. A- Ensaio de cinética da expressão da ADAM23 em U87MG após a transfecção com os duplexes ADAM23-RNAi. As células foram coletadas após 2, 6, 16, 24 e 48 horas depois da transfecção e seus níveis de RNAm de ADAM23 foram analisados através de PCR em Tempo Real. As células transfectadas com duplexes scramble foram utilizadas como referência, pois nesse caso os níveis de RNAm de ADAM23 não se alteram. B- Teste da concentração de duplexes utilizadas na transfecção das células U87MG.

Em seguida, fixando-se o tempo de 24 horas, a transfecção dos duplexes de siRNA nas células U87MG foi padronizada utilizando as concentrações de 50 e 100nM. Após 24 horas os níveis de redução da expressão de ADAM23 observados foram semelhantes para as duas concentrações utilizadas (25 vezes) (Figura 14B).

Curiosamente, a análise das fases do ciclo celular das células U87/siRNA, utilizando iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo, evidenciou um intenso

acúmulo de células na interface G0/G1 após 72 horas da transfecção com os duplexes (72% das células em G0/G1) em comparação às células controle (56,3% do total de células em G0/G1) (Figura 15). Células U87MG carenciadas (incubadas com meio DMEM sem SFB durante 72 horas) foram utilizadas como controle positivo de parada em G0/G1, com 62,7 % de células paradas em G0/G1, ou seja, as células U87/siRNA apresentaram maior porcentagem de células paradas em G0/G1 mesmo quando comparadas ao controle positivo.

Esse efeito, embora reproduzido em três experimentos independentes, não foi observado em tempos mais curtos (i.e. inferiores à 24 horas, dados não apresentados), sugerindo que a parada na interface G0/G1 de células U87MG seja uma resposta celular decorrente de um maior período de exposição à níveis reduzidos de ADAM23.

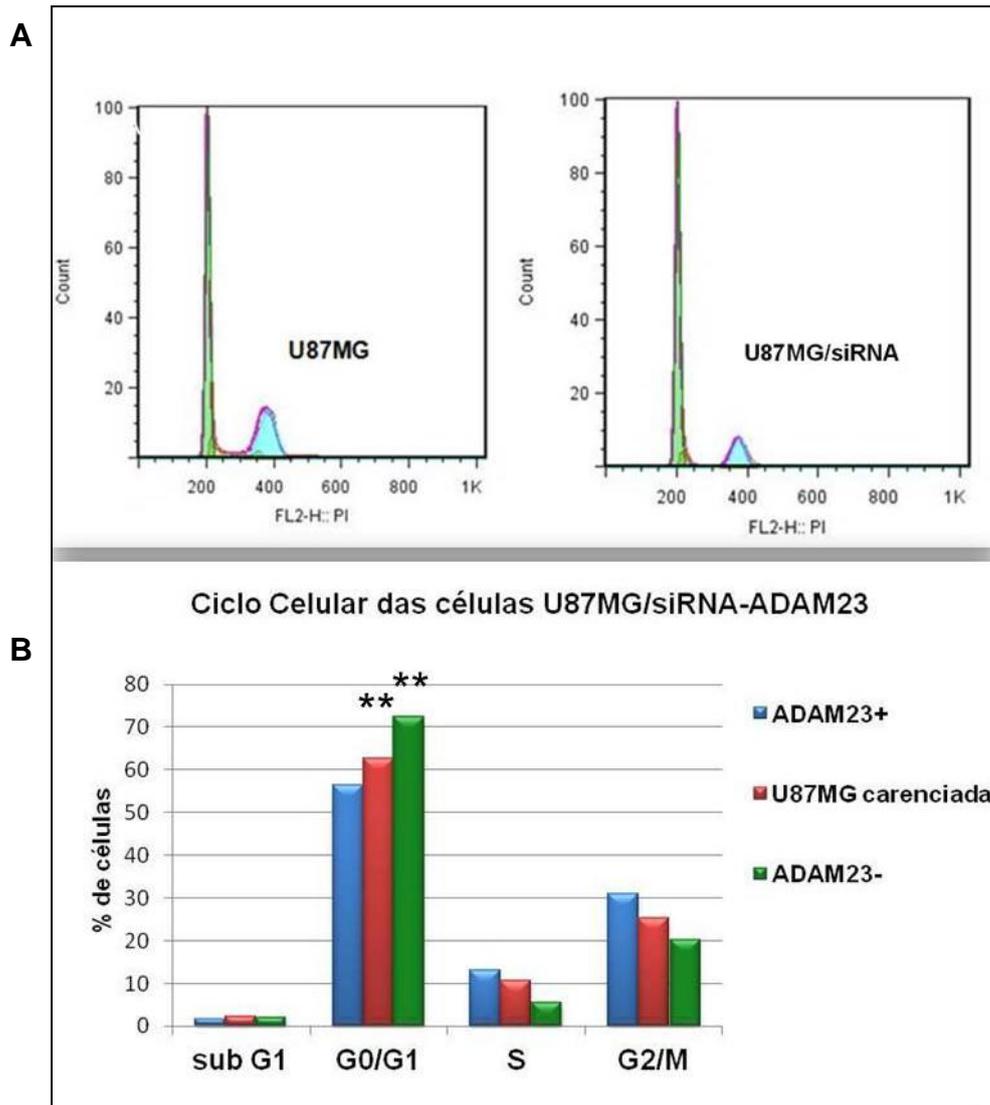


Figura 15- Análise do ciclo celular das células U87MG/siRNA-ADAM23. A- Histograma de um dos experimentos mostrando os picos correspondentes às fases G1 e G2 do ciclo celular. B- O gráfico mostra a porcentagem de células correspondentes à cada fase do ciclo celular, com análise de 30.000 eventos/experimento (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste t de student, não pareado, bicaudal).

Essas recentes observações, juntamente com a dificuldade encontrada em estabelecermos derivados de células U87MG apresentando níveis mais reduzidos de ADAM23, sugere que o decorrente seqüestro na interface G0/G1 seja um processo irreversível para a população de células U87MG com redução da expressão de ADAM23 superior à 10-25 vezes aos níveis observados em células controle. Desta maneira, a seleção de clones U87MG com um bom silenciamento de ADAM23 se torna inviável, dificultando o uso desta linhagem como modelo para o estudo do efeito do silenciamento de ADAM23 nos processos de, proliferação, adesão e migração celulares.

4.4 Silenciamento do gene ADAM23 por interferência de RNA na linhagem de melanoma humano SKmel-37

O principal objetivo deste projeto é verificar se existe relação causal entre a redução dos níveis de ADAM23 com os processos de adesão, migração e proliferação celular, ou seja, verificar se os resultados obtidos na linhagem MDA-MB-435 podem ser reproduzidos em outras linhagens tumorais. Com a impossibilidade de utilizar a linhagem U87MG para essa finalidade, optamos por continuar nossas análises com a linhagem tumoral SKmel-37, que expressa altos níveis de ADAM23 e $\alpha v\beta 3$.

A estratégia de silenciamento utilizada para reduzir os níveis de ADAM23 nas células SKmel-37 foi a transfecção com o vetor pAVU6+27 contendo a sequência RNAi-04 que havia sido utilizada previamente pelo nosso grupo para o silenciamento do gene ADAM23 em linhagens tumorais de mama (Verbisck et al., 2009). A figura 16 mostra a expressão relativa de ADAM23 determinada por PCR em Tempo Real na população de células SKmel-37 transfectadas com o vetor pAVU6+27-RNAi-04

(denominada Sk-siRNA), na população de células transfectadas com o vetor vazio (denominada Skvv) e em 6 clones representativos isolados à partir da população Sk-siRNA (denominados Skcl1, Skcl2, Skcl5, Skcl7, Skcl9 e Skcl12). A redução média da expressão de ADAM23 na população Sk-siRNA é de cerca de 10 vezes quando comparado com as células SKmel-37 parentais. Entretanto, em diversos clones os níveis de expressão são ainda menores, atingindo 34 vezes de redução no clone 05 e ultrapassando 500 vezes de redução relativa nos clones 1 e 2, o que se assemelha aos clones obtidos com a linhagem MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009).

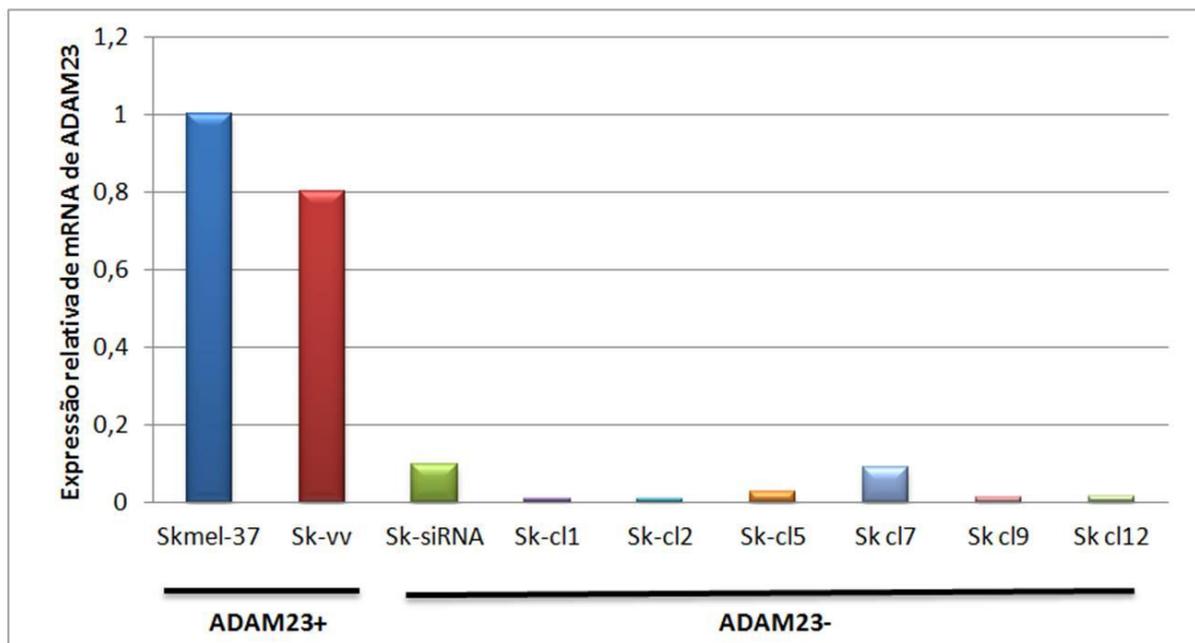


Figura 16- Expressão relativa do transcrito primário de ADAM23 em células SKmel-37 e em seus derivados, por PCR em Tempo Real. Os derivados de SKmel-37 foram transfectados com o vetor pAVU6+27-shRNA (Sk-siRNA) ou com o vetor vazio (Skvv) e clones foram isolados a partir da população de células Sk-siRNA (Skcl 1, Skcl 2, Skcl 5, Skcl 7, Skcl 9, e Skcl 12). A redução de expressão de ADAM23 nos clones isolados varia entre 500 vezes (Sk-cl1 e 2) e 10 vezes (Sk-cl7) quando comparados às células parentais SKmel-37.

4.4.1 Efeitos do silenciamento de ADAM23 na capacidade proliferativa da linhagem Skmel-37 *in vitro*

4.4.1.1 Ensaios de proliferação em monocamada

Experimentos realizados em nosso laboratório com a linhagem MDA-MB-435 evidenciaram um papel fundamental de ADAM23 na proliferação dessas células tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* (Costa, et al., manuscrito em preparação). A fim de verificar se a ADAM23 também é fundamental na proliferação de outras linhagens tumorais, realizamos ensaios de proliferação *in vitro* com as células SKmel-37 e seus derivados ADAM23 negativos.

Para os ensaios de proliferação, assim como para os demais ensaios apresentados nesse trabalho, utilizamos como células ADAM23 negativas os clones Skcl1 e Skcl2, por apresentarem valores de expressão relativa ínfimos nos ensaios de PCR em Tempo Real (Figura 16). Os clones Skcl1 e Skcl2, em ensaios de proliferação em monocamada (ou bidimensionais) mantidos em meio completo, apresentaram tempo de dobramento de $30 \pm 0,023$ horas e $39 \pm 0,017$ horas, respectivamente, enquanto as células SKmel-37 e Skvv apresentaram $27 \pm 0,025$ horas e $26 \pm 0,026$ horas, respectivamente. As respectivas curvas de proliferação destas células estão apresentadas na figura 18 e evidenciam que o silenciamento de ADAM23 resulta em uma significativa redução da capacidade proliferativa a partir do 5º dia ($p=0,0190$ no dia 5 e $p= 0,0079$ no dia 6). Após 6 dias, houve uma redução na taxa de proliferação de 44% para Skcl1 e 49,9% para Skcl2 quando comparados às células SKmel (Figura 17).

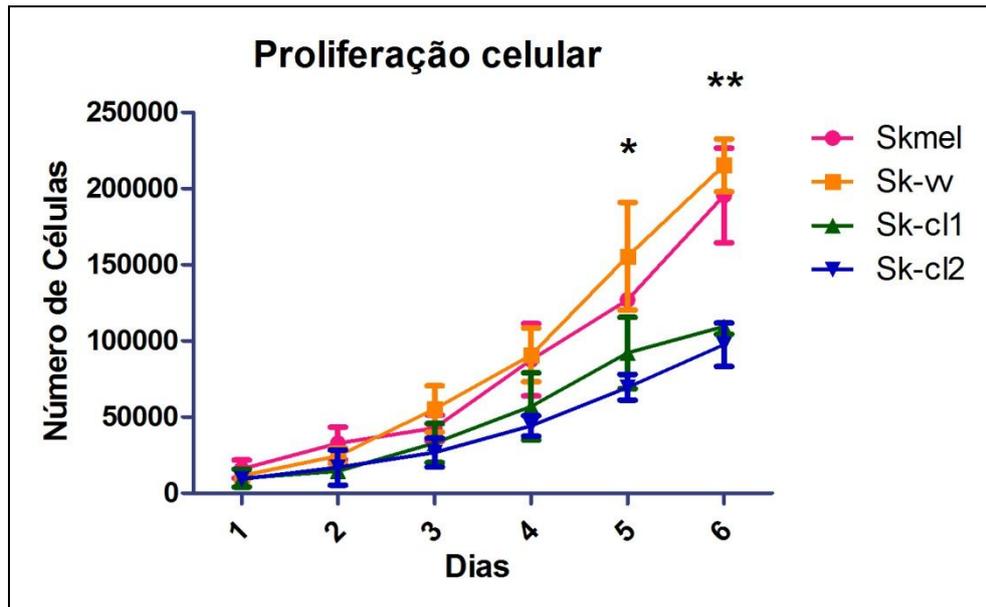


Figura 17- O silenciamento de ADAM23 diminui a capacidade proliferativa das células SKmel-37. O gráfico mostra as curvas de proliferação de células SKmel-37 ADAM23 positivas (SKmel-37 e Skw) e seus derivados ADAM23 negativos (Skcl1 e Skcl2). As células foram mantidas em meio completo (RPMI+10%FBS) e em monocamada. Foram realizados 3 ensaios independentes com duplicatas cada. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, teste ANOVA).

4.4.1.2 Ensaios de proliferação em modelo tridimensional

Em tumores o contato célula-célula é maior do que em culturas de monocamada, e a fim de avaliar se esse maior contato celular poderia interferir no efeito proliferativo de ADAM23, construímos esferas de colágeno contendo células SKmel ADAM23 positivas ou negativas e avaliamos sua proliferação. A organização das células nas esferas de colágeno (3 mg/ml) que permite que as células em seu interior proliferem aumentando o contato celular com o passar do tempo. As esferas foram incubadas durante 7 dias, e a proliferação das células foi analisada nos dias 1, 3, 5 e 7 através de ensaio de incorporação de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O MTT é um tetrazol amarelo que é convertido em formazan de cor púrpura por enzimas redutoras presentes somente em células viáveis, por este motivo é indicador de viabilidade celular e proliferação celular. A figura 18 mostra as fotos do mesmo *bead* nos dias 1, 5 e 7, evidenciando o aumento de contato celular e o gráfico mostra a curva de crescimento das células Skmel, Skvv, Skcl1 e Skcl2 contidas em cada esfera no decorrer dos 7 dias de experimento.

Ao final do experimento as esferas com células ADAM23 negativas apresentaram redução de 25,2% (Skcl1) e 30,6% (Skcl2) na taxa de incorporação de MTT quando comparadas às esferas de células ADAM23 positivas, evidenciando que o silenciamento de ADAM23 resultou em diminuição da taxa de proliferação desta linhagem celular. Essa redução da proliferação foi significativa a partir do 5º dia de experimento ($p= 0,032$ no dia 5 e $p= 0,0073$ no dia 7).

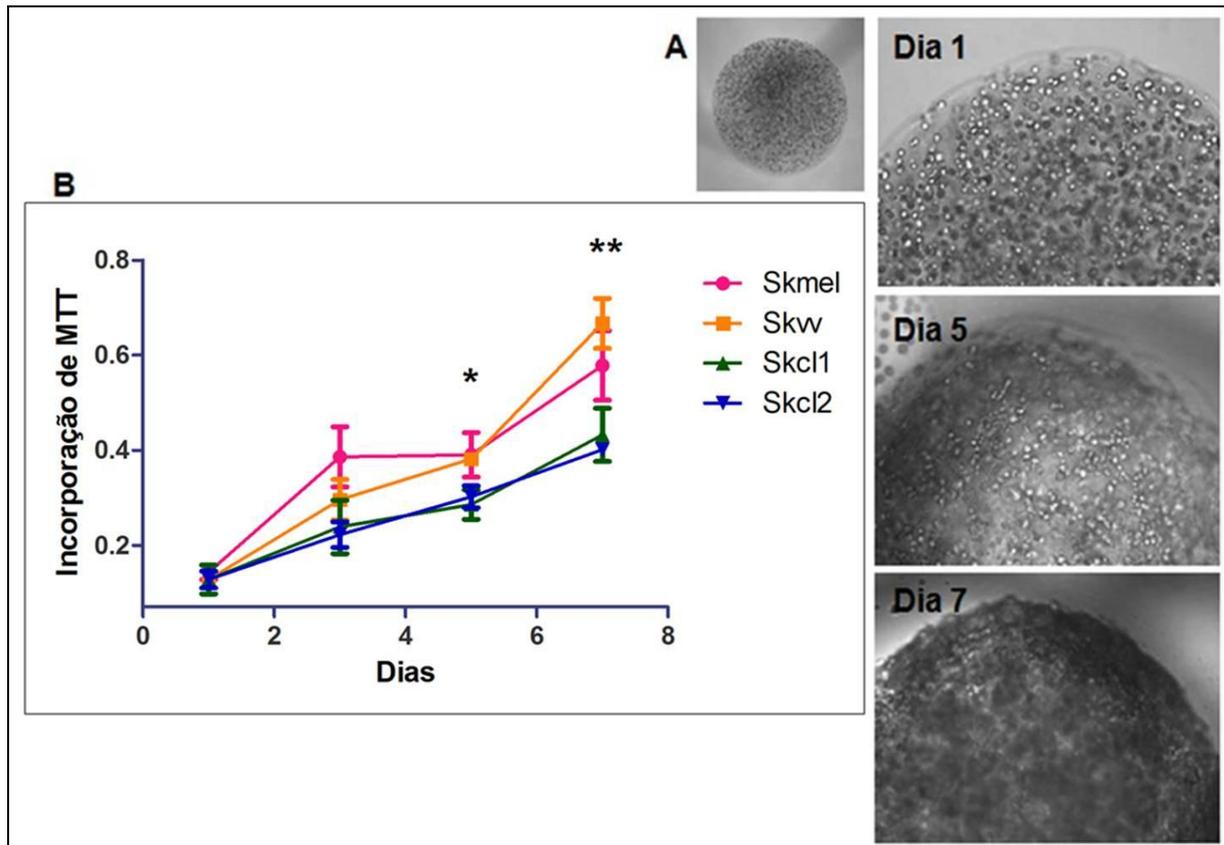


Figura 18- ADAM23 é importante na viabilidade celular das células SKmel-37 em modelo tridimensional. As células Skmel e derivadas foram inseridas em *beads* de colágeno 3 mg/ml e incubadas por 7 dias. Ao final do experimento as *beads* contendo as células foram incubadas por 4 horas com MTT. As células viáveis possuem enzimas redutoras capazes de converter o MTT em formazan mudando sua cor amarela para púrpura. A leitura da cor púrpura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm. A- Aspecto das células dentro de um *bead* nos dias 1, 5 e 7. B- Gráfico mostrando a taxa de incorporação de MTT ao longo dos 7 dias do experimento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste ANOVA).

4.4.2 Efeitos de ADAM23 na ativação da integrina $\alpha\beta3$ e nos níveis totais das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ na linhagem Skmel-37

Em seguida verificamos se o gene ADAM23 estava envolvido na modulação da atividade da integrina $\alpha\beta3$ na linhagem Skmel-37, semelhantemente ao que foi demonstrado no modelo MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009). Foi observado que o silenciamento de ADAM23 na linhagem MDA-MB-435 promove o aumento desta

integrina em sua forma ativa na membrana, o que conseqüentemente aumenta a afinidade e mobilidade celular para os ligantes dessa integrina (Verbisck, et al., 2009).

Os ensaios de detecção dos níveis da integrina $\alpha\beta 3$ nas células SKmel-37 e derivadas foram realizados por meio de citometria de fluxo. As células foram incubadas na presença dos anticorpos monoclonais AP5 (anticorpo que reconhece especificamente a forma ativada de $\alpha\beta 3$) e LM609 (anticorpo que reconhece os níveis totais, ativo e inativo, da integrina $\alpha\beta 3$) (Figura 19).

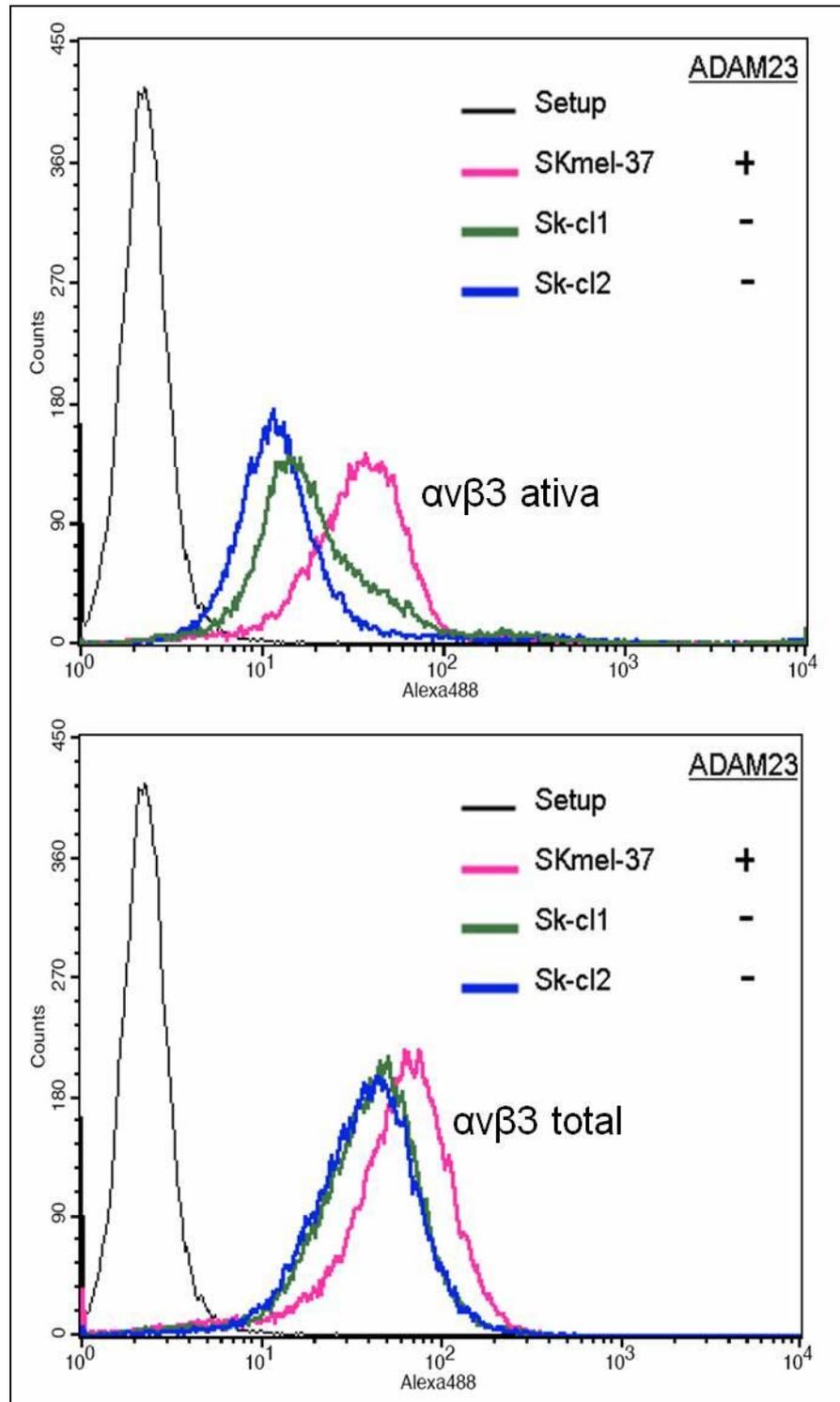


Figura 19- Análise dos níveis ativos e totais da integrina $\alpha v\beta 3$ nas células SKmel-37 e de seus derivados ADAM23 negativos por FACS. As células foram incubadas com os anticorpos LM609 (que detecta os níveis totais de $\alpha v\beta 3$ na membrana) e AP5 (que detecta somente os níveis ativos de $\alpha v\beta 3$) seguido de lavagem e incubação com o anticorpo secundário fluorescente Alexa 488 e análise por citometria de fluxo.

