

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA NTPDASE2 NOS  
PROCESSOS DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA, CÉLULA-MATRIZ,  
MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO**

FRANCIELE CRISTINA KIPPER

ORIENTADOR

PROF<sup>o</sup> DR<sup>o</sup> GUIDO LENZ

CO-ORIENTADORA

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA ROSÂNGELA WINK

PORTO ALEGRE

MARÇO DE 2013

*- Adeus, disse a raposa. Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível para os olhos.*

*- O essencial é invisível para os olhos, repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar.*

*- Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante.*

*- Foi o tempo que eu perdi com a minha rosa... repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar.*

*- Os homens esqueceram essa verdade, disse a raposa. Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela rosa...*

*Antoine de Saint-Exupéry*

# INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

## INSTITUIÇÕES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL:

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular e Centro de Biotecnologia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE:

Laboratório de Biologia Celular

## FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Número do Protocolo: 0613760 e Pronex-2009.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Número do Protocolo: 420036/2005-9 e 485444/2007-0.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFRGS e ao PPGBCM pela oportunidade de estudar em um dos melhores programas de pós-graduação na melhor Universidade do país. E a CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual a realização do mestrado não seria possível.

Ao Guido e à Márcia pela oportunidade de trabalhar com vocês desde a iniciação científica e pela chance de aprender sobre sistema purinérgico com duas pessoas que sabem tanto sobre o assunto. Obrigada pela confiança, pela paciência e pelo aprendizado. Vocês são um grande exemplo para mim.

À minha família pelo suporte e apoio incondicional. Aos meus pais e meu irmão pela amizade, pela ajuda e pela confiança. Ao Rafael por todo carinho e paciência, por me confortar quando necessário. À Cacau e o Nino pela alegria.

Ao pessoal do lab por tornar a pesquisa tão divertida. Em especial ao Darlan, à Pítia e a Camila que me ajudaram em todos os sentidos para a realização do trabalho, obrigada pelo apoio dentro e fora do laboratório. À Alessandra Tamajusuku por me acompanhar nos primeiros passos do “maravilhoso mundo do sistema purinérgicos”. Obrigada ao José pela paciência e otimismo.

Agradeço às minhas amigas (Gabriela, Daiane e Daiana) pelo carinho e pela torcida.

Aos funcionários do PPG pela eficiência que torna as questões burocráticas simples.

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação conta com uma breve introdução sobre os conteúdos necessários para o entendimento do artigo científico. Seguida de objetivos e o manuscrito preparado para submissão ao periódico “Purinergic Signalling”.

Após o manuscrito há uma discussão geral dos resultados seguida de uma conclusão e das perspectivas geradas.

# SUMÁRIO

ABREVIATURAS .....	7
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Sistema Purinérgico .....	13
1.1.1. Nucleotídeos Derivados de Purinas .....	13
1.1.2. Purinoreceptores .....	14
1.1.3. Ectonucleotidases .....	14
1.1.4. Família das Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases .....	15
1.1.5. NTPDase2 (CD39L1) .....	18
1.1.6. Relação entre Sistema Purinérgico e Câncer .....	21
1.2. Mecanismos de Sobrevivência Tumoral .....	21
1.2.1. Diminuição da Apoptose e Aumento da Proliferação .....	22
1.2.2. Aumento da Adesão Célula-Célula e Célula-Matriz .....	23
1.2.3. Aumento da Migração Celular .....	23
1.3. Mecanismos de Adesão.....	23
1.3.1. Proteínas de Adesão Celular.....	23
1.3.2. Matriz Extracelular (MEC) .....	26
1.4. Adesão e o Sistema Purinérgico .....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Geral .....	30
2.2. Específicos.....	30
3. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO .....	31
4. DISCUSSÃO .....	55
5. CONCLUSÕES.....	63
5.1. Gerais .....	63
5.2. Específicas.....	63
6. PERSPECTIVAS .....	65
7. REFERÊNCIAS .....	66