Diferentemente do descrito para a linhagem MDA-MB-435 (Verbisck, et al., 2009), a redução da expressão de ADAM23 nas células SKmel-37 está relacionada não com o aumento, mas com a diminuição de até 66% da forma ativa da integrina $\alpha\beta3$ e 36,8% da quantidade total desta integrina expressa na membrana celular (Figura 19). De forma complementar, evidenciamos pela primeira vez que na linhagem SKmel-37 a redução dos níveis de ADAM23 também alterou os níveis da integrina homóloga $\alpha\beta5$, levando a um aumento de até 48% nos níveis totais desta integrina expressos na membrana dessas células, o que não havia sido detectado na linhagem MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009) (Figura 20).

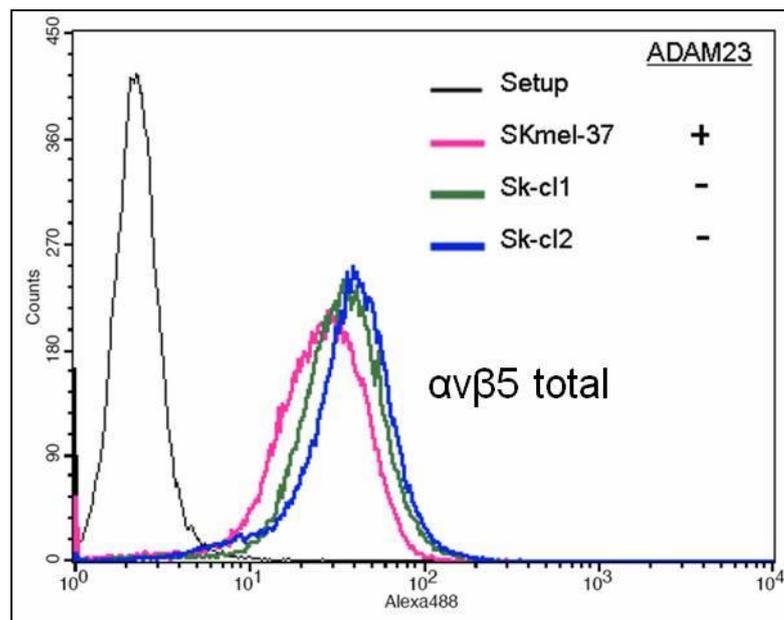


Figura 20- Análise dos níveis totais da integrina $\alpha\beta5$ nas células SKmel-37 e de seus derivados ADAM23 negativos por FACS. As células foram incubadas com o anticorpo P1F6 (que detecta os níveis totais de $\alpha\beta5$ na membrana) seguido de lavagem e incubação com o anticorpo secundário fluorescente Alexa 488 e análise por citometria de fluxo.

4.4.3 Efeitos de ADAM23 na adesão celular aos ligantes de matriz extracelular

Para avaliarmos se a troca de integrina $\alpha\beta 3$ por $\alpha\beta 5$ em células SKmel-37 silenciadas para ADAM23 resulta em algum tipo significativo de alteração no padrão de adesão celular, nosso próximo passo foi correlacionar estas alterações com a capacidade de adesão das células SKmel-37 em diferentes substratos, ligantes simultâneos destas duas integrinas. Para tal, as células foram semeadas por 2 horas em placas previamente tratadas com Vitronectina (5 $\mu\text{g/ml}$), Colágeno desnaturado (5 $\mu\text{g/ml}$), Fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$) ou Fibrinogênio (20 $\mu\text{g/ml}$) e bloqueadas com BSA, de forma que a adesão celular fosse específica para cada um destes ligantes. Em seguida, as células não aderentes foram removidas por lavagem e as aderentes foram fixadas e coradas. Após a solubilização do corante a absorbância relativa foi medida em espectrofotômetro. A figura 21 mostra que o silenciamento de ADAM23 está relacionado a uma diminuição na adesão dessas células aos 4 substratos analisados e que a diminuição nos níveis totais e da forma ativa de $\alpha\beta 3$ observada nas células SKmel-37 ADAM23 negativas parece influir predominantemente na capacidade adesiva dessas células a diferentes ligantes da matriz extracelular visto que o aumento da expressão de $\alpha\beta 5$ na ausência da proteína ADAM23 observado na linhagem SKmel-37 parece não interferir com as propriedades adesivas dessas células, não sendo observada uma compensação da diminuição da capacidade adesiva dessas células ocasionada pela diminuição nos níveis de $\alpha\beta 3$.

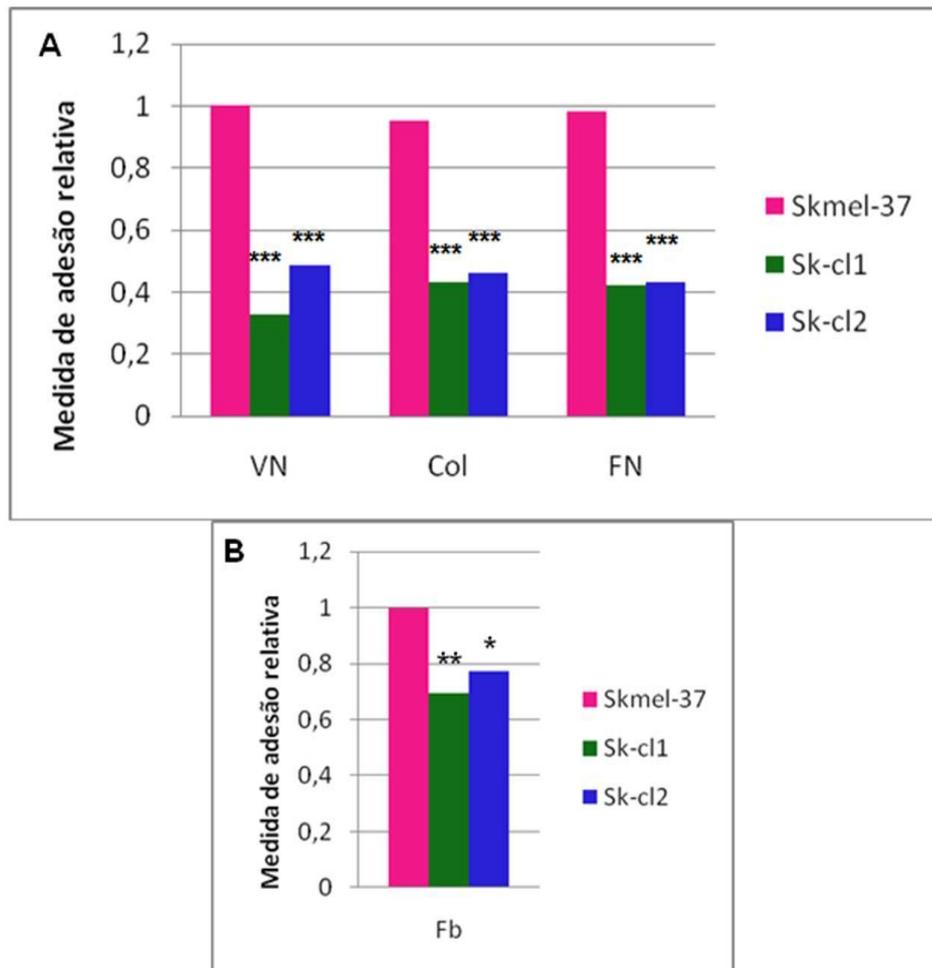


Figura 21- O silenciamento de ADAM23 está relacionado com a diminuição na adesão à Vitronectina (VN), Colágeno (Col), Fibronectina (FN) e Fibrinogênio (Fb). As células SKmel-37 e seus derivados ADAM23 negativos foram plaqueados sobre os ligantes durante 2 horas e em seguida foram lavados, fixados e corados. A medida da absorbância do corante é representada no gráfico em forma de adesão celular relativa utilizando a adesão das células SKmel-37 à VN (A) ou ao FB (B) como referência. Os gráficos representam 1 de 3 experimentos com duplicatas cada (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste t de student, não pareado, bicaudal).

A importância da integrina $\alpha\beta 3$ nesse processo de adesão na linhagem SKmel-37 foi confirmada através de ensaios de adesão à Vitronectina tratando as células com anticorpos bloqueadores de função específicos para as integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha\beta 5$. As células Skmel, Skvv e os clones silenciados (Skcl1 e 2) foram incubados na presença dos anticorpos LM609 e P1F6, que bloqueiam as integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha\beta 5$, respectivamente. Em seguida estas células foram semeadas em placas previamente incubadas com Vitronectina e bloqueadas com BSA.

A figura 22 mostra que na presença de P1F6 (i.e. $\alpha\beta 5$ funcionalmente bloqueada), $\alpha\beta 3$ é a principal integrina ativa das células SKmel-37 ADAM23 positivas, sendo responsável por 61% de sua capacidade de adesão à VN. A adesão restante (39%) é dependente da interação integrina $\alpha\beta 5$ -VN, uma vez que quando as duas integrinas são bloqueadas (LM609+P1F6) não há detecção de células aderidas. Com o silenciamento de ADAM23 nas células, confirmando os dados de expressão por FACS, ocorre uma troca funcional de receptores preferenciais de VN: a integrina $\alpha\beta 3$ passa a ter uma menor importância no processo de adesão (14% para ambos os clones ADAM23 negativos) enquanto que $\alpha\beta 5$ se torna responsável por 37% (Skcl1) e 67% (Skcl2) da adesão dos clones ADAM23 negativos. O bloqueio de ambas integrinas demonstra uma adesão restante nos clones SKcl1 (20%) e SKcl2 (8%) que deve ser de responsabilidade, possivelmente, de outros subtipos de integrinas $\alpha\beta$ não identificados como, por exemplo, $\alpha\beta 1$ ou $\alpha\beta 6$. Na ausência de bloqueadores das integrinas, a adesão celular à VN observada na figura 22 é reduzida em 50% após o silenciamento de ADAM23.

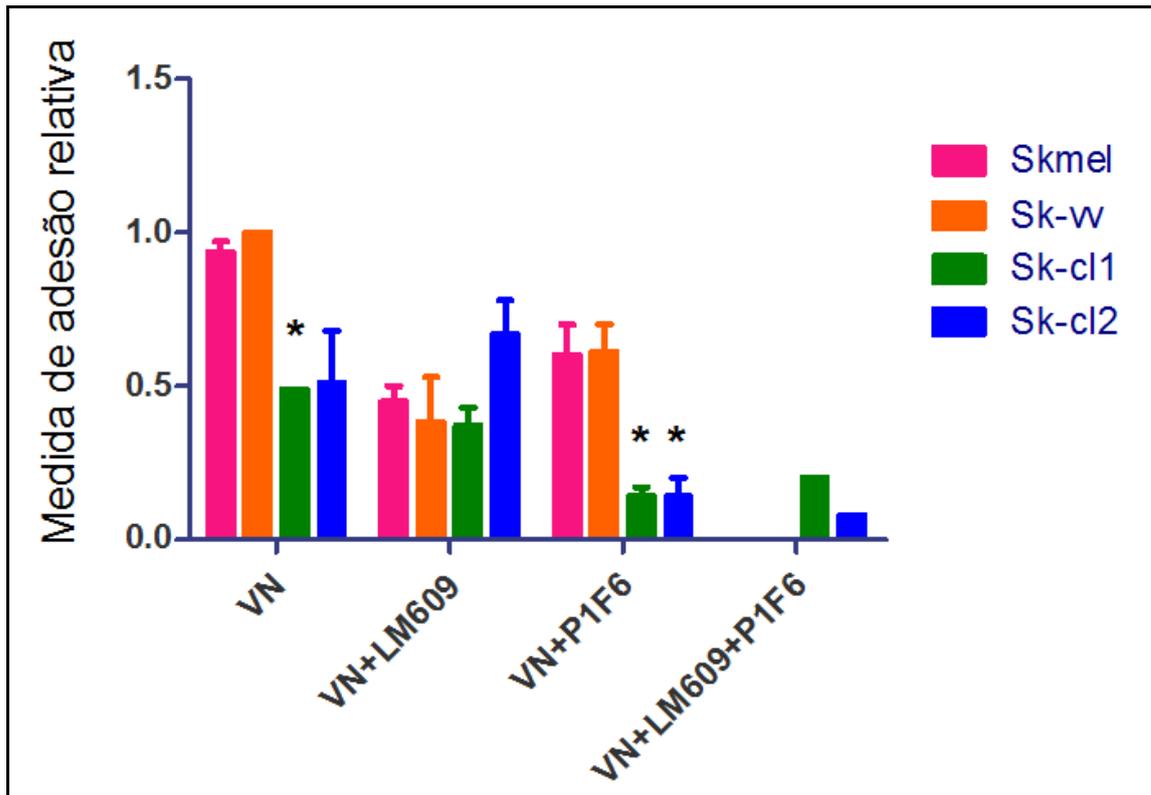


Figura 22– Alternância entre receptores celulares preferenciais de Vitronectina – $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha v\beta 5$ – é dependente da expressão de ADAM23. As células ADAM23 positivas (Skvv) e ADAM23 negativas (Skcl1 e Skcl2) foram incubadas durante 20 minutos a 4°C com os anticorpos LM609 (que bloqueia $\alpha v\beta 3$) e/ou P1F6 (que bloqueia $\alpha v\beta 5$) e em seguida plaqueadas sobre a VN. Após 2 horas as células foram lavadas, fixadas e coradas. A medida da absorbância do corante é representada no gráfico em forma de adesão celular relativa utilizando a adesão das células Skvv à VN como referência. Os gráficos apresentam a média e desvio padrão→ de 3 experimentos com duplicatas cada (* $p < 0,05$, teste t de student, não pareado e bicaudal).

4.4.4 Efeitos da ADAM23 na capacidade migratória das células SKmel-37

Para avaliar se a ADAM23 interfere na capacidade migratória das células tumorais SKmel-37, as células ADAM23 positivas e negativas foram incubadas em meio sem soro dentro de câmara transwell, e atraídas por coating de colágeno na camada inferior da membrana do transwell e meio contendo 10% SFB. Após 8 horas de incubação as células ADAM23 negativas migraram aproximadamente 6 vezes

(Skcl1, $p=0,0012$) e 5,9 vezes (Skcl2, $p<0,0001$) mais do que as células ADAM23 positivas (Skmel foi utilizada como controle comparativo no teste t não pareado bicaudal) (Figura 23) .

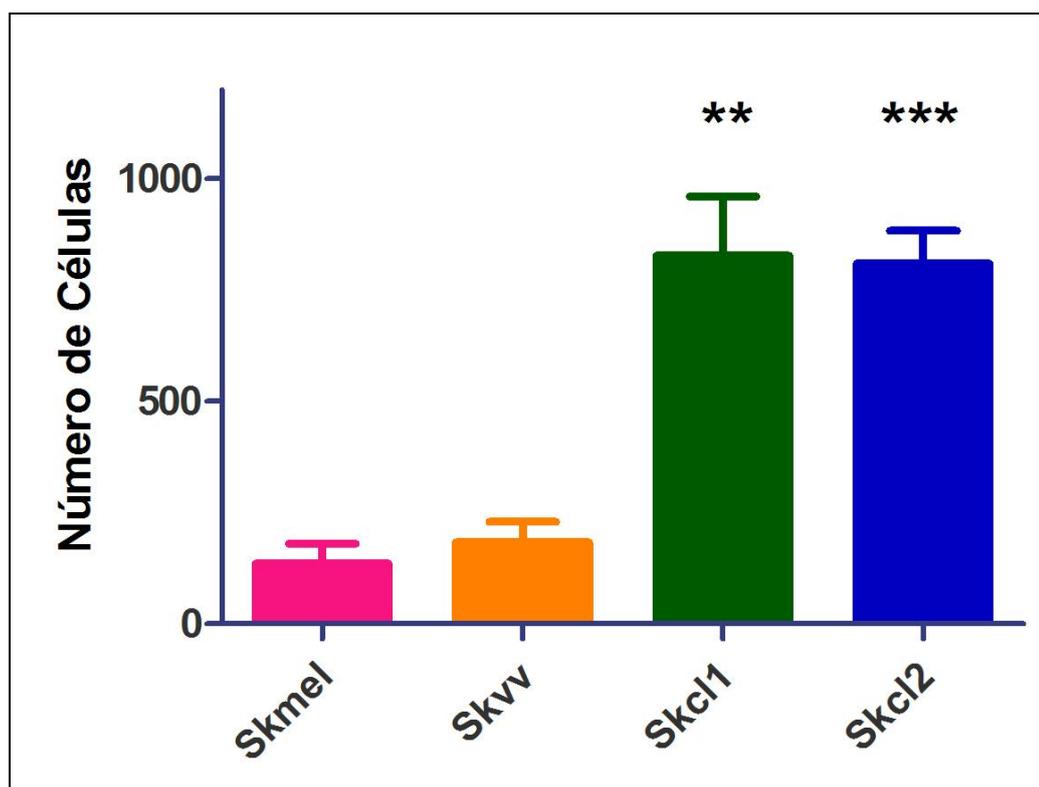


Figura 23- Ensaio de Migração em poços Transwell realizados com as células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas. O gráfico mostra a contagem de células que migraram pelo transwell em resposta ao estímulo haptotático do Colágeno e do meio contendo soro após 8 horas de ensaio. Foram realizados 3 experimentos independentes nas mesmas condições. Foram utilizados 10 $\mu\text{g/ml}$ de Colágeno em cada poço transwell. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$. teste t de student não pareado e bicaudal.

4.4.5 Efeitos de ADAM23 na capacidade invasiva das células SKmel-37 em colágeno

Para avaliar a capacidade invasiva das células SKmel-37 em uma condição mais próxima à estrutura tridimensional de um tumor, foram gerados esferóides conforme descrito no item 3.4.9. Uma vez formados, estes esferóides foram inseridos em uma matriz tridimensional de baixa densidade de colágeno tipo-1 (1,5 mg/ml) e a cinética da invasão foi observada sob microscópio óptico durante 15 dias (Figura 24 A e B).

Na figura 24A observamos os esferóides formados pelas células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas ao 15º dia do experimento. O gráfico da figura 24B mostra a cinética de invasão dos esferóides com a distância percorrida (em micrômetros) ao longo do experimento. Após 15 dias, as células ADAM23 positivas invadiram minimamente o colágeno, percorrendo distâncias de 33 μm (Skmel) e 80,5 μm (Skvv). Por sua vez, as células ADAM23 negativas demonstraram maior capacidade de se soltar do esferóide e invadir a matriz de colágeno, percorrendo distâncias de 256 μm (Skcl1) 272,5 (Skcl2) μm . A análise estatística com o teste de Kruskal-Wallis demonstrou que a diferença entre as curvas é significativa ($p= 0,018$).

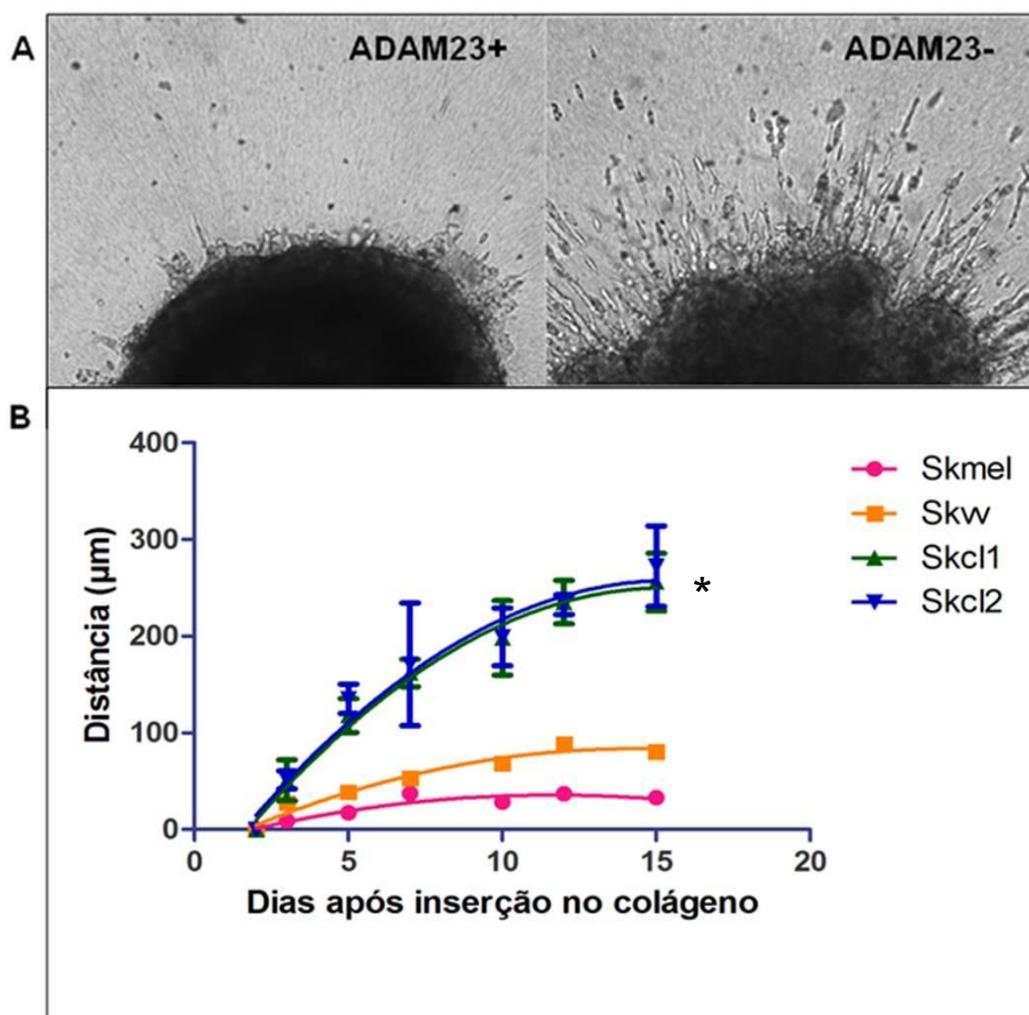


Figura 24- O silenciamento de ADAM23 favorece a invasão das células SKMel-37 na matriz de colágeno. Esferóides de células SKMel-37 e de seus derivados ADAM23 negativos foram inseridos em matriz de colágeno e mantidos na presença de meio (RPMI + 10% SFB) durante 15 dias. A invasão celular foi documentada através de fotos que foram utilizadas para medição da invasão celular utilizando o software ImageJ. A- Imagens representativas dos esferóides ADAM23 positivos e ADAM23 negativos após 15 dias da inserção na matriz de colágeno. B- O gráfico representa a média e desvio padrão da distância percorrida pelas células no decorrer dos dias do experimento. Estão representados 3 ensaios realizados com duplicatas cada ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

4.4.6 Efeitos da cooperação entre as células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas nos processos de proliferação e invasão celulares

Tumores primários possuem grande heterogeneidade clonal, criando um ambiente de interação entre subpopulações com diferentes genótipos e fenótipos. A heterogeneidade clonal é a responsável pela resistência das células tumorais aos tratamentos que são eficazes em matar uma parcela tumoral, mas acabam por selecionar clones resistentes à quimioterapia, que se propagam e retomam o crescimento tumoral (Deininger, 2005; Ebos et al., 2009; Meads et al., 2009). A heterogeneidade clonal também é importante na progressão tumoral, permitindo que o tumor se adapte às diversas alterações no ambiente e se torne mais agressivo e metastático (Anderson et al., 2006; Gatenby & Gillies, 2008). No modelo da linhagem MDA-MB-435 foi observada uma cooperação entre as células ADAM23 positivas e negativas, resultando em um aumento na capacidade proliferativa e no potencial metastático (Costa et al., manuscrito em preparação). Nosso próximo passo foi verificar se esta cooperação também existe no modelo da linhagem SKmel-37. Avaliamos o padrão de comportamento celular em um ambiente heterogêneo para a expressão de ADAM23, adicionando aos experimentos um grupo contendo células SKmel-37 ADAM23 positivas e negativas na proporção de 1:1 (50% de células ADAM23 positivas e 50% de células ADAM23 negativas), o qual denominamos grupo ADAM23 Heterotípico.

4.4.6.1 Efeitos da cooperação celular em ensaio tumorigênico in vivo

Nos itens 4.4.1.1 e 4.4.1.2 demonstramos que a ADAM23 é importante para a proliferação das células SKmel-37 em modelo bidimensional e tridimensional *in vitro*.

O próximo passo foi verificar se esse papel de ADAM23 na proliferação celular também poderia ser visto *in vivo*. Para esta finalidade, um milhão de células ADAM23 positivas, negativas ou uma mistura heterotípica (contendo 50% de células ADAM23 positivas e 50% de células ADAM23 negativas) foram injetadas subcutaneamente no dorso de cada animal Balb/c Nude (5 ou 6 animais por grupo) e os tumores foram medidos semanalmente com auxílio de paquímetro, até o 52º dia.

Os grupos ADAM23 positivo e ADAM23 negativo continham cada um 5 animais injetados dos quais 3 (ADAM23 positivo) e 4 (ADAM23 negativo) desenvolveram tumores. O grupo ADAM23 heterotípico continha 6 animais e todos eles desenvolveram tumores (Tabela 8).

Tabela 8- Ensaio tumorigênico em animais Balb/c Nude. Porcentagem de animais que desenvolveram tumores em cada grupo.

Adam23+	Adam23-	Adam23Het50%
3/5	4/5	6/6
60%	80%	100%

A figura 25 mostra que a ADAM23 é fundamental para a proliferação tumoral das células SKmel-37 *in vivo*, pois os tumores ADAM23 positivos apresentaram um crescimento mais acelerado (média de diâmetro de 1,01 cm no 52º dia) quando comparados aos tumores ADAM23 negativos (média de 0,53 cm de diâmetro no 52º dia), a partir do 25º dia do experimento ($p < 0,05$). A presença de células ADAM23 positivas no tumor heterotípico compensou a menor capacidade proliferativa das

células ADAM23 negativas, visto pelo crescimento acelerado dos tumores heterotípicos (ADAM23Het) (média de 1 cm de diâmetro no 52º dia) muito semelhante ao do grupo ADAM23 positivo. Estes resultados evidenciam o papel de ADAM23 na proliferação celular e apontam uma cooperação entre as células ADAM23 positivas e negativas neste processo.

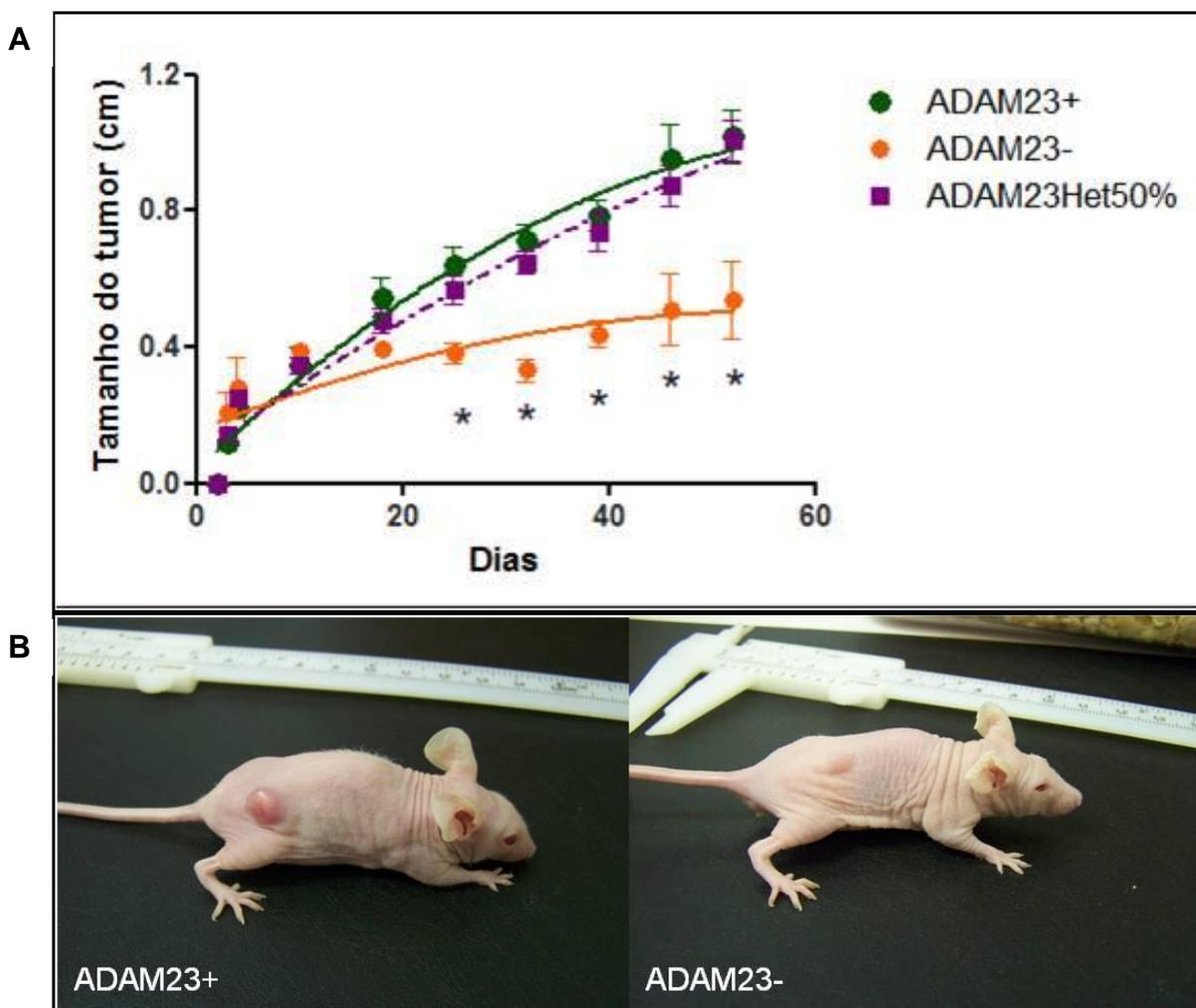


Figura 25- Ensaio tumorigênico em animais Balb/c Nude. Um milhão de células ADAM23 positivas ou ADAM23 negativas foram injetados intradermicamente na região dorsal de 16 fêmeas Nude. O diâmetro tumoral foi medido com auxílio de paquímetro a cada 8 dias. Os animais do grupo ADAM23Het50% foram injetados com uma mistura contendo 50% de células ADAM23 positivas e 50% de células ADAM23 negativas num total de 1 milhão de células por tumor. A- A média do diâmetro tumoral de cada grupo é apresentada em função do tempo após a injeção. B- Fotos dos animais evidenciando o crescimento acentuado do grupo injetado com células ADAM23 positivo. * $p < 0,05$, teste ANOVA.

4.4.6.2 Efeitos da cooperação celular nos ensaios de invasão em colágeno

Para a análise da cooperação celular nos ensaios de invasão em colágeno, foram utilizados esferóides heterotípicos contendo 50% de células ADAM23 positivas e 50% de células ADAM23 negativas. Estes esferóides foram inseridos no colágeno e observados durante 10 dias a fim de avaliar a invasão celular. Para diferenciar as

células ADAM23 positivas e negativas no mesmo esferóide, transduzimos as células SKmel-37 ADAM23 positivas com vírus contendo o vetor pCLeGFP, que leva à expressão constitutiva da proteína GFP.

A figura 26 mostra a foto de um esferóide heterotípico, com células ADAM23 positivas (verdes) e negativas migrando no colágeno após 10 dias de ensaio. A mesma figura mostra um gráfico de distância percorrida (em micrômetros) pelas células no colágeno durante o experimento. Podemos perceber claramente que as células SKGFP (ADAM23 positivas) na presença de células ADAM23 negativas percorreram uma distância em média 5,3 vezes maior (211,5 μm para Skcl1 e 176 μm para Skcl2) do que a distância percorrida quando estavam na presença de células ADAM23 positivas (28 μm para Skmel e 45 μm para Skvv). A análise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis demonstrou que a diferença entre as curvas é significativa ($p= 0,0309$), indicando que as células ADAM23 negativas aumentaram o potencial invasivo das células ADAM23 positivas neste contexto. Este resultado indica um papel cooperativo entre as células ADAM23 positivas e negativas no processo de invasão celular.

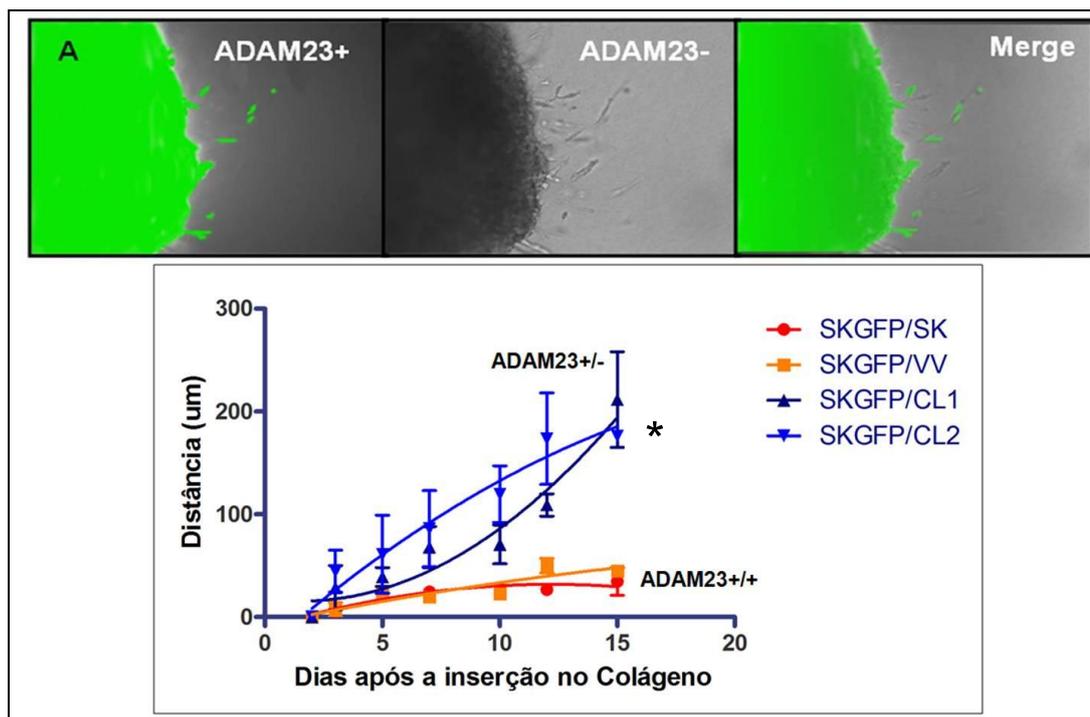


Figura 26- Células ADAM23 negativas favorecem a migração das células ADAM23 positivas em colágeno . Esferóides heterotípicos contendo 50% células ADAM23 positivas e 50% células ADA23M-negativas foram inseridos em matriz de colágeno e mantidos em presença de meio (RPMI + 10% SFB) durante 10 dias. As células ADAM23 positivas expressam GFP constitutivamente. A invasão celular foi documentada através de fotos que foram utilizadas para medição da invasão celular utilizando o software ImageJ. A- Foto de um esferóide heterotípico contendo células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas. B- O gráfico representa a média e desvio padrão da distância percorrida pelas células no decorrer dos dias do experimento. Estão representados 3 ensaios realizados com duplicatas cada. $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

5- DISCUSSÃO

5.1 Expressão do gene ADAM23 em Gliomas

A diminuição da expressão do gene ADAM23 associada à hipermetilação da região promotora desse gene já havia sido observada em outros tipos de tumores como tumores de mama (Costa, et al., 2004), tumores gástricos (Takada et al., 2005), pancreáticos (Hagihara et al., 2004), tumores de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2007) e tumores colorretais (Choi et al., 2009). A diminuição da expressão de ADAM23 em tumores parece estar associada à progressão tumoral. Essa hipótese vem dos dados obtidos com tumores de mama e tumores de cabeça e pescoço nos quais a diminuição da expressão de ADAM23 foi correlacionada com estádios mais avançados do tumor (Calmon et al., 2007; Verbisck et al., 2009). No caso dos tumores de mama também foi observada uma forte associação entre a hipermetilação da região promotora de ADAM23 e o desenvolvimento de metástases e um pior prognóstico para a paciente (Verbisck et al., 2009). Os resultados apresentados aqui, mostrando uma menor expressão de ADAM23 nos gliomas de graus mais agressivos, especialmente nos glioblastomas, reforçam a hipótese de que a redução de sua expressão é importante para a progressão tumoral.

O gene ADAM23 parece exercer um papel fundamental no sistema nervoso central. Camundongos knockout para esse gene morrem com 2 semanas de vida, com sintomas como ataxia e tremor correspondentes aos defeitos nos ganglios basais, o que sugere que a proteína ADAM23 tem um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso (Leighton et al., 2001; Mitchell et al., 2001). O gene que codifica a proteína ADAM23 é bastante expresso no SNC e os níveis mais elevados de expressão neste tecido foram encontrados nos neurônios de gânglios

basais e cerebelo (Goldsmith et al., 2004; Sagane et al., 1998). Em ratos, foi visto que esse gene é expresso em todos os estágios do desenvolvimento pós natal e há indícios de que a proteína ADAM23 esteja relacionada com estágios iniciais e tardios do desenvolvimento neuronal (Sun et al., 2007). Verificou-se que ADAM23 possui papel importante na diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrionário) em neurônios bem como na formação de neuritos, o que sugere que esta proteína seja importante tanto em eventos iniciais quanto tardios da diferenciação neuronal (Sun et al., 2007). Este papel de ADAM23 na diferenciação dos neurônios pode indicar que o silenciamento desta proteína em gliomas de grau avançado pode se relacionar com a perda de diferenciação celular e consequente ganho de malignidade.

5.2 Análise dos possíveis mecanismos responsáveis pela inativação do gene ADAM23 em gliomas

Visto que a hipermetilação da região promotora da ADAM23 é a principal causa da diminuição de sua expressão nos tumores de mama (Costa et al., 2004), tumores gástricos (Takada et al., 2005), tumores de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2007), o próximo passo desse estudo foi analisar o padrão de metilação da região promotora do gene ADAM23 a fim de correlacionar a presença de metilação nesta região com a diminuição da expressão gênica nas amostras de gliomas. A análise das amostras de GBM, contudo, revelou a ausência de metilação em sua região promotora.

O passo seguinte foi a procura por mutações na região codificante do gene ADAM23, no entanto a análise das sequências e cromatogramas correspondentes não detectou mutações em nenhum dos 27 exons analisados.

Um amplo estudo de análise genômica em GBM foi realizado em 2008 por Parsons e colaboradores. Neste estudo 20.661 genes foram sequenciados, dentre eles ADAM23, em 22 amostras de GBM. Este estudo ainda verificou a presença de amplificações e deleções usando *High Density Oligonucleotide Arrays*, e analisou a expressão gênica dessas amostras através do uso de seqüenciadores de última geração. Os dados obtidos não acusaram a presença de mutações nos exons correspondentes ao gene da ADAM23 em nenhuma das 22 amostras. Este estudo reforça os dados que obtivemos na análise de nossas amostras de GBM, indicando que a redução da expressão de ADAM23 em GBM não está relacionada com a presença de mutações na sequência codificante deste gene. O mesmo estudo também não encontrou amplificações ou deleções de ADAM23 nas 22 amostras de glioblastomas analisadas, e somando-se a ele, outros trabalhos que estudaram a variação de número de cópias gênicas em glioblastomas também não encontraram sinais de amplificação ou deleção de ADAM23 (Korshunov et al., 2006; Maher et al., 2006; Ruano et al., 2006).

Estes dados amparam os nossos resultados sobre a ausência de LOH (*Loss of Heterozygosity*) nas amostras que analisamos. A LOH é outro mecanismo comumente encontrado em tumores, que se relaciona com a redução de expressão gênica através da perda de um dos alelos de um gene através da deleção de segmentos cromossômicos, ou cromossomos inteiros. Takada e colaboradores encontraram amostras de tumores gástricos com deleção homozigota do gene ADAM23 (2005), justificando ainda mais nosso interesse na investigação da possível deleção deste gene nas amostras de GBM.

A análise revelou que as amostras não apresentam LOH na região correspondente ao gene ADAM23. Este resultado foi duplamente verificado no caso

das amostras GBM35, GBM510, GBM629 e GBM1002 que eram heterozigotos para pelo menos 2 dos marcadores analisados. A perda de ADAM23 por LOH foi observada em tumores gástricos, com uma frequência baixa (2,6-3,1% das amostras analisadas) (Takada et al., 2005), e é provável que esta frequência baixa também ocorra em gliomas, sendo necessário analisar um maior número de amostras a fim de encontrar a deleção homozigótica de ADAM23. Nos tumores gástricos que não tinham LOH foi detectada a hipermetilação como sendo o mecanismo responsável pela redução da expressão de ADAM23 nestes tumores. Nossas análises até o momento descartaram a hipermetilação, mutação e LOH como mecanismos causadores do silenciamento de ADAM23 em GBM.

Nosso próximo passo foi analisar a expressão de microRNAs que pudessem regular a expressão de ADAM23 em GBM. MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs (19-22 nucleotídeos) não codificantes com importantes funções regulatórias em processos fisiológicos e patológicos (Kutter & Svoboda, 2008), inclusive em câncer. A desregulação da expressão de miRNA em tumores está bem estabelecida, ligada ao crescimento celular, controle do ciclo celular, evasão de apoptose, invasão celular, metástase e angiogênese (Croce, 2009). Até o momento não foram relatados microRNAs com função regulatória sobre ADAM23, no entanto, um estudo dirigido por um grupo de colaboradores liderado pelo Dr. Newton Verbisck (dados não publicados) estudou a região 5'-UTR e 3'-UTR do gene ADAM23 em busca de sequências alvo para miRNAs que pudessem agir na regulação da expressão deste gene, e encontrou regiões que poderiam ser alvo dos microRNAs hsa-miR-92a, hsa-miR-92b e hsa-miR-32.

O aumento da expressão de um desses miRNAs em uma amostra poderia indicar o seu envolvimento na diminuição da expressão de ADAM23, pois quanto

maior a quantidade de moléculas reguladoras de ADAM23, maior sua clivagem e consequentemente menor a quantidade de moléculas de mRNA de ADAM23. No entanto, esta correlação não foi vista com nenhum destes 3 miRNAs, indicando que não possuem papel na regulação de ADAM23 em gliomas. Existe a possibilidade de que estes miRNAs não exerçam de fato este papel regulatório dentro das células, e que as sequencias de ligação destes miRNAs encontradas no mRNA de ADAM23 pelos programas de bioinformática sejam insuficientes para que esta ligação e clivagem do mRNA aconteça. Ainda existe a necessidade de validação desses dados, comprovando que estes miRNAs de fato regulam a expressão de ADAM23.

Outro mecanismo que poderia explicar a diminuição da expressão do gene ADAM23 nas amostras de GBM consiste na desacetilação de histonas, que conjuntamente com a metilação de ilhas CpG na região promotora confere um silenciamento completo do gene alvo. Em alguns tumores essas alterações epigenéticas podem silenciar também os genes vizinhos, ou seja, dois ou mais genes podem ser afetados pela regulação epigenética de uma única região hipermetilada e/ou desacetilada (Hitchins et al., 2007; Novak et al., 2006; Toyota et al., 1999). Um exemplo é o caso de uma região de 2.4 Mb do cromossomo 3p22 que foi associada em tumores de cólon com a hipermetilação e consequente silenciamento de transcrição do gene MLH1 enquanto que outros genes, dentro da mesma região, estão silenciados apesar de não estarem metilados (Hitchins, et al., 2007). Outro estudo, também em tumores de cólon, mostrou que uma região de 4 Mb do cromossomo 2q14.2 possui genes silenciados, associados à metilação da histona H3 Lys9 (Frigola et al., 2006).

Não podemos descartar também a possibilidade de existirem mutações em regiões regulatórias de *splicing*, ou em regiões do DNA onde se ligam fatores de

transcrição gênica, pois essas regiões não foram analisadas em nosso trabalho. É necessário, portanto, investigar estes mecanismos nas amostras de glioma a fim de esclarecer o mecanismo responsável pelo silenciamento de ADAM23 nestas amostras.

5.3 Papel funcional de ADAM23

O interesse em estudar a função de ADAM23 em tumores veio da observação de seu envolvimento em diversos tipos tumorais, com o seu silenciamento associado à progressão tumoral e pior prognóstico para o paciente. De início, nosso objetivo foi estudar sua função na linhagem de glioma humano U87MG utilizando a técnica de silenciamento por interferência de RNA (RNAi).

Para avaliar as alterações causadas pelo silenciamento de ADAM23 em tumores de mama, em nosso laboratório foram gerados clones de células da linhagem tumoral MDA-MB-435 após a transfecção dessas células com o vetor pAVU6+27 contendo uma construção de shRNA específica para a sequência de ADAM23 (ADAM23-shRNA) (Verbisck et al., 2009). Os derivados de MDA-MB-435 selecionados apresentaram o completo silenciamento dos níveis de RNA mensageiro para ADAM23, resultando em um aumento da atividade da integrina $\alpha\beta3$ e, conseqüentemente, em uma maior capacidade adesiva e migratória das células derivadas (Verbisck, et al., 2009).

Em nosso modelo de estudo, a linhagem de glioma U87MG, utilizamos a mesma estratégia (shRNA), porém com outro vetor – o vetor retroviral pSR – e um sistema de transdução viral. A diminuição observada para os níveis de mRNA de ADAM23 na população transduzida e selecionada foi de aproximadamente 5 vezes em comparação com as células controle (i.e. não transduzidas ou transduzidas com

o vetor pSR vazio). Na tentativa de obtermos derivados celulares com maior nível de redução da expressão do gene ADAM23, 14 clones de células U87MG/pSR-ADAM23-shRNA foram isolados e selecionados. Em todos estes derivados clonais o nível máximo de redução da expressão de ADAM23 observado não foi superior a 5 vezes quando comparado às células controle respectivas.

Nos ensaios de adesão realizados com os clones U87MG com expressão reduzida de ADAM23, não foram evidenciadas alterações nos níveis totais e ativos da integrina $\alpha\beta3$ na membrana das células bem como no comportamento adesivo ao colágeno e à vitronectina. Da mesma maneira, não houve diferença na taxa de proliferação dessas células que pudesse estar relacionada à redução da expressão de ADAM23 (proliferação em monocamada, dados não mostrados).

Uma possível explicação para os resultados obtidos na linhagem U87MG é que a redução da expressão de ADAM23 obtida nesta linhagem não seja suficiente para evidenciar os efeitos de ADAM23 observados na linhagem MDA-MB-435. Para esta linhagem fomos capazes de gerar clones com níveis bastante reduzidos de ADAM23, a ponto de seu mRNA não ser detectado em ensaios de PCR em Tempo Real, ao contrário dos clones obtidos com a linhagem U87MG, que possuem expressão de ADAM23 reduzida em apenas 5 vezes comparado às células ADAM23 positivas.