## ABREVIATURAS

- ACR – Domínio Conservado das Apirases (Apirase Conserved Domain)
- ADP – Adenosina Difosfato
- Akt – Homóloga Celular ao Oncogene Viral v-AKT, também conhecida como Proteína cinase B
- AMP – Adenosina Monofosfato
- ATP – Adenosina Trifosfato
- C6 – Linhagem de Glioblastoma de Rato
- CAM – Molécula de Adesão Celular (*Cell Adhesion Molecule*)
- CD39 – *Cluster of Differentiation 39*, ou NTPDase1
- Cos-7 – Linhagem De Fibroblastos Renais Transformados De Macaco
- CR – Região Conservada (*Conserved Region*)
- DMEM – Meio de Cultura (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- ECM – Matriz Extracelular (*Extracellular Matrix*)
- EGFP – Proteína Verde Fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)
- E-NPPs – Ecto Nucleosídeo Pirofosfatases Fosfodiesterases
- E-NTPDases – Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases
- ERK – Cinase Regulada por Sinal Extracelular (*Extracellular signal Regulated Kinase*)
- EYFP – Proteína Amarela Fluorescente (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*)
- FAK – Cinase de Adesão Focal (*Focal Adhesion Kinase*)
- FRAP – Substituição da Fluorescência após a Inativação Irreversível das Moléculas Fluorescentes (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)
- Gi/Go - Proteína G inibitória
- GL261 – Linhagem de Glioblastoma Murino
- GPI – Glicosil Fosfatidil Inositol
- Gs - Proteína G estimulatória
- Hek293 – Linhagem de Células Embrionárias de Rim Humano (*Human Embryonic Kidney*)
- HeLa - Linhagem de Câncer Cervical Humano (Obtida de Henrietta Lacks)
- IP3 – Inositol Trifosfato
- $K_m$  – Concentração de Substrato para Atingir a Velocidade Máxima de uma Proteína
- NTPDase – Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases
- Pi – Fosfato Inorgânico
- PPi – Pirofosfato Inorgânico

RanBPM – Proteína M Ligadora de Ran (*Ran Binding Protein M*)

Ras – proteína intracelular ativada por GTP envolvida na transdução do sinal (o nome é abreviação de Rat sarcoma)

RB2 – Inibidor de NTPDase2 (*Reactive Blue 2*)

SFB – Soro Fetal Bovino

U87 – Linhagem de Glioblastoma Humano

$V_{\max}$  – Velocidade Máxima de Atividade de uma Proteína



## RESUMO

A NTPDase2 é uma ectonucleotidase ancorada na membrana plasmática por dois domínios transmembrana, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Sua principal função é a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados transformando-os em difosfatados, mais fosfato inorgânico. Em menores proporções, também é capaz de hidrolisar nucleotídeos difosfatados. Sua função é remover ATP do meio extracelular, sendo que sua ausência causa acúmulo do nucleotídeo. Trabalhos anteriores demonstram que gliomas com superexpressão da NTPDase2 passaram a apresentar características de maior malignidade e agressividade. Tais peculiaridades, geralmente, são devido a alterações nas atividades de adesão, migração e proliferação celular, processos nos quais já foi demonstrado envolvimento de outras enzimas da mesma família, como a NTPDase1 e a Ecto-5'-nucleotidase *in vitro*. O envolvimento de proteínas com domínios ATPásicos na adesão celular é antigo na literatura. Entretanto, funções da NTPDase2 nestes mecanismos celulares ainda não foram estudadas *in vitro*. Por isso, nesse trabalho, a NTPDase2 foi superexpressa em células U87, GL261, Cos-7 e Hek293 a fim de se estudar seu envolvimento nos processos biológicos de adesão, migração e proliferação celular *in vitro*. Nossos estudos mostraram que a superexpressão de NTPDase2 não altera a proliferação nem modula a migração celular. Entretanto, sua expressão diminui de maneira geral a adesão da linhagem Hek293 transduzidas sobre matrizes extracelulares, mas não modula a adesão sobre monocamada. A análise das imagens de microscopia confocal sugere que a enzima não se concentra na superfície de contato célula-célula, sendo que quando as células estão sobre colágeno tipo I e fibronectina há uma concentração nas regiões de membrana livre. A medida do tempo para recuperação da fluorescência após “photobleaching” indica que sobre colágeno tipo I há uma velocidade de recuperação da fluorescência maior nas regiões de membrana livre. Nossos resultados demonstram que a NTPDase2 não co-localiza com proteínas de complexos ou de adesão focal. Assim podemos concluir que a NTPDase2 fisicamente não modula a adesão célula-célula ou célula-matriz.