Numa tentativa de obter maiores níveis de silenciamento de ADAM23 nas células U87MG, optamos por testar a estratégia de siRNA que, embora seja transiente, permite uma melhor titulação dos efeitos de interferência de RNA e uma análise mais rápida destes efeitos, pois após a transfecção esses duplexes são incorporados diretamente no complexo molecular efetor do silenciamento (Kim et al., 2005). As células transfectadas com os duplexes sintéticos de RNA de interferência,

denominadas de U87-siRNA, apresentaram uma redução de expressão de aproximadamente 17 vezes em relação às células transfectadas com sequência inespecífica, (*scramble*). Curiosamente, a análise das fases do ciclo celular destas células, utilizando iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo evidenciou um intenso acúmulo de células na interface G0/G1 após 72 horas da transfecção com os duplexes em comparação às células controle. Este efeito, embora reproduzido em três experimentos independentes, não foi observado em tempos mais inferiores à 24 horas (dados não apresentados), sugerindo que a parada na interface G0/G1 de células U87MG seja uma resposta celular decorrente de um maior período de exposição à níveis reduzidos de ADAM23.

É possível que os efeitos funcionais do silenciamento do gene ADAM23 só seja visto em clones com silenciamento quase completo do gene ADAM23, no entanto, nas células U87MG este silenciamento parece estar limitado ao máximo de cerca de 5-20 vezes, sendo que, além deste valor, é observado um intenso bloqueio da progressão no ciclo celular, superior ao observado quando estas células são carenciadas de soro por 72 horas. Em outras palavras, esta inibição mais intensa e prolongada da expressão de ADAM23 produz um forte sequestro das células U87MG na interface G0/G1 do ciclo celular. Desta maneira, as células com menor expressão de ADAM23 diminuem na população, o que impossibilita a obtenção de clones com um bom silenciamento deste gene

Dois mecanismos distintos podem estar associados ao bloqueio do ciclo celular em G0/G1 observado nas células U87MG com níveis elevados de silenciamento do gene ADAM23: o disparo de vias que induzem a diferenciação terminal ou senescência. Em 2007, Sun e colaboradores (Sun et al., 2007) isolaram 39 derivados clonais da linhagem de carcinoma embrionário murino P19 que

apresentavam a expressão reduzida de ADAM23. Somente três destes clones foram selecionados para os ensaios funcionais por apresentarem os menores níveis de expressão de ADAM23, que foram de apenas: 1,4, 4 e 10 vezes silenciados quando comparado às células parentais. Além disso, a pequena redução dos níveis de expressão de ADAM23 nestes derivados permitiu a diferenciação terminal destas células em neurônios, mesmo na ausência do indutor de diferenciação, o ácido retinóico, enquanto as células P19 parentais não se diferenciaram na ausência deste indutor (Sun, et al., 2007). Estes resultados evidenciam que ADAM23 possa atuar biologicamente em processos de diferenciação em células precursoras de neurônios.

Tornam-se necessárias mais análises para determinarmos se a parada G0/G1 das células U87MG/iRNA está relacionada com diferenciação ou senescência celular. Também seria interessante analisar se o silenciamento de ADAM23 se relaciona com parada do ciclo celular em outras linhagens de glioma, em culturas primárias de astrócitos e também em outros tipos tumorais. Se essa alteração do ciclo celular for dependente de um papel da ADAM23 exclusivo no SNC, é possível que seja detectada somente em linhagens cerebrais.

A ação exclusiva de ADAM23 no SNC pode existir através da interação com seus parceiros moleculares específicos do SNC. Um destes parceiros, o produto do gene LIG1, foi inicialmente identificado em translocações cromossômicas nas linhagens de glioblastoma T98G e A172 e em uma série de glioblastomas primários (Chernova et al, 1998). Esta associação ADAM23-LIG1 foi recentemente descrita por Sagane e colaboradores (Sagane et al., 2008) e, conjuntamente com os dados funcionais já descritos sobre a função de LIG1-1, sugerem que ADAM23 possa atuar no SNC de forma específica, modulando em células da glia e em neurônios, vias que controlam duas diferentes patologias: gliomas e epilepsias. O gene LIG1-1 já foi

considerado um gene supressor tumoral por ser encontrado frequentemente inativo, por mutações ou deleções, em linhagens e amostras de GBM (Chernova, et al., 1998). Sua proteína é secretada para o meio extracelular (Senechal et al., 2005) e seus prováveis receptores são as ADAMs 11, 22 e 23, que se ligam forte e especificamente a LIG-1 (Fukata et al., 2006; Sagane et al., 2008). Kunapuli e colaboradores (Kunapuli et al., 2003) demonstraram que LIG-1 está ausente na linhagem de glioma T98G enquanto que em U87MG é expresso normalmente. A re-expressão de LIG-1 (recombinante) em T98G levou a uma diminuição na sua capacidade de adesão, migração e proliferação independente de ancoragem. No entanto, quando LIG-1 recombinante foi expressa em U87MG não foram observados os mesmos efeitos (Sagane et al., 2008). Isso demonstra que a LIG-1 endógena deve possuir papel específico e regulado nessa linhagem. E visto que a expressão de ADAM23 em T98G é extremamente reduzida (Costa et al., 2005), é possível que a ADAM23 participe dessa regulação em U87MG.

A interação ADAM23-PrPC também precisa ser avaliada em gliomas. PrPC é uma proteína expressa em cérebro e relacionada com várias doenças neurodegenerativas (Linden et al., 2008). Embora as ADAMs 9, 10 e 17 estejam envolvidas no seu processamento (Cissé et al., 2005; Vincent et al., 2001), sabemos que esse envolvimento se dá através da atividade metaloproteolítica que essas ADAMs possuem. A ADAM23 por sua vez, não possui o domínio metaloprotease e sua interação com PrPc (Costa et al., 2009) possui funções desconhecidas até o momento. Costa e colaboradores viram que a ADAM23 co-localiza com PrPC na membrana plasmática de neurônios hipocâmpais de camundongos (Costa et al., 2009) e é capaz de interagir com PrPc tanto endógeno quanto recombinante. Também foi demonstrado que em neurônios dos gânglios da raiz dorsal de ratos que

não expressam PcPC, existe um aumento tanto na ativação quanto na expressão da integrina $\alpha\beta3$ (Hajj et al., 2007).

Um outro modelo gerado em nosso laboratório com o objetivo de estudar a função de ADAM23 em tumores utilizou a linhagem de melanoma humano SKmel-37. A linhagem de melanoma humano SKmel-37 foi escolhida para avaliar o nosso modelo de interação entre a ADAM23 e a integrina $\alpha\beta3$ pois expressa quantidades elevadas de ambas as proteínas. Além disso, embora ainda não existam estudos sobre a expressão de ADAM23 em melanomas, o papel da integrina $\alpha\beta3$ tem sido amplamente estudado nesse tipo de tumor e sua expressão está associada à progressão e malignidade em melanomas (Albelda et al., 1990; Felding-Habermann et al., 1992; Van Belle et al., 1999).

A estratégia de silenciamento utilizada para reduzir os níveis de ADAM23 nas células SKmel-37 foi a transfecção com o vetor pAVU6+27 contendo a mesma construção utilizada nos modelos MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009). Ao contrário dos resultados obtidos com a linhagem U87MG, os clones obtidos a partir desta linhagem apresentaram uma redução bastante significativa na expressão de ADAM23 e foram utilizados nos ensaios funcionais.

Primeiramente foram realizados ensaios a fim de verificar uma possível influência de ADAM23 na capacidade proliferativa dessas células, como ocorre com a linhagem MDA-MB-435 quando cultivada em modelo tridimensional (Costa et al., manuscrito em preparação). Na linhagem SKmel-37, o silenciamento de ADAM23 resultou em menor capacidade de proliferação celular em ensaios de proliferação em monocamada. Estes dados evidenciaram que a taxa de proliferação nas células SKmel-37, mantidas em monocamada e em condições ideais de cultivo, dependem dos níveis constitutivos de ADAM23 expressos por estas células. O

mesmo resultado foi visto quando as células foram mantidas em condições que aumentam o contato célula-célula (modelo tridimensional). Este resultado confirma o papel importante de ADAM23 na proliferação celular, tanto em células em monocamada como em modelo tridimensional, com maior contato celular.

Na continuação de nossas investigações da função de ADAM23 em tumores, decidimos também investigar sua relação com a ativação da integrina $\alpha\beta3$ e com a capacidade adesiva celular. Os ensaios de detecção dos níveis desta integrina nas células SKmel-37 e derivadas foram realizados por meio de citometria de fluxo. Diferente do descrito para a linhagem MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009), a redução da expressão de ADAM23 nas células SKmel-37 está relacionada não com o aumento, mas com a diminuição de até 66% da forma ativa da integrina $\alpha\beta3$ e 36,8% da quantidade total desta integrina expressa na membrana celular. Esta diminuição nos níveis totais e da forma ativa de $\alpha\beta3$ observada nas células SKmel-37 ADAM23 negativas parece influir diretamente na capacidade adesiva dessas células a diferentes ligantes da matriz extracelular. Complementariamente, evidenciamos pela primeira vez que na linhagem SKmel-37 a redução dos níveis de ADAM23 também alterou os níveis da integrina $\alpha\beta5$, levando a um aumento de até 48% nos níveis totais desta integrina expressos na membrana dessas células, o que não havia sido detectado na linhagem MDA-MB-435 (Verbisck et al., 2009). Porém o aumento da expressão de $\alpha\beta5$ na ausência da proteína ADAM23 observado na linhagem SKmel-37 parece não interferir com as propriedades adesivas dessas células, visto que não foi observada uma compensação da diminuição da capacidade adesiva dessas células ocasionada pela diminuição nos níveis de $\alpha\beta3$.

De forma geral, embora estes dados sejam diferentes dos obtidos com a linhagem MDA-MB435, eles evidenciam que, de fato, ADAM23 atua no controle da

expressão e ativação destas integrinas α v, possivelmente modulando os níveis de sua interação com cada parceiro beta (ao menos, β 3 e β 5). Até o presente, pelo menos 5 subunidades beta associam-se com α v: beta-1, beta-3, beta-5, beta-6 e beta-8. Destes, α v β 3 é a mais promíscua, sendo capaz de reconhecer múltiplos ligantes contendo a sequência RGD (Cheresh & Spiro, 1987), enquanto α v β 5 é mais específica a alguns ligantes (Cheresh, 1989; Smith et al., 1990). Embora todas as integrinas α v β 3 e α v β 5 contenham muitas similaridades estruturais e idênticas subunidades α v, suas caudas citoplasmáticas são estruturalmente distintas, ativando diferentes vias de sinalização. Wayner e colaboradores, mostraram que ambas integrinas, α v β 3 e α v β 5, contribuem para adesão de células de melanoma em vitronectina, entretanto apenas α v β 3 encontra-se agrupada em regiões específicas denominadas de contatos focais, enquanto α v β 5 está sublocalizada em regiões distintas da membrana, agrupada em pequenos grupos dispersos por toda a membrana (Wayner, et al., 1991). Assim, especulamos que o controle da expressão das integrinas α v, dependentes de ADAM23, possa ser linhagem dependente e que possa variar de acordo com os níveis expressos de cada isoforma de ADAM23 (α , β ou γ) que, por sua vez, analogamente podem estar distribuídas em distintas localizações na membrana, ou ainda, varie conforme os níveis de expressão dos subtipos de integrinas α v de cada linhagem. As diferenças no domínio transmembrana das diferentes isoformas de ADAM23 também podem resultar em diferentes localizações na membrana celular e na possível secreção da isoforma γ .

Outro aspecto importante das células tumorais é a sua capacidade de migração dentro dos tecidos, facilitando o processo de metástase. Para avaliar se a ADAM23 interfere na capacidade migratória das células tumorais, as células SKmel-37 ADAM23 positivas ou negativas foram incubadas em meio sem soro dentro de

câmara *transwell*, e atraídas por coating de colágeno na camada inferior da membrana do *transwell*. Após 8 horas de incubação as células SKmel-37 ADAM23 negativas migraram aproximadamente 6 vezes mais do que as células ADAM23 positivas. A alteração da capacidade de migração celular dependente de ADAM23 já havia sido descrita nas células MDA-MB-435. Foi observado que as células 435 ADAM23 negativas migraram 4 vezes mais do que as células 435 ADAM23 positivas em ensaios de *transwell* utilizando vitronectina ou fibronectina como atraentes (Verbisck et al., 2009). O aumento da capacidade migratória nas células que perderam a expressão de ADAM23 pode favorecer o processo de metástase tumoral, à medida que aumenta a capacidade da célula migrar do tumor primário pelo tecido até cair na circulação sanguínea e alcançar outros órgãos.

Um resultado semelhante foi observado no papel de ADAM23 na capacidade invasiva das células SKmel-37. Os experimentos de invasão foram realizados com esferoides multicelulares imersos em matriz de colágeno, no intuito de gerar uma condição mais próxima à estrutura tridimensional de um tumor. Ao final do experimento, os esferóides ADAM23 negativos haviam invadido a matriz de colágeno e percorrido maiores distâncias do que os esferóides ADAM23 positivos. Estes dados nos mostram que a ausência de ADAM23 favorece processos invasivos celulares, que são primordiais para que ocorra a metástase tumoral.

Nossos resultados mostram que as células SKmel-37 dependem de ADAM23 para a sua proliferação e sua adesão aos ligantes de matriz extracelular como o colágeno, vitronectina, fibronectina e fibrinogênio. Por outro lado a ausência de ADAM23 favorece a invasão e a migração dessas células na matriz de colágeno. Os dados com as amostras de gliomas analisadas neste trabalho, junto com outros estudos realizados em diferentes tipos tumorais (Calmon et al., 2007; Verbisck et al.,

2009) nos mostram que o silenciamento de ADAM23 acontece progressivamente no decorrer do desenvolvimento tumoral. Desta maneira, podemos especular que ao longo da progressão do tumor, o silenciamento de ADAM23 diminui a capacidade de proliferação e de adesão das células na matriz extracelular e aumenta o seu potencial de migração e invasão nesta matriz.

O tumor primário possui grande heterogeneidade celular, contendo subpopulações clonais com diferentes alterações genômicas e características fenotípicas distintas. Dentro deste contexto podemos especular que durante o processo de progressão do tumor as células ADAM23 positivas, com suas características de alta proliferação e adesão à matriz extracelular, convivem e possivelmente interagem com as células ADAM23 negativas, que perderam seu potencial proliferativo e adesivo e que possuem maiores capacidades migratórias e invasivas. Os resultados deste convívio e possível interação dessas células foram estudados por nosso grupo no modelo MDA-MB-435, revelando que dentro de um ambiente heterogêneo para ADAM23, as células ADAM23 negativas estimulam a proliferação das células ADAM23 positivas em ensaios de proliferação *in vitro* e *in vivo*. Além disso, experimentos *in vitro* de migração e invasão celulares mostraram que no modelo MDA-MB-435 as células ADAM23 negativas promovem um aumento nas capacidades migratórias e invasivas das células ADAM23 positivas (Costa et al., manuscrito em preparação).

Essa mesma cooperação entre células ADAM23 positivas e negativas foi observada em nosso modelo com a linhagem SKmel-37. Primeiramente em um ensaio tumorigênico *in vivo*, foi medido o crescimento de tumores formados por uma mistura de células ADAM23 positivas e ADAM23 negativas, na proporção de 1:1. Esses tumores heterotípicos apresentaram uma curva de crescimento muito

semelhante à curva formada pelos tumores ADAM23 positivos, enquanto que o esperado era que apresentassem uma curva intermediária entre as curvas de tumores ADAM23 positivos e negativos. Este resultado sugere uma cooperação entre estas células resultando em uma maior capacidade proliferativa do tumor como um todo.

A cooperação entre células SKmel-37 ADAM23 positivas e negativas também foi vista em experimentos de invasão na matriz de Colágeno. Neste ensaio a presença de células ADAM23 negativas conferiu às células ADAM23 positivas uma maior capacidade de invasão no colágeno. Estes resultados mostram que as células ADAM23 negativas facilitam a migração das células ADAM23 positivas, embora ainda não saibamos como esse processo de facilitação da migração ocorre. É possível que as células ADAM23 negativas migrem à frente das células ADAM23 positivas abrindo caminho para que estas migrem através do colágeno. Este tipo de comportamento já foi observado em outro tipo de linhagem de melanoma (células de melanoma MV3), no qual as células que lideram a invasão o fazem através da abertura de caminhos menos resistentes na matriz de colágeno, que se tornam as rotas de migração preferenciais para as outras células (Friedl et al., 1997). A produção de fatores produzidos pelas células ADAM23 negativas que atraíam as células ADAM23 positivas também poderia ser investigada, em busca de algum fator quimioatraente produzido na ausência de ADAM23. Em conjunto, estes resultados nos levam a elaborar um modelo no qual a expressão de ADAM23 é importante para a proliferação do tumor primário, e conforme este tumor progride o silenciamento de ADAM23 gera uma população heterogênea, com características distintas, mas que cooperam entre si aumentando a eficiência do processo metastático tumoral.

O mecanismo de cooperação entre células genotipicamente e fenotipicamente diferentes dentro de um tumor tem sido bastante estudado. Lyons e colaboradores (2008) propuseram o mecanismo conhecido como cooperatividade interclonal, no qual mutações ocorrem em diferentes clones dentro de um tumor, e estes clones se complementam e cooperam para a progressão tumoral. O fenótipo resultante desta cooperação é mais maligno do que antes da cooperação (Lyons et al., 2008; Martorana et al., 1998). Outros casos de cooperação ocorrem entre células tumorais e não tumorais, como o que ocorre com as células de carcinoma mamário e as células tronco mesenquimais localizadas no estroma tumoral (Karnoub et al., 2007). Quando a mistura dessas células foi utilizada para formação de tumores subcutâneos em experimentos *in vivo*, resultou no aumento do potencial metastático das células do carcinoma. Neste caso, as células tumorais estimulam a secreção de CCL5 (*Chemokine -C-C motif- ligand 5*) pelas células tronco mesenquimais, o que resulta no aumento da mobilidade, invasão e potencial metastático das células tumorais. Outro exemplo de cooperação celular que facilita a metástase foi descrito no modelo murino de SCLC (*Small Cell Lung Cancer*) (Calbo et al., 2011). Neste caso o tumor é formado por 2 populações de células: as que expressam marcadores neuroendócrinos e as que expressam marcadores mesenquimais; e contudo, são derivadas do mesmo ancestral clonal. A interação entre elas aumentou a capacidade metastática das células neuroendócrinas em modelo tumoral *in vivo*.

A ADAM23 tem sido cada vez mais estudada e nosso laboratório tem se empenhado em desvendar o seu papel no desenvolvimento, progressão e metástase tumoral. Neste trabalho nós correlacionamos o silenciamento de ADAM23 com a progressão/malignidade tumoral em gliomas. Esses dados estão de acordo com o que foi visto em tumores de mama e cabeça e pescoço, nos quais o

silenciamento de ADAM23 se correlaciona com um pior prognóstico para o paciente (Calmon et al., 2007; Verbisck et al., 2009). Além disso, confirmamos o papel de ADAM23 na proliferação, adesão, migração e invasão celular, bem como a existência de cooperação entre as células ADAM23 positivas e negativas, corroborando os dados obtidos com o modelo da linhagem MDA-MB-435.

6- CONCLUSÕES

- O gene ADAM23 apresenta expressão reduzida nas amostras de GBM e seu silenciamento pode contribuir para a progressão tumoral.
- A redução da expressão de ADAM23 em GBM não está associada com hipermetilação da sua região promotora, com a presença de mutações pontuais em sua sequência codificante, com a perda de heterozigose no locus do gene ADAM23 ou com a alteração no padrão de expressão de miRNAs putativamente envolvidos na regulação da expressão de ADAM23.
- A redução de expressão de ADAM23 na linhagem U87MG leva ao seqüestro das células na fase G0/G1 do ciclo celular, impossibilitando a seleção de variantes clonais com níveis elevados de silenciamento desse gene e a realização de ensaios funcionais nesse modelo.
- A expressão do gene ADAM23 possui papel importante na capacidade proliferativa das células SKmel-37 *in vitro* e *in vivo*.
- A integrina $\alpha\beta3$ possivelmente desempenha um papel importante na modulação da capacidade adesiva na linhagem celular Skmel-37.
- As alterações nas capacidades migratórias e invasivas resultantes da diminuição da expressão de ADAM23 nas células Skmel-37 sugerem a existência de uma

associação entre o silenciamento do gene ADAM23 observado em tumores e a progressão tumoral.

- Ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando culturas heterotípicas de células SKmel-37 ADAM23 positivas e negativas na proporção 1:1 sugerem que essas diferentes populações celulares são capazes de interagir promovendo a proliferação, migração e invasão.

7-REFERÊNCIAS

Albelda, S., Mente, S., Elder, D., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., et al. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*, 50(20), 6757-6764.

Alfandari, D., McCusker, C., & Cousin, H. (2009). ADAM function in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), 153-163.

Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7), 823-826.

Andereg, U., Eichenberg, T., Parthaune, T., Haiduk, C., Saalbach, A., Milkova, L., et al. (2009). ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 129(6), 1471-1482.

Anderson, A. R., Weaver, A. M., Cummings, P. T., & Quaranta, V. (2006). Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*, 127(5), 905-915.

Arribas, J., Bech-Serra, J. J., & Santiago-Josefat, B. (2006). ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1), 57-68.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64-71.

Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A., et al. (2004). Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem*, 279(21), 22377-22386.

Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 Suppl 1, S4-11.

Beck, V., Herold, H., Benge, A., Lubert, B., Hutzler, P., Tschesche, H., et al. (2005). ADAM15 decreases integrin alphavbeta3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3), 590-603.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.

Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), 32-43.

Bret, C., Hose, D., Reme, T., Kassambara, A., Seckinger, A., Meissner, T., et al. (2011). Gene expression profile of ADAMs and ADAMTSs metalloproteinases in normal and malignant plasma cells and in the bone marrow environment. *Exp Hematol*, 39(5), 546-557.e548.

Cairns, J. (1975). The cancer problem. *Sci Am*, 233(5), 64-72, 77-68.

Cal, S., Freije, J. M., Lopez, J. M., Takada, Y., & Lopez-Otin, C. (2000). ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, 11(4), 1457-1469.

Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Meuwissen, R., et al. (2011). A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 19(2), 244-256.

Calmon, M. F., Colombo, J., Carvalho, F., Souza, F. P., Filho, J. F., Fukuyama, E. E., et al. (2007). Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 173(1), 31-37.

Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 563-572.

Chekulaeva, M., & Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3), 452-460.

Cheresh, D. (1989). Human melanoma cell attachment involves an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor and the disialoganglioside GD2. *Prog Clin Biol Res*, 288, 3-24.

Cheresh, D., & Spiro, R. (1987). Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 262(36), 17703-17711.

Chernova, O., Somerville, R., & Cowell, J. (1998). A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene*, 17(22), 2873-2881.

Choi, J., Kim, K., Jeon, Y., Kim, S., Jang, S., Ku, J., et al. (2009). Promoter hypermethylation of the ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *Int J Cancer*, 124(6), 1258-1262.

Choi, J. S., Kim, K. H., Jeon, Y. K., Kim, S. H., Jang, S. G., Ku, J. L., et al. (2009). Promoter hypermethylation of the ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *Int J Cancer*, 124(6), 1258-1262.

Cissé, M., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B., & Checler, F. (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem*, *280*(49), 40624-40631.

Costa, E. T., Machado-Ferreira, T., Cavalher, F. P., Balen, A. A., Verbisck, N. V., Lepique, A. P., et al. Cooperation between tumor cell subpopulations expressing different levels of ADAM23 is responsible for efficient metastatic spreading and colonization. Manuscrito em preparação. Vide anexo 1.

Costa, F. F., Colin, C., Shinjo, S. M., Zanata, S. M., Marie, S. K., Sogayar, M. C., et al. (2005). ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. *Neurosci Lett*, *380*(3), 260-264.

Costa, F. F., Verbisck, N. V., Salim, A. C., Ierardi, D. F., Pires, L. C., Sasahara, R. M., et al. (2004). Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene*, *23*(7), 1481-1488.

Costa, M., Paludo, K., Klassen, G., Lopes, M., Mercadante, A., Martins, V., et al. (2009). Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. *Neurosci Lett*, *461*(1), 16-20.

Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, *10*(10), 704-714.

D'Abaco, G. M., Ng, K., Paradiso, L., Godde, N. J., Kaye, A., & Novak, U. (2006). ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain. *Neurosurgery*, *58*(1), 179-186; discussion 179-186.

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., & Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(14), 7149-7153.

Deininger, M. (2005). Resistance to imatinib: mechanisms and management. *J Natl Compr Canc Netw*, *3*(6), 757-768.

Ebos, J. M., Lee, C. R., & Kerbel, R. S. (2009). Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*, *15*(16), 5020-5025.

Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, *300*(5618), 455.

Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, *29*(5), 258-289.

Ehrlich, M. (2003). The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol*, 109(1), 17-28.

Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H. Z., Puzon-McLaughlin, W., et al. (2002). 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*, 277(20), 17804-17810.

Felding-Habermann, B., Mueller, B., Romerdahl, C., & Cheresch, D. (1992). Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*, 89(6), 2018-2022.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 453-458.

Frank, S. A. (2003). Somatic mutation: early cancer steps depend on tissue architecture. *Curr Biol*, 13(7), R261-263.

Friedl, P., Maaser, K., Klein, C. E., Niggemann, B., Krohne, G., & Zänker, K. S. (1997). Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*, 57(10), 2061-2070.

Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R. A., Peinado, M. A., & Clark, S. J. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*, 38(5), 540-549.

Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D., Nicoll, R., & Fukata, M. (2006). Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*, 313(5794), 1792-1795.

Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8(1), 56-61.

Ghilardi, C., Chiorino, G., Dossi, R., Nagy, Z., Giavazzi, R., & Bani, M. (2008). Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. *BMC Genomics*, 9, 201.

Goldsmith, A. P., Gossage, S. J., & French-Constant, C. (2004). ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. *J Neurosci Res*, 78(5), 647-658.

Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., & Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*, 83(2), 155-158.

Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., Bartram, C., de Klein, A., & Grosveld, G. (1984). The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation. *J Cell Physiol Suppl*, 3, 179-191.

Gupta, G. P., Minn, A. J., Kang, Y., Siegel, P. M., Serganova, I., Cordon-Cardo, C., et al. (2005). Identifying site-specific metastasis genes and functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 149-158.

Hagihara, A., Miyamoto, K., Furuta, J., Hiraoka, N., Wakazono, K., Seki, S., et al. (2004). Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, 23(53), 8705-8710.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743), 464-468.

Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, 347(20), 1593-1603.

Hajj, G., Lopes, M., Mercadante, A., Veiga, S., da Silveira, R., Santos, T., et al. (2007). Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci*, 120(Pt 11), 1915-1926.

Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, 59(2), 177-189.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

He, S., Ding, L., Cao, Y., Li, G., Deng, J., Tu, Y., et al. (2011). Overexpression of a disintegrin and metalloprotease 8 in human gliomas is implicated in tumor progression and prognosis. *Med Oncol*.

Hebbes, T. R., Thorne, A. W., & Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*, 7(5), 1395-1402.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9821-9826.

Hitchins, M., Lin, V., Buckle, A., Cheong, K., Halani, N., Ku, S., et al. (2007). Epigenetic inactivation of a cluster of genes flanking MLH1 in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res*, 67(19), 9107-9116.

Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., & Eden, A. (2008). Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*, *27*(3), 404-408.

Huang, J., Bridges, L. C., & White, J. M. (2005). Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol Biol Cell*, *16*(10), 4982-4991.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., et al. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, *58*(2), 71-96.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, *3*(6), 415-428.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692.

Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., et al. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, *449*(7162), 557-563.

Kim, D., Behlke, M., Rose, S., Chang, M., Choi, S., & Rossi, J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, *23*(2), 222-226.

Kim, K. H., Choi, J. S., Kim, I. J., Ku, J. L., & Park, J. G. (2006). Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *World J Gastroenterol*, *12*(35), 5651-5657.

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, *386*(6627), 761, 763.

Ko, S. Y., Lin, S. C., Wong, Y. K., Liu, C. J., Chang, K. W., & Liu, T. Y. (2007). Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, *245*(1-2), 33-43.

Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., et al. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*, *165*(5), 1743-1753.

Korshunov, A., Sycheva, R., & Golanov, A. (2006). Genetically distinct and clinically relevant subtypes of glioblastoma defined by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH). *Acta Neuropathol*, *111*(5), 465-474.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705.

- Kratzschmar, J., Lum, L., & Blobel, C. P. (1996). Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem*, 271(9), 4593-4596.
- Kunapuli, P., Chitta, K., & Cowell, J. (2003). Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene*, 22(26), 3985-3991.
- Kutter, C., & Svoboda, P. (2008). miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol*, 5(4), 181-188.
- Kveiborg, M., Frohlich, C., Albrechtsen, R., Tischler, V., Dietrich, N., Holck, P., et al. (2005). A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res*, 65(11), 4754-4761.
- Lee, S., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M., Keller, S., et al. (2010). ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol*, 130(3), 763-773.
- Leighton, P. A., Mitchell, K. J., Goodrich, L. V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., et al. (2001). Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature*, 410(6825), 174-179.
- Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H., & Rocken, C. (2005). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(1), 41-48.
- Leonard, J. D., Lin, F., & Milla, M. E. (2005). Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J*, 387(Pt 3), 797-805.
- Liang, G., Lin, J. C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., et al. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7357-7362.
- Linden, R., Martins, V., Prado, M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Brentani, R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 88(2), 673-728.
- Liu, P. C., Liu, X., Li, Y., Covington, M., Wynn, R., Huber, R., et al. (2006). Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 5(6), 657-664.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R., & Wewer, U. M. (1998). Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem*, 273(27), 16993-16997.

Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., & Wewer, U. M. (1999). Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem*, 274(19), 13427-13433.

Lyons, J. G., Lobo, E., Martorana, A. M., & Myerscough, M. R. (2008). Clonal diversity in carcinomas: its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clin Exp Metastasis*, 25(6), 665-677.

Maher, E. A., Brennan, C., Wen, P. Y., Durso, L., Ligon, K. L., Richardson, A., et al. (2006). Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res*, 66(23), 11502-11513.

Martorana, A. M., Zheng, G., Crowe, T. C., O'Grady, R. L., & Lyons, J. G. (1998). Epithelial cells up-regulate matrix metalloproteinases in cells within the same mammary carcinoma that have undergone an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 58(21), 4970-4979.

Mazzocca, A., Coppari, R., De Franco, R., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Pinzani, M., et al. (2005). A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res*, 65(11), 4728-4738.

Meads, M. B., Gatenby, R. A., & Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*, 9(9), 665-674.

Mitchell, K., Pinson, K., Kelly, O., Brennan, J., Zupicich, J., Scherz, P., et al. (2001). Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet*, 28(3), 241-249.

Mitchell, K. J., Pinson, K. I., Kelly, O. G., Brennan, J., Zupicich, J., Scherz, P., et al. (2001). Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet*, 28(3), 241-249.

Mochizuki, S., & Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci*, 98(5), 621-628.

Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., et al. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol*, 72(2), 127-129.

Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385(6618), 733-736.

Murai, T., Miyazaki, Y., Nishinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., et al. (2004). Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem*, 279(6), 4541-4550.

Nath, D., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Warn, A., Hutchinson, G. R., Yamada, K. M., et al. (1999). Interaction of metargidin (ADAM-15) with α v β 3 and α 5 β 1 integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci*, 112 (Pt 4), 579-587.

Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Velicescu, M., Gonzales, F. A., Lin, J. C., Liang, G., et al. (2002). Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, 62(22), 6456-6461.

Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 274-284.

Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., et al. (2005). Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*, 65(6), 2115-2124.

Novak, P., Jensen, T., Oshiro, M., Wozniak, R., Nouzova, M., Watts, G., et al. (2006). Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer. *Cancer Res*, 66(22), 10664-10670.

Nowell, P. C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*, 117(8), 2033-2035.

Owuor, K., Harel, N. Y., Englot, D. J., Hisama, F., Blumenfeld, H., & Strittmatter, S. M. (2009). LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. *Mol Cell Neurosci*, 42(4), 448-457.

Peduto, L., Reuter, V. E., Shaffer, D. R., Scher, H. I., & Blobel, C. P. (2005). Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer Res*, 65(20), 9312-9319.

Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

Piepoli, T., Jakupoglu, C., Gu, W., Lualdi, E., Suarez-Merino, B., Poliani, P., et al. (2006). Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro Oncol*, 8(2), 96-108.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113(10), 1456-1464.

Primakoff, P., & Myles, D. G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*, 16(2), 83-87.

Puente, X. S., & López-Otín, C. (2004). A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res*, 14(4), 609-622.

Reiss, K., & Saftig, P. (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), 126-137.

Roemer, A., Schwettmann, L., Jung, M., Roigas, J., Kristiansen, G., Schnorr, D., et al. (2004). Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncol Rep*, 11(2), 529-536.

Ruano, Y., Mollejo, M., Ribalta, T., Fiaño, C., Camacho, F. I., Gómez, E., et al. (2006). Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer*, 5, 39.

Sagane, K., Ishihama, Y., & Sugimoto, H. (2008). LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int J Biol Sci*, 4(6), 387-396.

Sagane, K., Ohya, Y., Hasegawa, Y., & Tanaka, I. (1998). Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J*, 334 (Pt 1), 93-98.

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., et al. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, 164(5), 769-779.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.

Santenard, A., & Torres-Padilla, M. E. (2009). Epigenetic reprogramming in mammalian reproduction: contribution from histone variants. *Epigenetics*, 4(2), 80-84.

Sato, N., Fukushima, N., Matsubayashi, H., & Goggins, M. (2004). Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene*, 23(8), 1531-1538.

Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., & Reed, M. W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, *285*(2), 194-204.

Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T. Y., Barski, A., Wang, Z., et al. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, *132*(5), 887-898.

Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, *17*(1), 7-30.

Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., et al. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*, *313*(18), 1111-1116.

Senechal, K., Thaller, C., & Noebels, J. (2005). ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Mol Genet*, *14*(12), 1613-1620.

Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27-36.

Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., Jones, S., Hirst, M., & Iyer, V. R. (2008). Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol*, *6*(3), e65.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., & Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, *315*(6020), 550-554.

Singh, B., Schneider, M., Knyazev, P., & Ullrich, A. (2009). UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines. *Int J Cancer*, *124*(3), 531-539.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, *314*(5797), 268-274.

Smith, J., Vestal, D., Irwin, S., Burke, T., & Cheresh, D. (1990). Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem*, *265*(19), 11008-11013.

Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., et al. (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, *113*(4), 264-268.

Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H., & Van Wart, H. E. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(1), 364-368.

Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 10(6), 415-433.

Sun, Y., Wang, Y., Zhang, J., Tao, J., Wang, C., Jing, N., et al. (2007). ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neurochem Res*, 32(7), 1217-1223.

Sun, Y., Wang, Y., Zhang, J., Tao, J., Wang, C., Jing, N., et al. (2007). ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neurochem Res*, 32(7), 1217-1223.

Sun, Y. P., Deng, K. J., Wang, F., Zhang, J., Huang, X., Qiao, S., et al. (2004). Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. *Gene*, 325, 171-178.

Takada, H., Imoto, I., Tsuda, H., Nakanishi, Y., Ichikura, T., Mochizuki, H., et al. (2005). ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene*, 24(54), 8051-8060.

Tanaka, Y., Miyamoto, S., Suzuki, S. O., Oki, E., Yagi, H., Sonoda, K., et al. (2005). Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11(13), 4783-4792.

Tarin, D., Price, J. E., Kettlewell, M. G., Souter, R. G., Vass, A. C., & Crossley, B. (1984). Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res*, 44(8), 3584-3592.

Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., et al. (1999). Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res*, 59(21), 5438-5442.

Tsuda, H., Shimosato, Y., Upton, M. P., Yokota, J., Terada, M., Ohira, M., et al. (1988). Retrospective study on amplification of N-myc and c-myc genes in pediatric solid tumors and its association with prognosis and tumor differentiation. *Lab Invest*, 59(3), 321-327.

Turnpenny, P., & Ellard, S. (2005). *Emery's Elements of Medical Genetics*, (12th ed.): Elsevier, London.

Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W., & van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, *118*(4), 409-418.

Van Belle, P., Elenitsas, R., Satyamoorthy, K., Wolfe, J., Guerry, D. t., Schuchter, L., et al. (1999). Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol*, *30*(5), 562-567.

Van Wart, H. E., & Birkedal-Hansen, H. (1990). 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*, *87*(14), 5578-5582.

Verbisck, N., Costa, E., Costa, F., Cavalher, F., Costa, M., Muras, A., et al. (2009). ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. *Cancer Res*, *69*(13), 5546-5552.

Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., et al. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, *276*(41), 37743-37746.

Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310.

Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, *116*(6), 855-867.

Wayner, E., Orlando, R., & Cheresh, D. (1991). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol*, *113*(4), 919-929.

Wei, X., Moncada-Pazos, A., Cal, S., Soria-Valles, C., Gartner, J., Rudloff, U., et al. (2011). Analysis of the disintegrin-metalloproteinases family reveals ADAM29 and ADAM7 are often mutated in melanoma. *Hum Mutat*, *32*(6), E2148-2175.

Weiss, L. (1990). Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*, *54*, 159-211.

Wildeboer, D., Naus, S., Amy Sang, Q. X., Bartsch, J. W., & Pagenstecher, A. (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol Exp Neurol*, *65*(5), 516-527.

Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J., et al. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, *309*(5734), 626-630.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302(1), 1-12.

Zhang, X. P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., & Takada, Y. (1998). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. *J Biol Chem*, 273(13), 7345-7350.

Zheng, X., Jiang, F., Katakowski, M., Kalkanis, S. N., Hong, X., Zhang, X., et al. (2007). Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness. *Cancer Sci*, 98(5), 674-684.

Zigrino, P., Mauch, C., Fox, J., & Nischt, R. (2005). Adam-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int J Cancer*, 116(6), 853-859.

LISTA DE ANEXOS

Anexo1- Manuscrito não publicado: “Cooperation between tumor cell subpopulations expressing different levels of ADAM23 is responsible for efficient metastatic spreading and colonization.”.....	146
Anexo 2 – Súmula Curricular.....	169

ANEXO 1

Cooperation between tumor cell subpopulations expressing different levels of ADAM23 is responsible for efficient metastatic spreading and colonization.

Érico T. Costa*, Tamara Machado, Felícia P. Cavalher, Adriana A Balen, Newton V. Verbisck, Ana Paula

Lepique, Paula F Asprino, Roger Chammas & Anamaria A. Camargo.

* Corresponding author

Abstract

Introduction

The metastatic cascade is a multi-step and highly-selective process that culminates with tumor growth and colonization at secondary sites distant from the primary tumor. Among the molecular mechanisms involved in this process, those associated with invasion of the primary tumor microenvironment, migration through the extracellular matrix and colonization of distant sites are generally accepted to be critical and responsible for the low success rate of the metastatic process.

Primary tumors are composed by a heterogeneous population of cells with different invasive and metastatic properties and the ability to invade and growth at distant sites is restricted to a small subpopulation of tumor cells within the primary tumor. Recent evidences, however, show that tumor cells with different invasive and metastatic properties can cooperate to facilitate different steps of malignant progression, from local invasion and migration through the extracellular matrix (6, 6b), to niche conditioning for incoming tumor cells and colonization of distant sites (7-8), enhancing the metastatic efficiency. These evidences highlight the biological importance of cellular heterogeneity for tumor progression and metastasis, however little is known about the molecular mechanisms used by cancer cells to cooperate during metastatic dissemination.

The ADAMs (A Disintegrin and Metalloprotease domain) constitute a family of type I transmembrane glycoproteins with a common structural organization, which includes a metalloprotease and disintegrin domain (9-10). ADAMs participate in cell-cell signaling during development, homeostasis and disease, controlling many cellular events, including proliferation and migration (9-11). ADAM23 is a non-catalytically member of the ADAM family, a potent regulator of cell-matrix interactions (11-13) that has recently been placed in the route of malignant transformation (13-19). Evidences from clinical and molecular studies support the role of ADAM23 during tumor progression in a wide range of tumors, including breast (14-15), gliomas (16), head and neck (17), gastric (18) and pancreatic tumors (19).

We have previously demonstrated that the epigenetic silencing of the ADAM23 gene is a late event during breast tumor progression and that ADAM23 promoter hypermethylation is significantly associated with a lower distant metastasis-free and disease-specific survivals, being an independent prognostic factor for poor disease

outcome. In parallel, functional studies using shRNA showed that ADAM23 negatively modulates cellular adhesion and migration in the MDA-MB-435 cell line. Compared with ADAM23-positive cells, ADAM23 knockdown cells displayed higher levels of active $\alpha\beta3$ integrin in the cell surface, resulting in an increased cellular motility and avidity towards $\alpha\beta3$ integrin ligands. *In vivo*, ADAM23 knockdown cells showed an enhanced ability to arrest in the lungs of immunocompromised mice after injection in the lateral tail vein (14). Together, these clinical and functional studies highlight the importance of ADAM23 in the control of the metastatic behavior. However, there is little information about how ADAM23 silencing contributes for local invasion and tumor growth at secondary sites, both critical steps of the metastatic cascade. In the present study, using two independent human tumor cell lines – MDA-MB-435 and SK-Mel-37– we found that ADAM23 can act as a pleiotropic molecule by stimulating tumor growth and inhibiting invasion and migration through the extracellular matrix. Moreover, we observed that subpopulations of tumor cells expressing different levels of ADAM23 can cooperate to enhance metastatic spreading and colonization. Whereas ADAM23-positive tumor cells exhibit a fast-growing phenotype and higher tumorigenic ability, ADAM23-negative cells display an enhanced invasive and motile phenotype, but in contrast exhibit a severe proliferative deficiency. When mixed and introduced into an orthotopic site, these two subpopulations of cells create an ADAM23-dependent heterogeneity in the primary tumor, which increase the metastatic efficiency through a bilateral interaction between these two tumor cell subpopulations. In this interaction, ADAM23-negative/fast-spreading cells increase the motile behavior of ADAM23-positive/fast-growing cells, favoring evasion of this latter subpopulation from the primary site. On the other hand, ADAM23-positive/fast-growing cells compensate the proliferation deficiency of adjacent ADAM23-negative cells through ADAM23-dependent cell-cell contacts. Our findings indicates that ADAM23-heterotypic clusters of cells act as a functional group during metastatic dissemination, being guided by a pool of specialized ADAM23-negative/fast-spreading leader cells, sustained and followed by ADAM23-positive/fast-growing cells, which are the major responsible for tumor growth at secondary sites.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture. MDA-MB-435 and SK-Mel-37 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and SK-Mel-37 cell line was donated by Dra. O. Caballero (Ludwig Institute for Cancer Research, N.Y., USA). All cells were maintained at 37°C, under 5% CO₂, in complete medium: RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab) and 1% L-glutamine (Sigma).

Knockdown of ADAM23 by shRNAs. Short hairpin RNA constructs and transfections were performed as previously described (14).

Reverse transcription-PCR and Real-time PCR. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was done with 2µg DNA-free RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using a 7300 Real-time PCR System and SYBR Green (both Applied Biosystems). None unspecific products in the melting curve analysis were observed. All expression levels are given relative to HMBS gene.

Bi-dimensional proliferation assays. Cell proliferation in monolayers (bi-dimensional cultures), was analyzed by plating 5x10³ cells in 35mm dishes and counting cells daily for 7-8 days, with medium changes every second or third day.

Juxtacrine assays. An adapted juxtacrine assay was performed as described by Willmarth et al. (20). Briefly, MDA-MB-435 ADAM23-positive or negative cells were removed from confluent plates using 10 mM EDTA, washed three times with PBS pH4.0 and fixed in formalin for 15 min. After fixation, cells were washed five times with PBS, twice with serum-free RPMI and resuspended in RPMI. Juxtacrine-induced proliferation was measured by radioactive thymidine (3H-TdR) incorporation in a monolayer of MDA-MB-435 ADAM23-positive or negative cells arrested in G0 by serum deprivation for 24h. At 50-60% of confluence, cells were overlaid with 15 x10⁴ cells/cm² of formalin-fixed ADAM23-positive or negative. After 9h of juxtacrine stimulation, fixed cells were removed by washing twice with PBS and was 3H-TdR (1µCi/ml) was added to the culture and incubated for 12 hours. 3H-TdR uptake were performed as described above.

Generation of multicellular spheroids (MS). Confluent monolayers cultures of MDA-MB-435 or SK-Mel-37, ADAM23-positive or negative cells were trypsinized and resuspended in complete medium. 4x10⁴ cells/well were plated in 48-well plates (Corning) coated with 5 mm of 1% agarose in RPMI. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ and 3-4 days later a single MS spontaneously aggregated in each well. MS were readily handled with a sterile Pasteur pipette for subsequent experiments described below. To analyze the relevance of ADAM23-heterogeneity in 3-D conditions, MS were also formed using different proportions of ADAM23-positives and negatives cells. These ADAM23-heterotypic MS were named MS-A23^{HetX},

in which X represents the percentage of ADAM23-negative cells in each MS (1, 10, 20 or 50%).

Tri-dimensional proliferation by 3H-TdR uptake and clonogenic anchorage-independent assays. For 3-D proliferation assays, MS's were formed and maintained for 12-16h in complete medium containing 3H-TdR (Amersham, 1 µCi/ml, 10⁻⁸M). After this period, cells were fixed with cold 10% TCA, dissolved in 0.5N NaOH and DNA was precipitated with TCA. Precipitated DNA was collected on nitrocellulose filters, transferred to scintillation liquid and analyzed in a Scintillation Counter (LS 6500, Beckman Coulter). For 3-D clonogenic assays, suspensions of single cells were embedded in 500µl of 0.6% agarose diluted in complete medium and plated over a base coat of 5 mm of 1% agarose. After 15 days colonies were photographed and counted and colonies sizes were measured using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Subcutaneous Tumorigenesis Assays. MDA-MB-435 or SK-Mel-37 cells and derivatives (10⁶ cells) were inoculated subcutaneously in the flank of immunodeficient female BALB/c-nude mice (4–10 weeks old). ADAM23 heterotypic tumors were generated by inoculation of a single-cell suspension of ADAM23-positive and -negative cells at 1:1 ratio. Tumor growth was determined indirectly through weekly measurements of two tumor perpendicular diameters. Primary tumors were excised when reached a mean diameter of 1 cm and dispersed to single-cell suspensions for FACS analysis, as described above. Animals were kept in a temperature-controlled room on 12h/12h light/dark schedule with food and water *ad libitum*, and all experiments were conducted according to ethic standards and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Antonio Prudente Foundation (CEUA/FAP – 043/09).

Flow Analysis Cytometry for ex-vivo cells. Single-cell suspensions of 5x10⁵ ex-vivo cells from MDA-MB-435 ADAM23-heterotypic tumors were incubated on ice for 45 min with anti-CD45-APC (clone 30-F11, BD Biosciences) and anti-CD31-biotin (BAF 3628 R&D Systems) diluted in 1x MTH buffer (HBSS buffer + 15mM HEPES pH7.4 + 5% FBS + 0,5U/ml DNase). Cells were washed and incubated with streptavidin-PE secondary antibody (Molecular Probes) for 30 min on ice and suspended in 0.5 mL MTH before analysis on a FACSCalibur cytometer using the Cell Quest software (Becton Dickinson).

Invasion assays into 3-D Collagen Matrices. A single MS was embedded in 400µl of 4°C rat tail collagen type-1 lattice diluted in complete medium (collagen final concentration: 1.5 mg/ml - BD Biosciences) and plated in 48-wells plates over a base of 5 mm non-adherent 1% agarose. After polymerization at 37°C for 20 min, the 3-D collagen matrices were overlaid with complete medium. For specific experiments, MS were embedded in 3-D collagen matrices plus DMSO (vehicle control) or with specific drugs: inhibitor of MEK (U0126, 10µM), inhibitor of PKCs (Chelerythrine Chloride, CHEL, 0.1µM) or inhibitor of MMPs (GM6001, 10µM). Medium (with DMSO or specific inhibitors) was changed every 48h. Invasive kinetics was monitored directly by

bright-field microscopy taking the distances between MS borders and a 100-200 "leader" cells of each bundle and/or 50-100 single amoeboid cells every 48h during 2-3 weeks.

Co-Migration assay. Co-migration assays were carried out using Transwell plates (Corning) with 8µm polycarbonate filters pre-coated with 5µg/mL vitronectin (VN, purified from human plasma of healthy donors) or 2.5µg/mL rat tail collagen type-1 (Col-1, BD Biosciences) for 2h at 37°C and blocked with 5% BSA in serum-free RPMI. A total of 5×10^4 cells per well, at a 1:1 rate of MDA-MB-435 ADAM23-positive DiIC18-labeled (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes) cells and unlabeled MDA-MB-435-ADAM23-positive or negative cells were plated in the upper side of transwell plates in duplicates and allowed to migrate for 18h at 37°C and 5% CO₂. The topside of the filters were scraped with cotton swabs, fixed, and stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma). Cells were counted at x100 magnification in 20 different optical fields.