## ABSTRACT

NTPDase2 is an ectonucleotidase anchored in the plasma membrane through two transmembrane domains, with the catalytic site facing the extracellular environment. Its main function is the hydrolysis of nucleotide triphosphates turning them into diphosphate nucleotides plus inorganic phosphate. To a lesser extent, it is also able to hydrolyze diphosphate nucleotides. As its function is to remove the extracellular ATP, its absence causes the accumulation of nucleotide. Previous works that reports the overexpression of NTPDase2 in gliomas shows that the cells began to exhibit features of increased malignancy and aggressiveness. Such peculiarities are usually due to changes in the activity of adhesion, migration and proliferation, processes in which it has been demonstrated involvement of other enzymes of the same family as the NTPDase1 and Ecto-5'-nucleotidase *in vitro*. The involvement of proteins with ATPase domain in adhesion is old in literature. However, functions of NTPDase2 in tumor biology have not been studied *in vitro*. So far, in this work, NTPDase2 was overexpressed into U87, GL261, Cos-7 and Hek293 cells, in order to study its involvement in biological processes as adhesion, migration and cell proliferation, *in vitro*. Our studies show that overexpression of NTPDase2 do not alter the proliferation and do not modulate cell migration. However, its expression decreases the adhesion of transduced Hek293 cell line on extracellular matrices. Analyses of the images using a confocal microscope suggested that the enzyme do not concentrate at the cell-cell contact surface. When the cells are cultured over collagen type I and fibronectin, there is a concentration of the protein in free membrane region. The time to fluorescence recovery after photobleaching indicates that in collagen type I there is an increased fluorescence recovery in free membrane regions. More over, our results in colocalization assay indicates that NTPDase2 is not located in focal complexes or focal adhesion. We can conclude that NTPDase2 do not physically modulate cell-cell or cell-matrix adhesion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral do sistema purinérgico.....	13
Figura 2: Topografia predita para as Ectonucleotidases.....	15
Figura 3: Árvore filogenética comparando as NTPDases 1-8 de humanos (h), ratos (r) e camundongos (m).....	16
Figura 4: Alinhamento das E-NTPDases.....	17
Figura 5: Alinhamento da NTPDase2.....	20
Figura 6: O aumento da expressão da NTPDase2 gera acúmulo de ADP no microambiente do glioma.....	21
Figura 7: Sinalização de sobrevivência.....	22
Figura 8: Superfamílias de adesão célula-célula e célula-matriz. ....	25
Figura 9: Domínios conservados da NTPDase2. ....	59

## FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1: Expression of functional NTPDase2 enzyme in Hek293 cells.....	43
Figure 2: NTPDase do not enhanced cell-cell or cell-matrix adhesion.....	46
Figure 3: Confocal microscopy analysis.. ....	48

## FIGURAS SUPLEMENTARES DO MANUSCRITO

Supplementary Figure 1: NTPDase2-EYFP or EGFP transduced cell lines.....	36
Supplementary Figure 2: U87 NTPDase2-EYFP and EGFP transduced cell line.....	37
Supplementary Figure 3: FRAP Assay.....	42
Supplementary Figure 4: NTPDase2 did not alter cell proliferation and migration.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais superfamílias de moléculas responsáveis pela adesão celular. ....24

Tabela 2: Estrutura e função dos principais componentes da matriz extracelular.....27