SDS-PAGE/Western Blot. Cell extracts were prepared as described previously (26). Briefly, samples were resolved on a 12% SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel, transferred to PVDF membrane (GE Healthcare) and probed with anti-ERK1/2 antibody (Cell Signaling Technologies) or an anti-phospho-p42/p44 MAPK antibody (Cell Signaling Technologies).

Spontaneous Metastasis Assay. Metastatic assays were performed as previously described (27). Briefly, MDA-MB-435 ADAM23-positive or negative cells were harvested at 80% confluence and resuspended in matrigel (BD Bioscience). Immunodeficient female Balb/c-nude mice (4-10 weeks old) were anesthetized with a mixture of ketamine (100mg/kg, Vetanarcol) and cloridrate of 2-(2, 6-xilidino)-5, 6-dihydro-4-H-1, 3-tiazin (10mg/kg Rompum-Bayer) and a 4-mm incision was made in the skin over the lateral thorax to expose the mammary fatpad (m.f.p.). Cells (10^6 cells in 0.03 ml of matrigel) were injected into the m.f.p. taking care to avoid the s.c. space. Tumors were removed and skin incisions were closed when primary tumors reached a mean diameter of 1 cm. After a 8-weeks interval, animals were killed and autopsied. At autopsy, the numbers of metastasis in lungs, kidneys and bladder were assessed by macroscopic observation with x10 magnification. To molecularly confirm the presence/absence of metastases, the presence of human DNA in the mice organs was determined by real-time PCR amplification of Alu sequences as previously described (14). These experiments were conducted according to ethic standards and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Antonio Prudente Foundation (CEUA/FAP – 043/09).

Results

Growth inhibitory effect of ADAM23-knockdown in 2-D cultures of SK-Mel-37 cells

We have previously reported that the proliferation rate of MDA-MB-435 cells maintained in two dimensional (2-D) cultures was not affected by ADAM23 expression levels (14). Here, we have further evaluated this effect using a different tumor cell line - SK-Mel-37 - and the same shRNA strategy previously described (14). For easy of comparison, results from now on will be grouped according to the cell line used (435 for MDA-MB-435 and SK for SK-Mel-37) and to the ADAM23 expression levels in ADAM23-positive cells (A23^{pos}, including wild type population - WT - and an empty vector clone - EV) or ADAM23-negative cells (A23^{neg}, including two independent shRNA clones - clone #1 and #2). As shown in Figure 1A, besides the cytological and morphological differences observed between MDA-MB-435 and SK-Mel-37 cell lines (Figure 1B), these cell lines also exhibit distinct dependencies on ADAM23 for optimal growth in 2-D cultures. As opposed to 435-A23^{neg} (Figure 1C, data already published in ref. 14), SK-A23^{neg} cells exhibit a slight but significant reduction in the proliferative rate when compared to SK-A23^{pos} cells, especially after reaching intermediate cell densities (Figure 1D, p=0,01). SK-A23^{neg} cells exhibit a ~16% increase in the doubling time when compared to SK-A23^{pos} cells (35±3h and 30±2h, respectively), which was not observed for 435-A23^{neg} cells when compared to 435-A23^{pos} cells (23±1h and 25±1h, respectively).

ADAM23 induces proliferation through cell-cell interactions

The 2-D proliferation curves of MDA-MB-435 and SK-Mel-37 cells revealed an ADAM23-dependent proliferative effect exclusive of SK-Mel-37 cells (Figure 1D). The simplest explanation for this observation is that ADAM23 can act as a mitogen depending on the nature of the targeted cell. Alternatively, considering the striking differences in cell morphology between both cell lines, ADAM23-mediated proliferative effect could be dependent on the degree of cell-cell contacts. SK-Mel-37 cells form extended lateral cell-cell contacts, exhibiting a cobblestone-like morphology even in intermediate densities, whereas MDA-MB-435 cells exhibit a more irregular cell shape with only punctuated cell-cell contacts (mesenchymal-like morphology, Figure 1B). To test this hypothesis, it was critical to confirm that ADAM23 could signal for proliferation via juxtacrine interactions. Accordingly, juxtacrine induced proliferation was

measured by radioactive thymidine (3H-TdR) incorporation in a 2-D culture of MDA-MB-435 cells arrested in G0/G1 interphase of the cell cycle and overlaid with a high density of formalin-fixed (FF) 435-A23^{pos} or 435-A23^{neg} cells (Figure 2A, right panel and Figure 2A, negative control left panel). After 9h of incubation, FF-435-A23^{pos} cells induced a 10-15% higher proliferative response in MDA-MB-435 ADAM23-positive 2-D cultures than did FF-435-A23^{neg} cells (Figure 2B, $p < 0.001$). Similarly, adherent MDA-MB-435 ADAM23 negative cells were also preferentially stimulated by interactions with FF-435-A23^{pos} cells (Figure 2C, $p < 0.01$). Together these results indicate that ADAM23-positive cells can induce proliferation of ADAM23-negative neighboring cells and that ADAM23-proliferative effects might be dependent on the degree of cell-cell contacts. These evidences were also supported from cell-surface analysis within the mammalian CNS, in which ADAM23 protein appears be localized concentrated in discrete sites of intercellular contact, suggesting a model wherein ADAM23 serves to mediate – and/or signalize through – cell-cell interactions (28).

Growth inhibitory effect of ADAM23-knockdown in 3-D cultures of MDA-MB-435 cells.

To determine whether ADAM23-proliferative effects on MDA-MB-435 cells might be dependent on the degree of cell-cell interactions, we analyzed the growth rate of these cells cultured as multicellular spheroids (MS). Cell-cell interactions are more realistic reproduced when MS are immersed in tri-dimensional (3-D) collagen type-I matrices, which mimics an *in vivo*-like tumor environment, providing adhesion sites and physical resistance towards growing spheroids and migrating cells (21). These MS are thus a suitable model for our 3-D proliferative assays in which cell-cell contacts are enforced (Figure 3A, top). MS were generated by spontaneous aggregation of MDA-MB-435 ADAM23-positive cells (MS-435-A23^{pos}) or ADAM23-negatives counterparts (MS-435-A23^{neg}). In addition, to evaluate if ADAM23 could signal for proliferation *in trans*, we compared the growth rate of these two MS groups with ADAM23-heterotypic spheroids, generated by spontaneous aggregation of 1:1 ratio single-cell suspension of MDA-MB-435 ADAM23-positive and ADAM23-negative cells (MS-435-A23^{het}). The 3-D proliferative rate of these three groups of MS was measured by 3H-TdR incorporation before and after

embedment in 3-D collagen matrices (Figure 3A and 3B, respectively).

Before embedment, MS-435-A23^{neg} showed a 32% and 47% reduction in 3H-TdR incorporation when compared to MS-435-A23^{pos} or MS-435-A23^{het}, respectively (Figure 3A, bottom, $p < 0.001$). Three days after MS embedment in 3-D collagen matrices, MS-435-A23^{neg} showed a 45-50% reduction in 3H-TdR incorporation when compared to the other two groups (Figure 3B, bottom, $p < 0.01$). No significant differences in 3H-TdR incorporation were observed between MS-435-A23^{pos} and MS-435-A23^{het} in both conditions ($p > 0.05$). In accordance, after MS dispersion to single-cell suspension, cell cycle analysis by flow cytometry using PI-stained cells showed that $68 \pm 4\%$ and $23 \pm 2\%$ of MS-435-A23^{neg} cells were in G0/G1 and S phases of the cell cycle, respectively, compared to $57 \pm 3\%$ and $30 \pm 1\%$ of MS-435-A23^{pos} cells ($p < 0.02$).

In addition, in 3-D anchorage-independent clonogenic assays, we observed that ADAM23 knockdown promotes a significant arrest in colony growth ($p < 0.0001$) without affecting the total number of colonies formed (Figure 3C). As expected, when using ADAM23-heterotypic cultures in anchorage-independent clonogenic assays, in which ADAM23-positive cells expressing constitutive levels of Green Fluorescent Protein (GFP) were cultured together but prevented from establishing cell-cell contacts with ADAM23-negative/GFP-negative cells, a similar number of colonies was observed but the vast majority of large colonies were GFP-positive. In agreement, when ADAM23-negative/GFP-positive and ADAM23-positive/GFP-negative were cultured in the same conditions, large colonies were preferentially GFP-negative (Fig. S1). These anchorage-independent clonogenic assays indicate that ADAM23-dependent effects on proliferation is not related to differences in the clonogenic potential, but to a significant deficiency in cell proliferation and colony growth caused by ADAM23-deficient juxtacrine proliferative signals. Taking together, our results from the MS proliferation and the anchorage-independent clonogenic assays show that ADAM23-proliferative signal is strictly dependent on tight cell-cell contacts.

ADAM23 enhances tumorigenic potential and increases tumor growth kinetics

In order to assess the contribution of ADAM23 to cellular proliferation in a complex model, we performed *in vivo*

tumorigenesis experiments using female Balb/c Nude mice inoculated subcutaneously (s.c.) with MDA-MB-435 or SK-Mel-37 cells and with their respective ADAM23-negative counterparts. In addition, a third experimental group - named ADAM23-heterotypic tumors (T-435-A23^{Het}) - was established by inoculating ADAM23-heterotypic cultures generated by a 1:1 ratio single-cell suspension of ADAM23-positive and ADAM23-negative cells. As seen in Table 1, the group inoculated with 435-A23^{neg} cells displayed a reduced tumorigenic potential when compared to the two other groups. While most animals from the T-435-A23^{pos} (14/15, 93%) and T-435-A23^{Het} (10/11, 91%) groups developed palpable tumors 10 weeks after inoculation, only 5 out of 15 (33%) animals from the T-435-A23^{neg} group did ($p < 0.001$). Moreover, as seen in Figure 4, the growth kinetics of the T-435-A23^{neg} is significantly slower than that of the two other groups. Ten weeks after the inoculation, the average tumor size for the T-435-A23^{neg}, T-435-A23^{pos} and T-435-A23^{Het} was 16, 50 and 40 mm, respectively, corresponding to a growth inhibition of 60-70% ($p = 0.01$) in the T-435-A23^{neg} group. Importantly, the growth kinetics of T-435-A23^{Het} was not significantly different from that of T-435-A23^{pos} group ($p < 0.05$). Histological analysis of palpable “tumor-free” mice showed that in 2 out of 3 animals analyzed a small population of 435-A23^{neg} cells survived for periods up to 10 weeks after inoculation and remained “dormant” at the original site of injection (Figure 4B). Mice bearing “dormant” ADAM23-negative tumors exhibited a late and slow tumor growth 12 weeks after inoculation (data not shown). These results are in agreement with those observed in the anchorage-independent clonogenic assays (Figure 3C). In contrast, when using SK-Mel-37 cell lines derivatives, were unable to observe significant differences in the tumorigenic potential between T-SK-A23^{neg}, T-SK-A23^{pos} and T-SK-A23^{Het} groups (Table 1). However, ADAM23 expression in SK-Mel-37 cells seems to be important for optimal tumor growth (Figure 4C). Seven weeks after injection, the average tumor size for the T-SK-A23^{pos} and T-SK-A23^{Het} (both with an average diameter of ~1 cm) was significantly different from that of the T-SK-A23^{neg} group (average diameter of 0.54 cm), corresponding to a growth inhibition of 46% ($p = 0.002$) in the T-SK-A23^{neg} group. Taken together, our results provide evidences that although not related with melanoma colonization rates, ADAM23 optimizes the growth of MDA-MB-435 and SK-

Mel-37 tumors in both ADAM23-positive and ADAM23-heterotypic environments.

ADAM23-positive cells ‘buffers’ the proliferation deficiency of slow-growing ADAM23-negative cells in ADAM23-heterotypic tumors

Our *in vivo* and *in vitro* juxtacrine proliferation assays showed that constitutive expression of ADAM23 is important for optimal MDA-MB-435 and SK-Mel-37 tumor growth. Curiously, similar growth kinetics were observed between ADAM23-positive and ADAM23-heterotypic tumors (Figure 4A), suggesting that, at least under specific conditions, ADAM23-positive cells can promote proliferation of ADAM23-negative cells. To test this hypothesis we have generated 435-A23^{pos} and 435-A23^{neg} cells expressing constitutive levels of the green fluorescent protein (GFP) to allow their detection *in vivo*. These GFP-labeled cells studied herein presented no differences in the proliferation rate and clonogenic efficiency when compared to their respective non-labeled counterparts (data not shown) and remained phenotypically stable in relation to GFP expression even after 4 months of *in vivo* passage (Figure 5A). Female Balb/c Nude mice were then inoculated s.c. with a 1:1 ratio single-cell suspension of 435-A23^{pos} and 435-A23^{neg}/GFP-positive cells, generating ADAM23-heterotypic tumors in which the latter cells could be easily identified by flow cytometry (FACS) (Figure 5A). Tumors were excised, after reaching an average diameter of ~1cm and their cellular composition was analyzed by FACS. On day 90, established T-435-A23^{Het} displayed variable percentages of 435-A23^{neg}/GFP cells, ranging from 3% to 5% in tumors #1 and #3 and from 35% to 43% in tumors #2 and #4 (Figure 5B). These results demonstrate that in heterotypic tumors, ADAM23-positive cells can compensate the proliferation deficiency of ADAM23-negative cells.

Slow-growing ADAM23-negative cells exhibit fast-invasive phenotype in 3-D matrices

We have previously demonstrated that the epigenetic silencing of the ADAM23 gene is a late event during breast tumor progression and is associated with the development of distant metastasis and poor disease outcome in breast cancer patients (14). Since we now demonstrated that constitutive expression of ADAM23 is important for optimal MDA-MB-435 and SK-Mel-37 tumor

growth, we then asked what kind of metastatic gains tumors harboring the slow-growing ADAM23-negative cells can benefit from. To address this question a 3-D invasion assay was performed using MS embedded in collagen type-1 matrices. After 10 days of 3-D collagen inclusion, MS-A23^{neg} were visibly more apt for invasion than MS-A23^{pos}, displaying higher density of bundles and increased number of single cells infiltrating the surrounding collagen, independently of the tumor cell line analyzed (MDA-MB-435 or SK-Mel-37) (Figure 6A). As seen in Figure 6B, the invasion in MS-SK-A23^{neg} starts earlier and is faster than in MS-SK-A23^{pos}, which exhibit rare migratory cells with limited invasive capacity. Finally, after 15 days of embedment, the mean migration velocity in MS-SK-A23^{neg} was $3.2 \pm 0.7 \mu\text{m.h}^{-1}$, representing a 4.5-fold increase when compared to MS-SK-A23^{pos} ($0.7 \pm 0.2 \mu\text{m.h}^{-1}$) (Figure 6C, $p < 0.01$). Similar results were observed for MDA-MB-435 ADAM23 positive and negative cells ($1.2 \pm 0.4 \mu\text{m.h}^{-1}$ and $3 \pm 0.7 \mu\text{m.h}^{-1}$, respectively). The invasive capacity of MS-435-A23^{pos} and MS-435-A23^{neg} were also compared to that of MS formed by different proportions of these two cell subpopulations. These ADAM23-heterotypic MS were named MS-435-A23^{HetX}, in which X represents the percentage of 435-A23^{neg} cells in each MS (1, 10, 20 or 50%). Up to the 6th day after embedment, no significant difference in the invasive capacity was observed between heterotypic MS composed by different percentages of ADAM23-negative cells (Figure 6D, $p > 0.05$). However, 19 days after embedment, a direct correlation between the percentage of ADAM23-negative cells within the heterotypic MS and the average motility speed was observed, in which a speed plateau was observed in heterotypic MS composed by 50% ADAM23-negative cells (Figure 6E). In addition, all heterotypic MS exhibit proportionally higher densities of cell bundles in an “indian file” pattern and an increased number of single amoeboid-phenotype cells when compared to MS-435-A23^{pos}, under direct optical microscopy (data not shown). Together these findings highlight the critical role of ADAM23 in controlling tumor cell mobility and spreading.

ADAM23-negative cells increases the mobility of ADAM23-positive cells

To explore the motility of individual MDA-MB-435 ADAM23-positive or ADAM23-negative cells co-cultured in the same MS, the distances traveled by DiIC₁₈-labeled

or GFP-expressing MDA-MB-435 ADAM23-positive cells (435-A23^{pos/Dil} or 435-A23^{pos/GFP}) were tracked daily for 15 days after MS embedment in 3-D collagen matrices. The proliferative and migratory behaviors of these MS were not significantly affected by DiIC₁₈-labeling or GFP expression (data not shown). As seen in Figures 7A and 7B, 435-A23^{pos/GFP} cells are 40% less motile when cultured in MS-A23^{pos} (435-A23^{pos/GFP}/MS-A23^{pos}, average velocity $1.2 \pm 0.2 \mu\text{m.h}^{-1}$) than when these same cells were co-cultured in MS-A23^{het} (435-A23^{pos/GFP}/MS-A23^{het}, average velocity $2.0 \pm 0.3 \mu\text{m.h}^{-1}$, $p < 0.05$). No motility differences were observed for 435-A23^{neg} cells cultured in MS-A23^{neg} (average velocity $3.5 \pm 0.1 \mu\text{m.h}^{-1}$) or MS-A23^{het} (average velocity, $3.5 \pm 0.3 \mu\text{m.h}^{-1}$, $p > 0.05$). Similar results were observed for DiIC₁₈-labeled cells (data not shown). These results demonstrate that the motility of MDA-MB-435 ADAM23-positive cells can be increased up to 40% by the presence of neighboring ADAM23-negative cells and suggests that ADAM23-negative/fast-spreading cells works preferentially as “leading edge” or “guiding” cells, followed closely by ADAM23-positive/fast-growing cells. Next, to evaluate if the influence of ADAM23-negative cells on the migratory behavior ADAM23-positive cells was strictly dependent on the generation of a less resistant migratory pathway in collagen matrices, we performed haptotactic migration assays in which DiIC₁₈-labeled MDA-MB-435 ADAM23-positive cells (435^{Dil}) were mixed with either unlabeled 435-A23^{pos} or 435-A23^{neg} cells, plated in the upper side of transwell plates and allowed to migrate to the bottom of the membrane coated either with vitronectin (VN) or collagen (Col-I). As seen in Figures 7C and 7D, the migratory behavior of MDA-MB-435 ADAM23-positive cells was significantly increased when these cells were co-cultured with ADAM23-negative cells. Eight hours after plating 435^{Dil} cells migrated 2.7-fold faster towards VN ($p < 0.0001$) and 1.5-fold faster toward Col-I ($p = 0.02$) when co-cultured with 435-A23^{neg} unlabeled cells than when these same cells were co-cultured with 435-A23^{pos} unlabeled cells. These data indicate that the leader ADAM23-negative/fast-spreading cells observed in 3-D invasion assays, can also positively influence the migratory behavior of ADAM23-positive cells independently of matrix remodeling.

ADAM23-heterogeneity in primary tumors increases the metastatic efficiency

Using *in vitro* and *in vivo* assays, we have demonstrated that ADAM23 expression can work as a “fine-tuning” molecule shifting between proliferative and invasive molecular programs. While ADAM23-positive/fast-growing cells can compensate the proliferation deficiency of adjacent ADAM23-negative cells, ADAM23-negative/fast-spreading cells can increase the motile and invasive behavior of ADAM23-positive cells. We then sought that a primary tumor constituted of ADAM23-positive and ADAM23-negative cells (named T-A23^{Het}) could display a more aggressive behavior associated with the presence of subpopulations of tumor cells with specialized biological functions but working together as a unique functional unit. To evaluate whether ADAM23-heterogeneity would be required for efficient metastatic spreading and colonization *in vivo*, MDA-MB-435-positive and negative cells were injected separately or mixed together (1:1 ratio) into the mammary fat pad (m.f.p.) of female Balb-c Nude mice. To circumvent the low proliferation rate of 435-A23^{neg} cells, cells were resuspended in 30µl of matrigel prior to inoculation as described (27). As expected, m.f.p. injections of 435-A23^{neg} cells with matrigel increased tumor formation by 2.2 fold (75%, 9/12, Table 2) when compared to s.c. injections with PBS (33%, 5/15, Table 1). However, tumor formation was not affected by the use of matrigel in animals inoculated with ADAM23-positive or ADAM23-heterotypic cell suspensions. Moreover, as seen in Figure 8A, under these optimal conditions (i.e. m.f.p. and matrigel) growth curves of ADAM23-negative tumors (T-435-A23^{neg}) were not significantly different from those of T-435-A23^{pos} and T-435-A23^{Het} ($p=0.8$). These results suggest that privation from early proliferative signals during colonization phase of primary tumors could be responsible for the slow-growing kinetics of ADAM23-negative tumors. Next, tumors were excised at a mean diameter of 1.0 cm (Figure 8A, on right) and mice were killed 8 weeks after excision and examined for the presence of metastasis. At autopsy, macroscopic lung metastases were observed in all three experimental groups, indicating that ADAM23 expression is not related to the control of organotropism in MDA-MB-435 cells. As predicted, macroscopic lung metastasis were more frequently observed in the T-435-A23^{Het} group (11 out of 20 mice – 55%) as compared to the T-435-A23^{pos} (5 out of 14 mice - 36%) and T-435-A23^{neg} (2 out of 9 mice - 22%) groups.

Finally, biopsies of primary tumors and macroscopic lung metastases extracted from all 3 groups of animals were analyzed for the expression of the human ADAM23 gene. Real Time PCR analysis showed that levels of ADAM23 expression in primary tumors and metastatic lesions from the T-435-A23^{pos} group remained stable when compared to 435-A23^{pos} cells used for inoculation. As expected, expression of the ADAM23 gene was not detected in the primary tumors and rare lung metastasis from animals of the T-435-A23^{neg} group. However, metastatic lesions from animals of the T-435-A23^{Het} group displayed either a positive or negative pattern of ADAM23 expression, intrinsically associated with the different ADAM23-expression profiles of their founder’s tumor cells (Figure 8B, open triangles). Interestingly, we observed that ADAM23 expression levels in metastatic lesions from T-435-A23^{Het} animals are 7-fold lower when compared to metastatic lesions from T-435-A23^{pos} animals, indicating that metastatic lesions from ADAM23-heterotypic primary tumors can be initially originated by clusters of ADAM23-positives and/or ADAM23-negative cells. These findings indicate that ADAM23-heterogeneity in primary tumors can increase metastatic spreading and colonization, suggesting that epigenetic silencing of ADAM23 during tumor progression can induce a global effect, increasing actively the total number of spreading cells: the fast-invasive ADAM23-negative cells and the fast-growing ADAM23-positive neighbor cells.