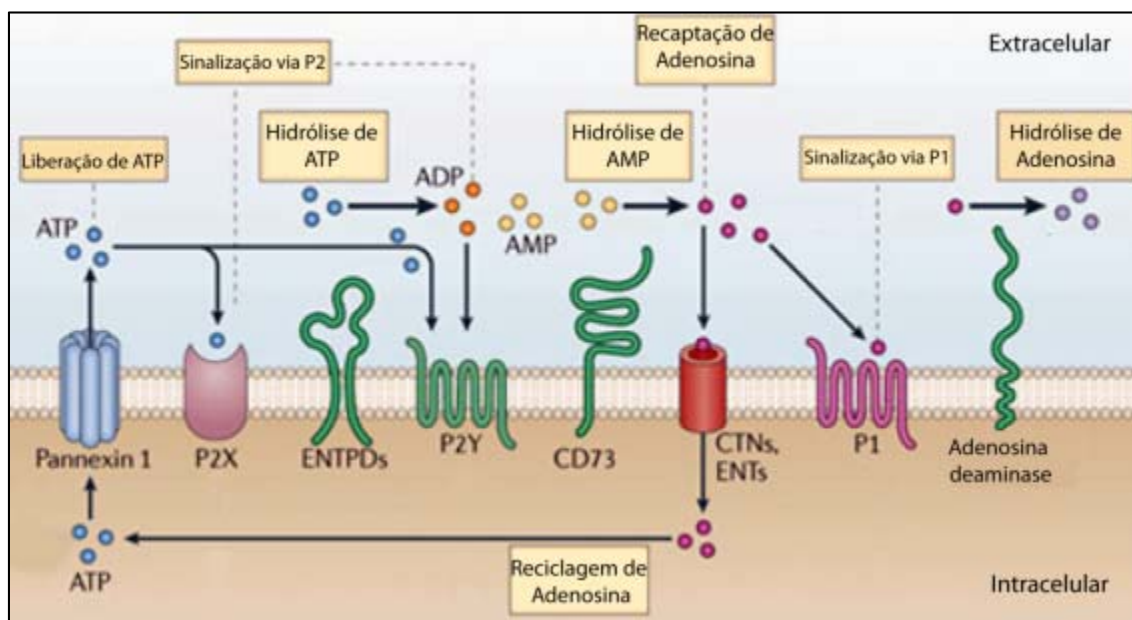
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. SISTEMA PURINÉRGICO

### 1.1.1. NUCLEOTÍDEOS DERIVADOS DE PURINAS

Nucleotídeos derivados de purinas são tradicionalmente conhecidos por suas funções intracelulares em processos de conversão de energia. Porém nas últimas décadas vem crescendo o conhecimento sobre as funções sinalizadoras extracelulares dessas moléculas (Figura 1) (Burnstock, 2009).

Sabe-se, por exemplo, que esse sistema é amplamente distribuído pelo organismo de várias espécies e têm funções de contração no músculo liso, neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico, resposta imune, agregação plaquetária, entre outros (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2007; Neary e Zimmermann, 2009).



**FIGURA 1: VISÃO GERAL DO SISTEMA PURINÉRGICO.** Nucleotídeos derivados de purinas são liberados no espaço extracelular ativam receptores P2X e P2Y, e são degradados por ectonucleotidasas a adenosina. Esta por sua vez ativa receptores P1 e são recaptadas ou degradadas a inosina. A adenosina captada é reciclada à ATP no espaço intracelular e armazenada para liberação. Imagem adaptada de Junger, 2011.

No sistema nervoso central essas moléculas também são capazes de atuar via receptores purinérgicos, modulando a proliferação, a diferenciação neuronal e a neuritogênese com papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário (Braun *et al*, 2003; Zimmermann, 2011 e Zimmermann *et al*, 2012). Em culturas de astrócitos já foi

demonstrado que o ATP é capaz de induzir proliferação através da ativação de receptores P2Y via Erk (Lenz *et al*, 2000 e 2001). Altas concentrações de adenosina são capazes de induzir apoptose por mecanismo dependente e independente de receptores A3 (Ohana *et al*, 2001) enquanto altas concentrações de ATP são capazes de induzir apoptose via ativação de P2X7 (Tamajusuku *et al*, 2010). Após traumas ou isquemia, grandes quantidades de purinas são liberadas para o meio extracelular induzindo o fenômeno conhecido como gliose reativa (Rathbone *et al*, 1999).