ADAM23 modulation of ERK1/2 pathway controls the invasiveness of MDA-MB-435 tumor cells

Since ADAM23 is a transmembrane protein with multiple biological effects and MEK-ERK1/2 is a versatile signal-transduction pathway controlling proliferation and invasion in response to signals transduced by membrane-associated receptors (23, 24), we decided to analyze the effects of ADAM23 expression over MEK-ERK1/2 pathway activation. Levels of phospho-ERK1/2 were compared between 2-D and 3-D cultures of MDA-MB-435 ADAM23-positives and negatives cells by Western Blot. High levels of ERK1/2 activation were observed in 2-D cultures independently of ADAM23 expression status. However, in 3-D cultures levels of phospho-ERK1/2 were low in MS-435-A23^{pos} but significantly increased in MS-435-A23^{neg} (Figure 8A). Proteins Kinases C (PKCs) are known to regulate multiple pathways including, in some cells, activation of MEK-ERK1/2 cascades. Thus, we

further investigate the relevance of PKC and MEK activity for the increased phospho-ERK1/2 in MS-A23^{neg} and their relation with ADAM23-dependent invasion in 3-D assays. Accordingly, MS constituted of 435-A23^{pos} or 435-A23^{neg} cells were treated with a highly selective inhibitor of MEK (U0126) or with a potent and specific inhibitor of PKCs (Chelerythrine Chloride, CHEL). After 3h of treatment ERK1/2 activation was analyzed by Western Blot. As seen in Figure 8B the basal and increased levels of ERK1/2 activation displayed by MS-A23^{pos} and MS-A23^{neg}, respectively, could be completely abolished by the selective MEK inhibitor. In contrast, only a marginal inhibitory effect in the constitutive levels of ERK1/2 activity was observed after disruption of PKC activity. One possible mechanism by which active MEK-ERK1/2 pathway could promote cellular invasion is through the transcriptional up-regulation of the proteolytic enzymes, mediated directly by activation of specific MEK-ERK downstream genes, like c-Fos (24, 25). Immunocytological analysis of MS-435-A23^{pos} and MS-435-A23^{neg} show that elevated c-Fos expression was preferentially detected in ADAM23-negative cells (Figure 8C). Based on previous studies which showed that c-Fos levels functions as a molecular sensor of MEK-ERK signal duration (26), our results corroborate with the hypothesis that MEK-ERK pathway is downregulated by ADAM23 in MDA-MB-435 spheroids. Next, to evaluate the relevance of ERK1/2 activity and proteolytic-dependency of MDA-MB-435 ADAM23-negative cells for invasion, MS-435-A23^{pos} and MS-435-A23^{neg} were embedded in 3-D collagen matrices and treated during 7 days, with U0126, CHEL or GM6001 (a broad-spectrum inhibitor of MMPs) (Figure 8D). In absence of any pharmacological inhibitor, the invasive kinetics confirmed our previous results in which 435-A23^{pos} cells are ~3.2-fold slower than 435-A23^{neg} counterparts (Figure 8D, DMSO as vehicle control). U0126 and GM6001 reduced, respectively, in 65% and 80% the total distance traveled by invasive ADAM23-negative cells, whereas similar treatments inhibited only in 45% and 7% the distance of ADAM23-positive cells. No differences were observed for spheroids treated with CHEL, corroborating that PKC may not be required for the ADAM23-dependent invasion. Together, these results indicated that ADAM23-induced suppression of ERK1/2 pathway is relevant for appropriated control of tumor cell invasion in MDA-MB-435 model, establishing for the first time, an inverse

correlation between the levels of a catalytically inactive member of ADAM family and proteolytic-dependent invasion.

Discussion

Here we demonstrated that the epigenetic regulation of ADAM23 expression can function as an alternator between invasive and proliferative molecular programs and those tumor cell subpopulations expressing different levels of ADAM23 can cooperate to facilitate different steps of malignant progression. While loss of ADAM23 expression increases migration and invasion facilitating metastatic spreading, ADAM23 expression confers growth advantages for tumor cells *in vitro* and *in vivo*, facilitating metastatic colonization. In a heterogeneous tumor environment subpopulations of slow-growing ADAM23-negative cells are maintained by juxtacrine proliferative signals provided by ADAM23-positive neighbor cells. On the other hand, subpopulations of ADAM23-negative cells increase the motile behavior of neighbor ADAM23-positive, favoring evasion of this latter subpopulation from the primary site. Thus in this cooperative model, clusters of ADAM23 positive and negative cells act as a functional group during metastatic dissemination, being guided by specialized ADAM23-negative/fast-spreading leader cells, followed by ADAM23-positive/fast-growing cells. A similar migratory behavior has been described for the MV3 melanoma cell line (6), in which invading leader cells created tube-like pathways of least resistance in 3-D collagen matrices that were used as preferential migration routes for invading tumor cells. However our transwell co-migration assays showed that leader ADAM23-negative/fast-spreading cells can also influence the migratory behavior of ADAM23-positive cells by an yet undefined type of taxis or contact-stimulated migration that is at least in part independent of matrix remodeling. Heterogeneous expression of ADAM23 in primary human tumors has been extensively documented by the Protein Atlas Project (29a). ADAM23 protein expression was ubiquitously detected in ~68% of all tumor tissues analyzed (29). For instance, ADAM23 expression was detected in 91% of malignant melanomas. For 64% of these positive samples, ADAM23 expression was detected in more than 75% of the tumor cells. However, heterogeneous expression of ADAM23 (75-25% positive cells) was observed in 27% of the samples and significant

reductions in ADAM23 expression (<25% positive cells) was observed in only 9% of melanoma samples (30). Alterations in ADAM23 expression were more evident in breast tumors, for which low levels (<25% positive cells) of ADAM23 expression was detected in 17% of the samples (30). This heterotypic scenario, the behavior of the primary tumors emerge more as a result of interactions between subpopulations of tumor cells than of individual tumor cell phenotypes and shift the metastatic behavior from the cellular to the tumor tissue level. This cooperative model supports our previous clinical observations that ADAM23 silencing is a late event during breast tumor progression, frequently associated with the development of distant metastasis and poor disease outcome. In the present study, we also showed that the pro-invasive phenotype of MDA-MB-435 ADAM23-negative tumor cells is sustained by an increased activity of MAPK signaling pathway. Activation of this pathway has been strongly implicated in the malignant progression of many cancers including breast (31, 32), as well as in resistance to chemotherapy in breast cancer (33). Persistent activation of ERK1/2 pathway can lead to increased production of proteolytic enzymes and destruction of the extracellular matrix and basement membrane (34-37). The versatility of the MAPK pathway is compatible with the pleiotropic effects of ADAM23 and increased activation of the MAPK by ADAM23 silencing represents a putative mechanism by which ADAM23 controls the invasive and the proliferative programs in tumor cells. However, we observed that ADAM23-knockdown did not change the levels of ERK1/2 activation in SK-Mel-37 melanoma cells (data not shown). It is well known that responses of different tumor lines to certain environmental conditions (collagen type-1 matrices) or molecular alterations (ADAM23 ablation) can be related to their genetic background, as shown by different sensitivity to retinoic acid of neuroblastoma cells (38) or divergent responses to FGF2 in a RAS-dependent fashion (39). In this case, the differences of ADAM23 in the control of ERK1/2 activation appears to be also cell type-specific and suggests that ADAM23 can be placed in a more complex signaling scenario. This complexity can be explained by differential expression of ADAM23-ligands, such as α v-integrins, the Leucine-rich Glioma Inactivated-1 and -4 (LGI1, LGI4) (40) and cellular prion

protein (PrPc) (41); and/or differential expression of specific ADAM23 splicing isoforms (α , β and γ). Thus, although it is not yet completely clear which are the molecular mechanisms behind ADAM23 silencing, in Figure 10, we propose a basic schematic model to summarize the ADAM23 biological functions and to highlight the cooperative mechanisms used by ADAM23-heterotypic tumors for metastatic spreading and colonization. Collectively, our observations highlight the importance of the understanding of how single genetic variations arising in individual tumor cells can influence tumor behavior at the population-level. This perception would lead to a revised concept of malignant progression in which the acquisition by single cells of metastatic properties such as invasion, spreading and colonization can be replaced by a cooperative cellular consortium of distinct specialized subclones. Under this perspective of 'cellular cooperation', the current debate about the time point in which the metastatic dissemination occurs (43) can be conciliated by the fact that dissemination of tumor cells may depend more on the conditioning of microenvironment by distinct subpopulations of interacting cells, than on their own intrinsic abilities to invade, intravasate, survive and colonize ectopically. Moreover, under this perspective increased mutation rates and genetic stability would not be strictly necessary for the metastatic cascade to be completed. In conclusion, the present work introduces ADAM23 as a pleiotropic molecule, modulating basic cellular characteristics, such as invasion and proliferation. shRNA mediated stable ADAM23-knockdown altered these programs in two independent human tumor cell lines, allowing us to speculate if ADAM23 effects could be also relevant for other tumor types, at least, as many as the number of reports that have associated genetic or epigenetic silencing of ADAM23 with tumor progression (14-19). ADAM23 silencing during tumor progression generates clonogenic heterogeneity and provides means for tumor cells with different molecular properties to cooperate, increasing the metastatic efficiency of the tumor as a whole. Understanding of how these tumor cell societies interact during metastatic progression and identifying molecules that are responsible for the cross-talk between tumor cell subpopulations will certainly envisage new approaches for treating metastatic disease.

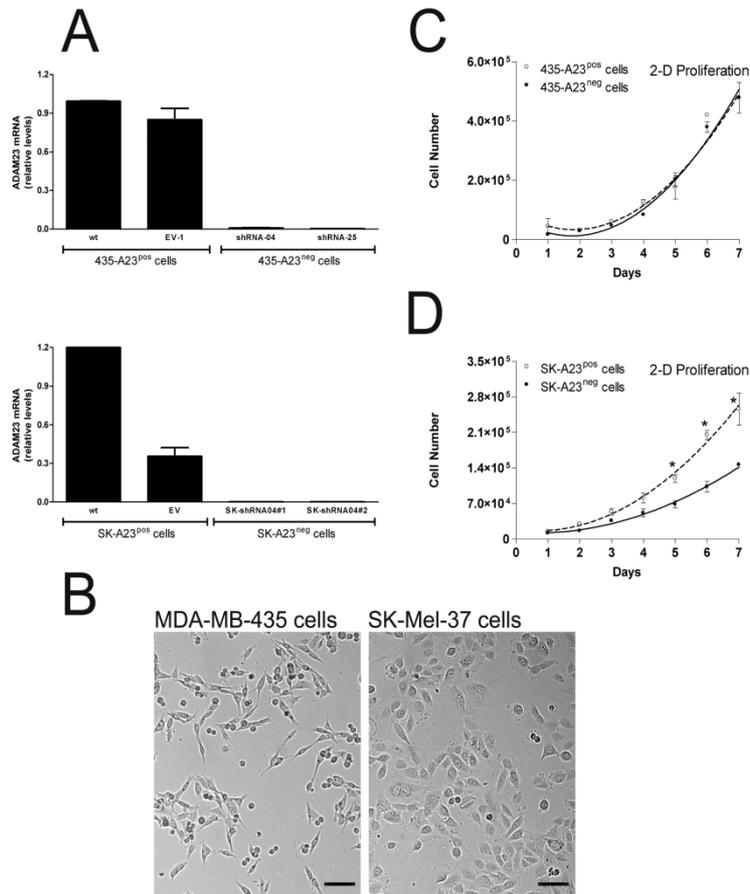


Figure 1: Growth inhibitory effect of ADAM23-knockdown in melanoma SK-Mel-37 cells, but not in MDA-MB-435 tumor cell line, *in vitro* in a 2-D culture. A, ADAM23 knockdown efficiency was evaluated by real-time PCR in two independent clones for each cell line transfected with shRNA construct (shRNA04) targeting the ADAM23 mRNA as described previously (27). For each cell model the respective parental cells (wt) and cells transfected with empty vector (EV) were used as positive controls for ADAM23 mRNA expression. To facilitate the presentation of results, in the aforementioned experiments, we grouped cells accordingly to the cell type (435 or SK cells) and ADAM23 expression levels (A23^{POS} or A23^{NEG}). B, Transmitted light microscopy images of mesenchymal-like MDA-MB435 cells (named 435) and SK-Mel-37 (named SK). Bar represents 10 μ m. C, Growth curve of monolayer cultured MDA-MB-435 ADAM23-positive cells are not significantly different from derivatives ADAM23-negative cells ($p < 0.05$, Mann-Whitney test, N=3 with duplicates). D, Growth curve of monolayer cultured SK-Mel-37 ADAM23-positive cells are significantly different from derivatives SK-Mel-37 ADAM23-negative cells after 5th day (* $p = 0.01$, Mann-Whitney test, N=3 with duplicates).

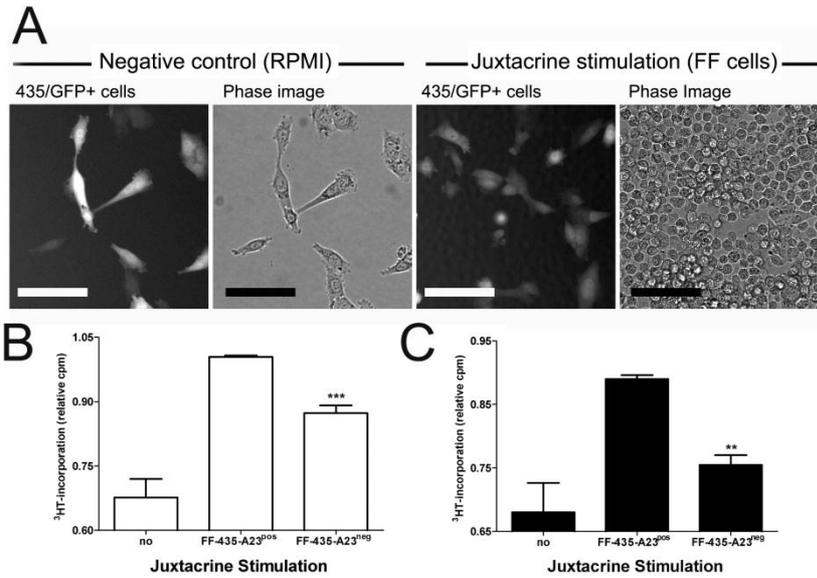


Figure 2: Membrane-bound ADAM23 modulates proliferative signals through cell-cell interactions. A, Representative images of Juxtacrine Assays in which MDA-MB-435/GFP-labeled cells (direct fluorescent microscopy, left panels) arrested in G0/G1 interphase were stimulated on top by formalin-fixed (FF) cells for 9h (transmitted light microscopy, right panels), compared with unstimulated cells (RPMI, negative control). B-C, Juxtacrine assays by ³H-TdR uptake. 435-A23^{pos} cells (B) or 435-A23^{neg} cells (clone shRNA04) (C) were synchronized on G0/G1 interphase and stimulated by RPMI (as negative control, no) or RPMI + FF-435-A23^{pos} or RPMI + FF-435-A23^{neg} cells. Bar represents 10 μ m.

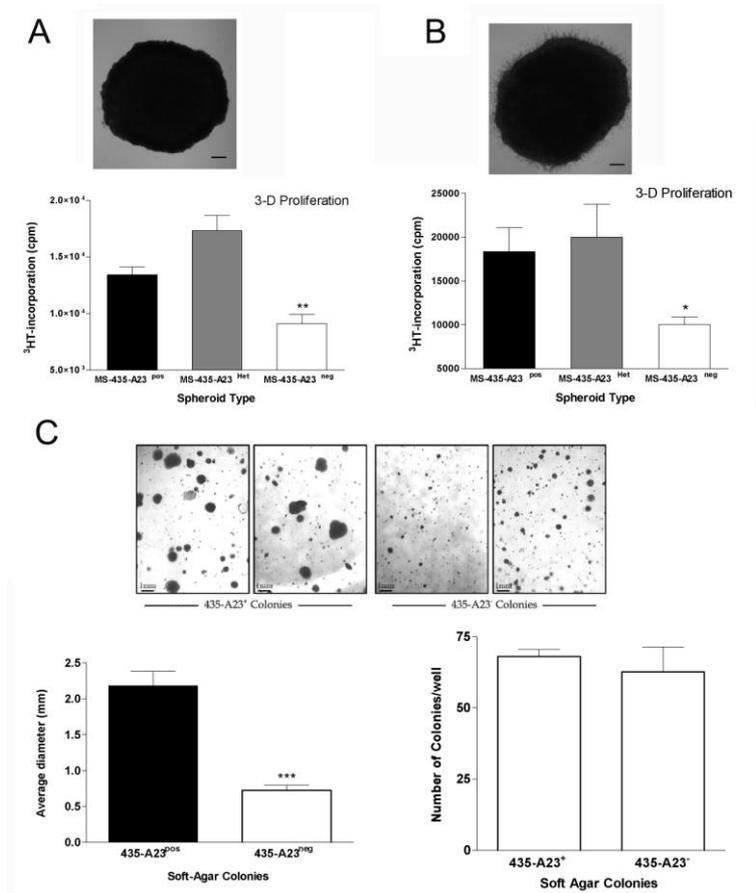


Figure 3: Growth rate of *in vitro* 3-D cultures of MDA-MB-435 cells is optimized by ADAM23 expression. A-B, Multicellular spheroid (MS) were generated by spontaneous aggregation of 435 cells on top of non-adherent surface. All suspended cells contribute to formation of a single spheroid (transmitted light microscopy). ADAM23-dependent proliferation measured by differences in 3H-TdR (1 μ Ci/mL, 10⁻⁷ mol/L) uptake in MS suspended in complete medium over non-adherent agarose (A) or embedded for 3 days in 3-D collagen type-I matrix (B) (** p <0.001, * p <0.01, ANOVA test). N=3 independent experiments with triplicates. (C) Anchorage-independent growth assay of 435-A23^{pos} and 435-A23^{neg} cells, plated at single cell density and embedded in 3-D soft-agar. Colonies were established after 3 weeks (top). ADAM23-dependent effects on 3-D colonies formation is not related with clonogenic potential (bottom right, p >0.05, t test) but, instead, ADAM23-silencing inhibits colonies growth (bottom left, *** p <0.001, t test). N=3.

Table 1 - Tumorigenic assays in Nude Balb/c mice.

	s.c. Tumorigenesis % animals with tumor
435-A23^{pos}	93 (14/15)
435-A23^{neg}	33 (5/15) **
435-A23^{Het}	91 (10/11)
SK-A23^{pos}	80 (4/5)
SK-A23^{neg}	60 (3/5)
SK-A23^{Het}	100 (6/6)

Each cell line, MDA-MB-435 (435) or SK-Mel-37 (SK) or their respective ADAM23-negative counterparts (A23^{neg}) were inoculated s.c. (10^6 cells/mice) in 50 μ l of PBS. The third experimental group was generated by a single-cell suspension of 1:1 ratio of ADAM23-positive and ADAM23-negative cells (A23^{Het}). Tumor growth was checked weekly for 2-3 months. ** $p < 0.001$, X^2 test.

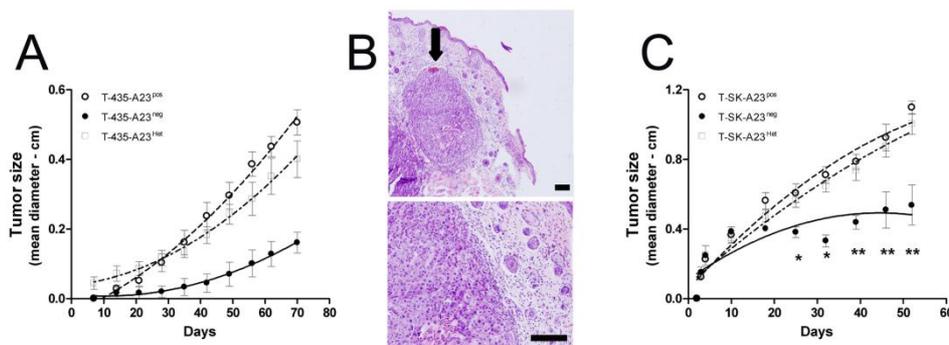


Figure 4: ADAM23 expression promotes optimal growth of subcutaneous (s.c.) primary breast tumors and melanomas in Nude Balb/c mice. A, s.c. tumor growth kinetics of 10^6 ADAM23-positive MDA-MB-435 (left) or SK-Mel-37 (right) cells (A23^{pos}) compared with their respective ADAM23-negative counterparts (A23^{neg}) and with ADAM23-heterotypic co-cultures (A23^{Het}). All cells were inoculated with 50 μ l of PBS. Tumors were monitored by weekly examination and growth rates were determined from mean of caliper measurements of two perpendicular diameters: MDA-MB-435 ADAM23-negative tumors (T-435-A23^{neg}) growth significantly slower than ADAM23-positive (T-435-A23^{pos}) or ADAM23-heterotypic tumors (T-435-A23^{Het}) (left, $p=0.01$, Kruskal-Wallis test). B, Histology of s.c. 435 ADAM23-negative “dormant” tumor in the s.c. lateral flank of a Nude Balb-c mouse (H/E staining). Bar represent 20 μ m. (C) SK-Mel-37 ADAM23-negative tumors (T-SK-A23^{neg}) display a significantly reduced growth after day 25 compared with ADAM23-positive or ADAM23-heterotypic tumors (* $p < 0.05$, ** $p=0.002$, ANOVA test).

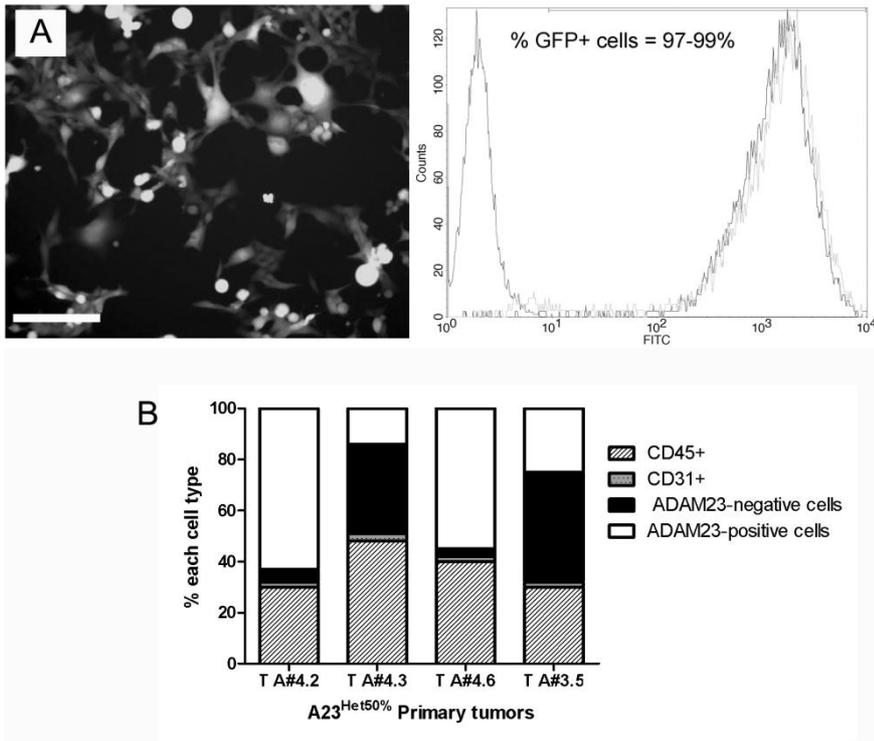


Figure 5: ADAM23-positive cells can induce the proliferation of ADAM23-negative cells in ADAM23-heterotypic tumors. A, Fluorescence microscopy images (left panel) and flow cytometry data (right panel) shown the stability of GFP expression in *ex vivo* 435 cells after 4 months *in vivo* passage. Bar represents 10 μ m. B, Percentages of cell types co-existing in ADAM23-heterotypic tumors on day 90 after inoculation. Initially were inoculated s.c. a single cell suspension of 1:1 ratio of unlabeled 435-A23^{pos} cells plus 435-A23^{neg}/GFP-labelled cells. Percentages of CD31⁺ cells (PE, mice endothelial cells), CD45⁺ cells (APC, mice macrophages and haematopoietic cells), 435-A23^{pos} (no stain) and 435-A23^{neg}/GFP^{pos} cells are analyzed by FACS.

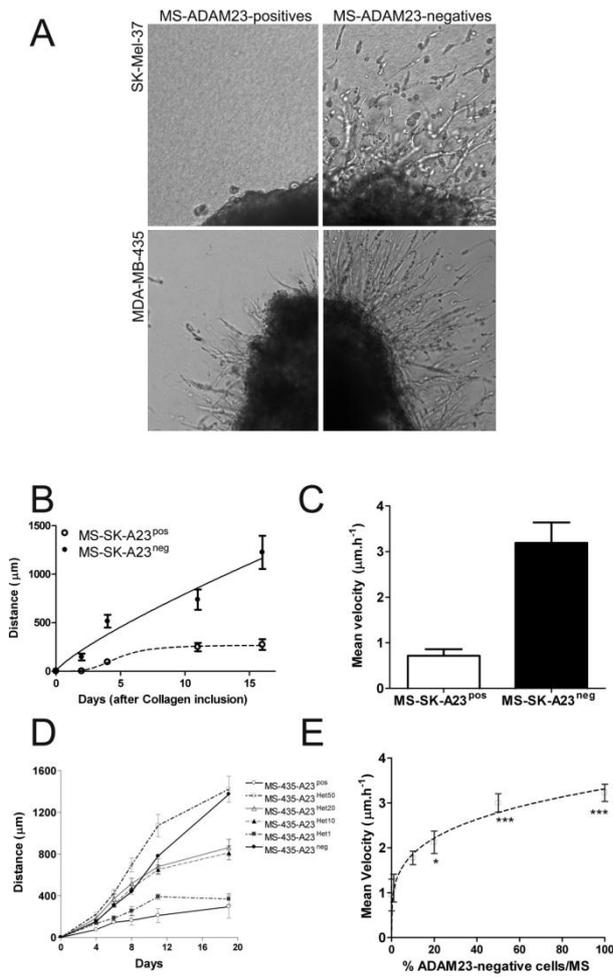


Figure 6: ADAM23 negative modulates 3D migration in breast tumor and melanoma cells. A, Multicellular spheroids (MS) constituted by 435 or SK lineages, ADAM23-positives or ADAM23-negatives cells, after 10 days of embedment in 3D collagen type-I matrices (transmitted light microscopy). B, Migratory kinetic of MS by taking the distances (μm) between borders and a 100-200 “leader” cells of each bundle and/or 50-100 single amoeboid cells. Kinetics of MS-SK-A23^{neg} are significantly faster than ADAM23-positive spheroids ($p=0.05$, Mann-Whitney test). C, Average speed of cells in spheroids derived from kinetic in B. MS-SK-A23^{neg} are 4.5 faster than ADAM23-positive spheroids (** $p<0.01$, t test). D, Invasive kinetic of 3D collagen-embedded spheroids, constituted by 435-A23^{pos} cells, 435-A23^{neg} cells or by a single mixture with different percentages (1%, 10%, 20% or 50%) of ADAM23-negative cells in an 435 ADAM23-positive spheroid. E, Average speed of 3D migration represented as a function of the percentage of ADAM23-negative cells in each multicellular spheroid (* $p<0.05$; *** $p<0.0001$, Mann-Whitney test).

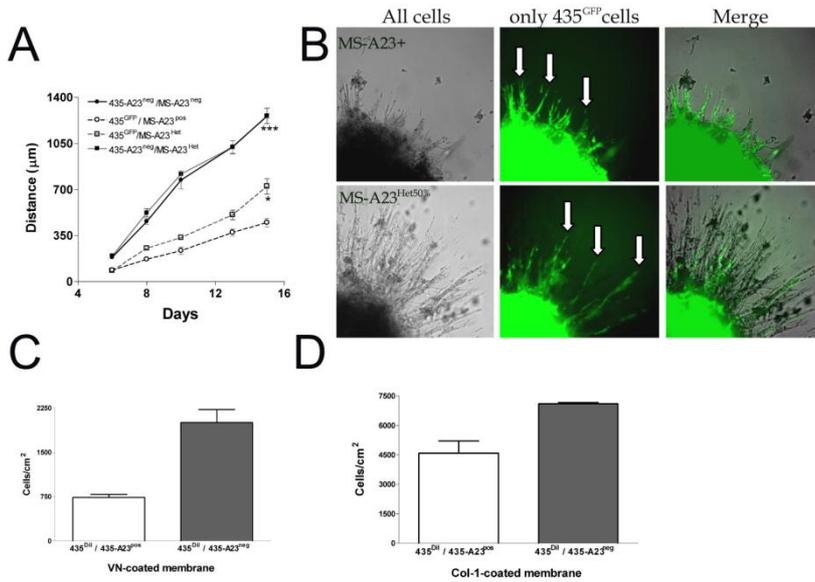


Figure 7: Fast-moving ADAM23-negative cells increase mobility of fast-growing neighbor ADAM23-positive cells. A, 3D invasive kinetic of GFP-labeled 435-A23^{pos} cells (435^{GFP}) on MS embedded in low-density 3D collagen matrices (1.5mg/ml). MS are constituted by 1:1 ratio of 435^{GFP} cells plus non-labeled 435-A23^{pos} cells (435^{GFP}/MS-A23^{pos}) or plus non-labeled 435-A23^{neg} cells (435^{GFP}/MS-A23^{Het}). (*p<0.05 and ***p<0.001, ANOVA test). B, Representative images of migrating MS on day 8. 435^{GFP} constituent cells were visualized by direct fluorescence microscopy and whole MS (GFP cells and co-cultured unlabeled 435-A23^{pos} cells, upper, or unlabeled 435-A23^{neg} cells, bottom) are visualized by transmitted light microscopy. Arrowheads indicate “leader cells”. C and D, Haptotatic co-migration assay. A 1:1 ratio of single suspension of DilC18-labeled 435-A23^{pos} cells (435Dil) with unlabeled 435-A23^{pos} or 435-A23^{neg} cells were plated in the upper side of transwell plates in which the bottom of the membrane was coated with vitronectin (C) or collagen type I (D). ***p<0.001, * p<0.01 (t test).

Table 2 – Tumorigenesis and Metastasis of 435 cells inoculated in mammary fat pad (m.f.p.) of Nude mice.

Tumor Type	m.f.p. Tumorigenesis		m.f.p. Metastasis	
	% animals with tumor	% animals with metastasis	#metastasis/animal	
435-A23 ^{pos}	100 (14/14)	36 (5/14)	12 ± 6	
435-A23 ^{neg}	75 (9/12)	22 (2/9)	3 ± 1	
435-A23 ^{Het}	87 (20/23)	55 (11/20)	4 ± 3	

Female nude Balb/c mice were inoculated with 10^6 435-A23^{pos} or -A23^{neg} cells into the m.f.p in 30 μ l of Matrigel. The third experimental group (435-A23^{Het}) was generated by a single cell suspension of 1:1 ratio of both cells. Tumor growth rate were checked weekly from caliper measurements. The primary tumors were excised at a mean diameter of 1cm. Two months after tumor excision mice were killed and examined for metastasis.

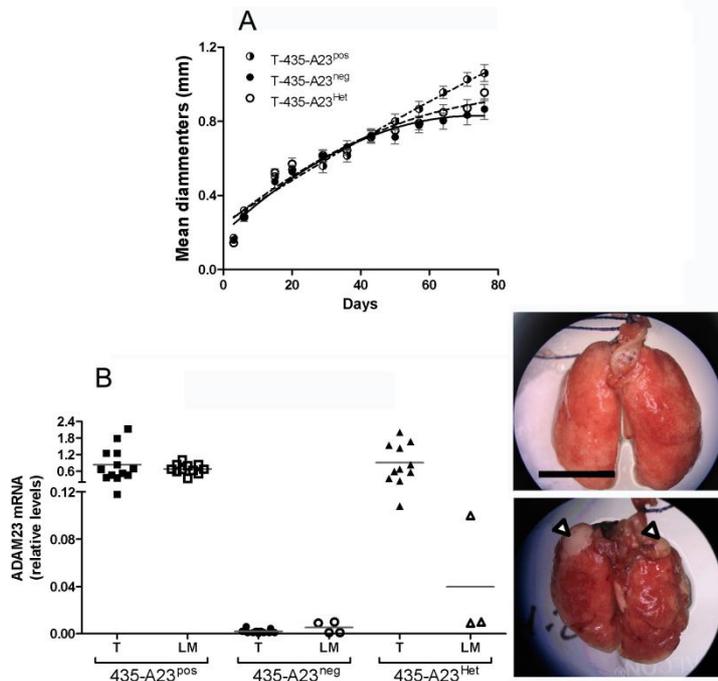


Figure 8: Growth rate of 435 tumors in m.f.p. of female nude mice and ADAM23 expression. A, m.f.p. tumor growth kinetics of 10^6 435 cells (A23^{pos}) compared with their respective ADAM23-negative counterparts (A23^{neg}) and with ADAM23-heterotypic co-cultures (A23^{Het}). All cells were inoculated in 30 μ l of Matrigel. Tumors were monitored by weekly examination and growth rates were determined from mean of caliper measurements of two diameters. Growth of ADAM23-negative tumors (T-435-A23^{neg}) were not significantly different to those of T-435-A23^{pos} and T-435-A23^{Het} ($p=0.8$, Kruskal-Wallis test). On right, a representative image of m.f.p. tumor excision. B, qPCR analysis of ADAM23 expression for primary tumors and their respective metastases injuries. On right, Representatives images of normal lung and colonized lung with macroscopic injuries. Arrowheads shown metastatic injuries selected for dissection. Bar represent 1cm.

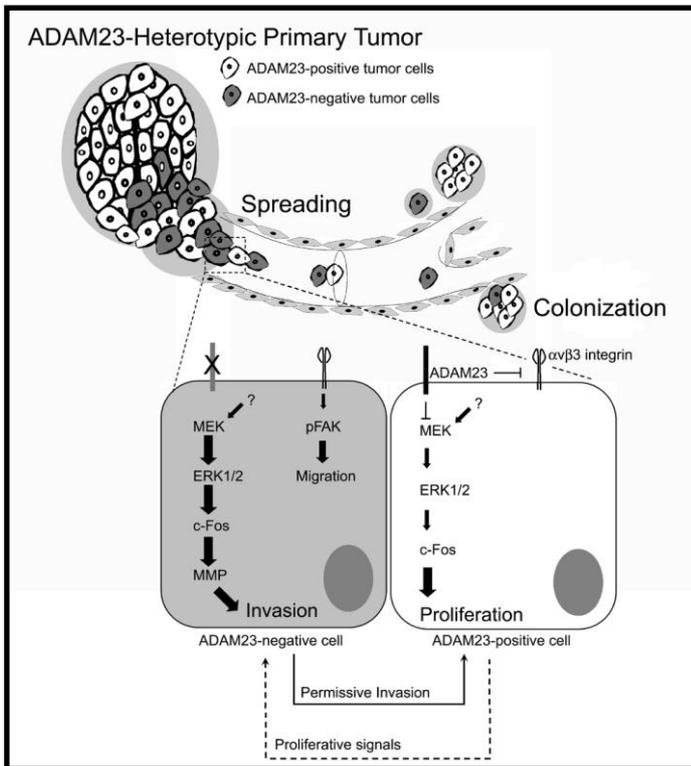


Figure 10: Scheme of ADAM23-mediated cooperation among tumor cells. ADAM23 act as a pleiotropic molecule, inhibiting the invasive behavior and stimulating cellular proliferation. Whereas ADAM23-positive cells (white cells) exhibit a fast-growing phenotype and higher tumorigenic ability, ADAM23-negative cells (grey cells) display a severe proliferative deficiency, but in contrast exhibit a fast-invasive phenotype dependently of increased MAPK pathway activation (represented by larger black arrows in ADAM23-negative cells). When mixed, these two subsets of cells create an ADAM23-dependent heterogeneity in the primary tumors which results in a global increasing of the metastatic efficiency in ADAM23-heterotypic tumors.

Supplemental data

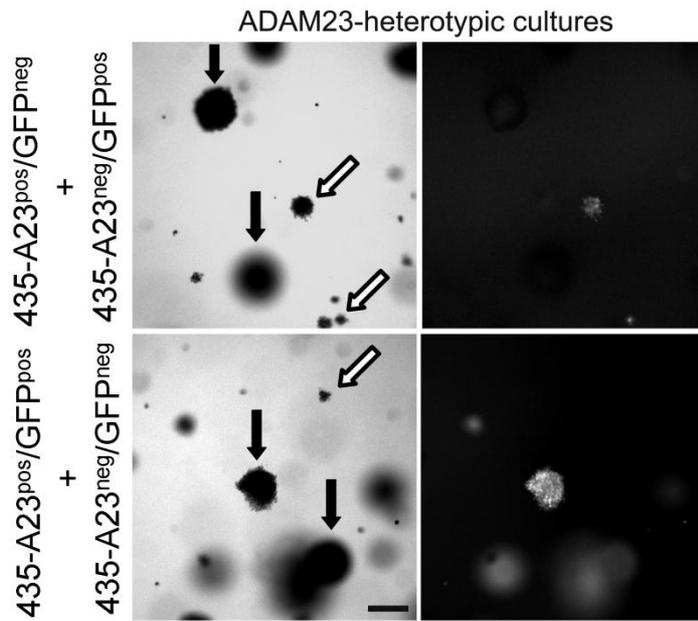


Figure S1: Anchorage-independent clonogenic assay of MDA-MB-435 ADAM23-heterotypic cultures in which ADAM23-positive cells expressing constitutive levels of Green Fluorescent Protein (GFP) were plated together but prevented from establishing cell-cell contacts with ADAM23-negative/GFP-negative cells. In this case, large colonies were GFP-positive (lower panel). When ADAM23-negative/GFP-positive and ADAM23-positive/GFP-negative cells were co-cultured in soft-agar, large colonies were preferentially GFP-negative (upper panel). Colonies were established after 3 weeks (top). Black arrows indicate ADAM23-positive colonies whereas white arrows indicate ADAM23-negative colonies.

References:

- 1) Deisboeck TS, Couzin ID Collective behavior in cancer cell populations. *BioEssays* 31: 190-197, 2009;
- 2) A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? François-Clément Bidard, Jean-Yves Pierga, Anne Vincent-Salomon and Marie-France Poupon. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 March ; 27(1): 5-10;
- 3) Axelrod R, Axelrod DE and Pienta KJ. (2006) Evolution of cooperation among tumor cells *PNAS* 103, 13474-13479;
- 4) CANCER RESEARCH 44, 2259-2265, June 1984 Perspectives in Cancer Research Tumor Heterogeneity Gloria H Heppner;
- 5) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84, pp. 7295-7299, October 1987 Medical Sciences
Subpopulations of MCF7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: A model to analyze the heterogeneity of human breast cancer (stem cells/differentiation) MARIANA RESNICOFF*, ESTELA E. MEDRANO*, OSVALDO L. PODHAJECI, ALICIA I. BRAVOI, LAURA BOVER*, AND JOSE MORDOH*
- 5b) *Cancer and Metastasis Reviews* 9: 21-34, 1990. Cellular interactions in metastasis Fred R. Miller and Gloria H. Heppner;
- 5c) CANCER RESEARCH 44, 2259-2265, June 1984] Tumor Heterogeneity Gloria H Heppner;
- 5d) Collective behavior in cancer cell populations Thomas S. Deisboeck,1* and Iain D. Couzin2 *BioEssays* 31:190-197, 2009;
- 6) Migration of Highly Aggressive MV3 Melanoma Cells in 3-Dimensional Collagen Lattices Results in Local Matrix Reorganization and Shedding of alpha2 and beta1 Integrins and CD44
Peter Friedl,2 Kerstin Maaser, C. Eberhard Klein, Bernd Niggemann, Georg Krohne, and Kurt S. Zanker *CANCER RESEARCH* 57, 2061-2070. 1997;
- 6b) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis Antoine E. Karnoub1, Ajeeta B. Dash2, Annie P. Vo1, Andrew Sullivan2, Mary W. Brooks1, George W. Bell1, Andrea L. Richardson3, Kornelia Polyak4, Ross Tubo2 & Robert A. Weinberg1 *Vol 449* 4 October 2007 557-565;
- 7) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis Sachie Hiratsuka1, Akira Watanabe2, Hiroyuki Aburatani2 and Yoshiro Maru1,3 *NATURE CELL BIOLOGY VOLUME 8 | NUMBER 12 | DECEMBER 2006* 1369-1375;
- 8) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche Rosandra N. Kaplan1,2,6*, Rebecca D. Riba1,2*, Stergios Zacharoulis1,2,6*, Anna H. Bramley1,2, Loi'c Vincent4, Carla Costa1,2, Daniel D. MacDonald1,2, David K. Jin4, Koji Shido4, Scott A. Kerns1,2, Zhenping Zhu8, Daniel Hicklin8, Yan Wu8, Jeffrey L. Port5, Nasser Altorki5, Elisa R. Port7, Davide Ruggero9, Sergey V. Shmelkov1,2,4, Kristian K. Jensen1,2, Shahin Rafii3,4 & David Lyden1,2,6 *Vol 438* 8 December 2005 | doi:10.1038/nature04186, 820-827;
- 9) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. Judith M White *Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15:598-606;
- 10) Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17:7-30.
- 11) ADAMs: KEY COMPONENTS IN EGFR SIGNALLING AND DEVELOPMENT Carl P. Blobel *NATURE REVIEWS* 6 2005 32-43;
- 12) Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I: Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: Novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J* 334 (Pt 1):93- 98, 1998;
- 13) Cal S, Freije JM, Lopez JM, Takada Y, Lopez-Otin C. 2000. ADAM23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 11:1457-1469;
- 14) Verbitsck NV, Costa ET, Costa FF, Cavalher FP, Costa MD, Muras A, Paixão VA, Moura R, Granato MF, Ierardi DF, Machado T, Melo F, Ribeiro KB, Cunha IW, Lima VC, Maciel Mdo S, Carvalho AL, Soares FF, Zanata S, Sogayar MC, Chammam R, Camargo AA. ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5546-52. Epub 2009 Jun 23;
- 15) Costa FF, Verbitsck NV, Salim AC, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene* 2004;23:1481-8
- 16) Costa FF, Colin C, Shinjo SM, et al. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. *Neurosci Lett* 2005;380:260-4.
- 17) Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173:31-7.
- 18) Takada H, Imoto I, Tsuda H, et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 2005;24:8051-60.
- 19) Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, et al. Identification of 27 5 CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 2004;23:8705-10;
- 20) *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37728-37. Epub 2006 Oct 10. Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. Willmarth NE, Ethier SP
- 21) Schor, S. L., Schor, A. M., Winn, B., and Rushton, G. The use of three-dimensional collagen gels for the study of tumour cell invasion in vitro: experimental parameters influencing cell migration into the gel matrix. *Cancer (Lond.)*, 29: 57-62, 1982;
- 22) Lewis, C. E., Pollard, J. W. (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605-612;
- 23) Judith S. Sebolt-Leopold and Roman Herrera TARGETING THE MITOGENACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADE TO TREAT CANCER *NATURE REVIEWS CANCER* VOLUME 4 937-947;
- 24) Reddy KB, Nabha SM and Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 22: 395-403, 2003;
- 25) Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):19-26;
- 26) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products
Leon O. Murphy, Sallie Smith, Rey-Huei Chen, Diane C. Fingar and John Blenis *NATURE CELL BIOLOGY VOL 4 AUGUST 2002* 556-564;
- 27) CANCER RESEARCH 50, 717-721. 1990 Tumorigenicity and Metastasis of Human Breast Carcinoma Cell Lines in Nude Mice Janet E. Price,2 Aristidis Polyzos,3 Ruo Dan Zhang, and Lisa M. Daniels;
- 27b) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78, pp. 6226-6230, 1981 Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells GEORGE POSTE;
- 27c) JOHN DOLL*, AND ISIAH J. FIDLER; *CANCER RESEARCH* 40, 3977-3981 1980 Growth Interaction in Vivo between Tumor Subpopulations Derived from a Single Mouse
Mammary Tumor1 Bonnie E. Miller,2 Fred R. Miller, John Leith, and Gloria H. Heppner;
- 27d) Tamori Y, Bialucha CU, Tian A-G, Kajita M, Huang Y-C, et al. (2010) Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in Cell Competition. *PLoS Biol* 8(7): e1000422. doi:10.1371/journal.pbio.1000422;
- 28) *J Neurosci Res.* 2004 Dec 1;78(5):647-58. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. Goldsmith AP, Gossage SJ, French-Constant C;
- 29a) <http://www.proteinatlas.org/>
- 29) <http://www.proteinatlas.org/search/adam23>
- 30) <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000114948/cancer/malignant+melanoma>
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000114948/cancer/breast+cancer>
- 30c) Seeding and Propagation of Untransformed Mouse Mammary Cells in the Lung Katrina Podsypanina,* Yi-Chieh Nancy Du, Martin Jechlinger, Levi J. Beverly, Dolores Hambardezumyan, Harold Varmus *SCIENCE VOL 321* 1841-1844;
- 31) Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Treatment of Malignant Melanoma David J. Panka, Michael B. Atkins, and James W. Mier *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Suppl) April 1, 2006 2371-2375;
- 32) *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1263-84. Epub 2006 Oct 7. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA;
- 33) *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 15;15(4):1487-95. Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. McGlynn LM, Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, Cameron D, Twelves C, Bartlett JM, Cooke TG;
- 34) Coutts AS, Murphy LC: Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* 58: 4071-4074, 1998;
- 35) McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG: Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 274: 4347-4353, 1999;

- 36) Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC: Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 8: 1747–1753, 2002;
- 37) Overall CM, Lopez-Otin C: Strategies for mmp inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657–672, 2002;
- 38) Abemayor E, Sidell N. Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health Perspect* 1989; 80: 3–15;
- 39) Fibroblast Growth Factor 2 Restrains Ras-Driven Proliferation of Malignant Cells by Triggering RhoA-Mediated Senescence Erico T. Costa, Fa'bio L. Forti, Tatiana G.F. Matos, Alexandre Dermargos, Fa'bio Nakano, Jacqueline Salotti, Ka'tia M. Rocha, Paula F. Asprino, Celina K. Yoshihara, Marianna M. Koga, and Hugo A. Armelin *Cancer Res* 2008; 68: 6215-6223;
- 40) LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11 Koji Sagane^{1,2}, Yasushi Ishihama¹, Hachiro Sugimoto² *International Journal of Biological Sciences* 2008 4(6):387-396;
- 41) Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein Michele D.M. Costa, Katia S. Paludob, Giseli Klassena, Marilene H. Lopes, Adriana F. Mercadantea, Vilma R. Martinsc, Anamaria A. Camargoc, Lia S. Nakaoa, Silvio M. Zanata. *Neuroscience Letters* 461 (2009) 16–20;
- 42) Gene. 2004 Jan 21;325:171-8. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. Sun YP, Deng KJ, Wang F, Zhang J, Huang X, Qiao S, Zhao S
- 43) Leaving Home Early: Reexamination of the Canonical Models of Tumor Progression Robert A. Weinberg *Cancer Cell* 14, October 7, 2008

ANEXO 2

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Tamara da Rocha Machado Ferreira

Local e data de nascimento: São Paulo, 16/09/1980

EDUCAÇÃO

- 2007-Atual** Doutorado em Ciências. Programa de Bioquímica.
 Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
 Bolsista da FAPESP.
- 2003 - 2005** Mestrado em Ciências. Programa de Biologia Molecular.
 Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil
 Bolsista do CNPq.
- 1999 - 2002** Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica.
 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
 Bolsista da FAPESP.

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

1. Verbisck, N. V., Costa, E. T., Costa, F. F., Cavalher, F. P., Costa, M. D.M., Muras, A., Paixao, V. A., Moura, R., Granato, M. F., Ierardi, D. F., MACHADO, T. R., Melo, F., Ribeiro, K. B., Cunha, I. W., Lima, V. C.C., Maciel, M. d. S., Carvalho, A. L., Soares, F. F., Zanata, S., Sogayar, M. C., Chammas, R., Camargo, A. A. ADAM23 Negatively Modulates v3 Integrin Activation during Metastasis. *Cancer Research*. , v.69, p.5546 - 5552, 2009.
2. LISBOA, B. C. G., MACHADO, T. R., PIMENTA, D.C., HAN, S. W. Cloning and characterization of an alternative splicing transcript of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochemistry and Cell Biology (Online)*. , v.85, p.96 - 102, 2007.
3. MACHADO, T. R., SACRAMENTO, C. B., TAKESHITA, D., HAN, S. W., BENTO, F. M., MATHOR, M. B., CARMONA, A. K. Over expression of the selectable marker blasticidin S deaminase gene is toxic to human keratinocytes and murine BALB/MK cells.. *BMC Biotechnology (Online)*. , v.4, 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. Tamara da R. Machado-Ferreira, Érico T. Costa, Anamaria A. Camargo . "The functional role of ADAM23 on SKMel-37 melanoma cells". 21st European Association for Cancer Research conference. Jun/2010. Oslo, Norway.

2. MACHADO, T. R., SACRAMENTO, C. B., HAN, S. W.
"Effect of pyrimidines in the murine keratinocyte BALB/MK". XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)., 2003, Caxambu-MG.
SBBq/ Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual /2003. , 2003. p.113 -

3. MACHADO, T. R., HAN, S. W., TAKESHITA, D.
"The expression of bsrn causes oxidative stress in murine keratinocyte BALB/MK cells". XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)., 2003, Caxambu-MG.
SBBq/ Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual / 2003. , 2003. p.112 -

4. MACHADO, T. R., HAN, S. W., TAKESHITA, D., SACRAMENTO, C. B.
"Inibição de apoptose por análogos da Blastocidina S nos queratinócitos BALB/MK que expressam o gene bsrn". X Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, 2002, São Paulo.
Anais PIBIC 2002. , 2002. p.19 -

5. MACHADO, T. R., SACRAMENTO, C. B., TAKESHITA, D., HAN, S. W.
"Morte celular induzida pelo gene bsrn e pelo IMC". X Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, 2002, São Paulo.
anais PIBIC 2002. , 2002. p.22 -

Demais produções bibliográficas

1. MACHADO, T. R., HAN, S. W., LISBOA, B. C. G.
.. **Cloning and characterization of human small cytidine deaminase.** Descrição de Sequência de um novo gene. , 2004. (Outra produção bibliográfica)