### 1.1.2. PURINORECEPTORES

Os efeitos dos nucleosídeos e dos nucleotídeos extracelulares são possíveis na célula através da ação em distintos tipos de receptores: de adenosina (P1) e de ATP/ADP (P2). Esses receptores foram primeiro identificados por Burnstock e seus colaboradores (Burnstock *et al*, 1976).

Os receptores de adenosina conhecidos até o momento são quatro: A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, A<sub>3</sub>. São do tipo metabotrópico com sete  $\alpha$ -hélices transmembrana, sendo que os subtipos de A<sub>2</sub> estão acoplados a proteína G<sub>s</sub> e A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> estão acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>. Podem ser identificados pela distinta afinidade a agonistas e antagonistas (Fredholm *et al*, 2001).

Os receptores para ATP são divididos em duas classes:

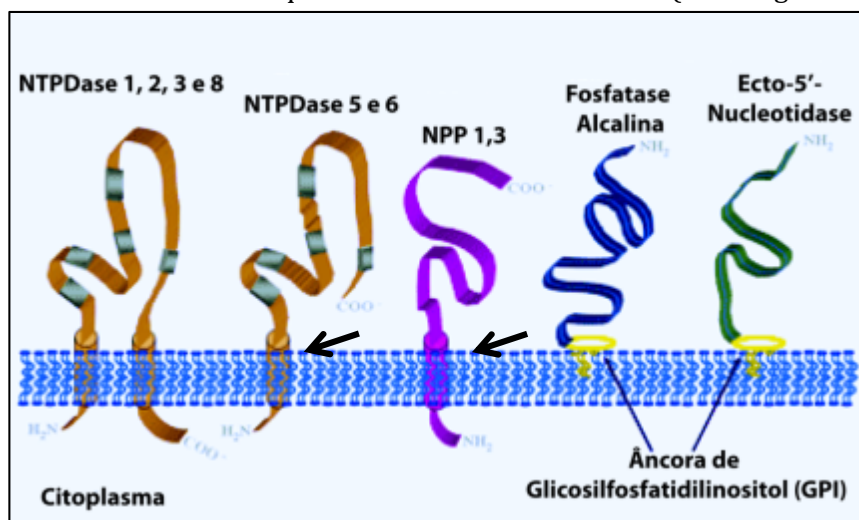
- Ligados a canais iônicos – P2X1-7 – contém dois domínios transmembrana e uma alça extracelular. Quando estimulados levam a abertura de um canal ou poro (para P2X2, P2X4 e P2X7) na membrana celular permitindo a passagem cálcio e até mesmo pequenas moléculas de até 900 Da (Abbracchio *et al*, 1994 e Ballerini *et al*, 1995) ou,
- Ligados à proteína G – P2Y1, 2, 4, 6, 11-13 – possuem sete domínios transmembrana, um domínio N terminal extracelular e uma cauda C terminal intracelular (Ralevic e Burnstock, 1998). A transmissão do sinal se dá através do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> gerado pela fosfolipase C, que induz liberação de cálcio dos estoques intracelulares, ou através da estimulação/inibição da adenilil ciclase (von Kügelgen *et al*, 2000).

### 1.1.3. ECTONUCLEOTIDASES

Após a liberação dos nucleotídeos para o meio extracelular e ativação dos receptores purinérgicos estas moléculas sinalizadoras precisam ser degradados transformando-se em diferentes agonistas/antagonistas. As enzimas denominadas ectonucleotidases são as

responsáveis por esta função. Elas hidrolisam nucleotídeos com consequente liberação de fosfato ou pirofosfato inorgânico e classificam-se da seguinte forma (Figura 2):

- I. Família das Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases): responsáveis pela hidrólise do fosfato  $\alpha$  e  $\beta$  com consequente conversão de  $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$  e liberação de fosfato inorgânico ( $P_i$ ) após cada passo.
- II. Fosfatases Alcalinas: que convertem  $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow$  Adenosina também liberando  $P_i$ .
- III. Família das Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP):  $ATP \rightarrow AMP$ , ao contrário das demais liberam pirofosfato inorgânico (PPi).
- IV. Ecto-5'-nucleotidase: que hidrolisa AMP à adenosina (Schetinger *et al*, 2007).



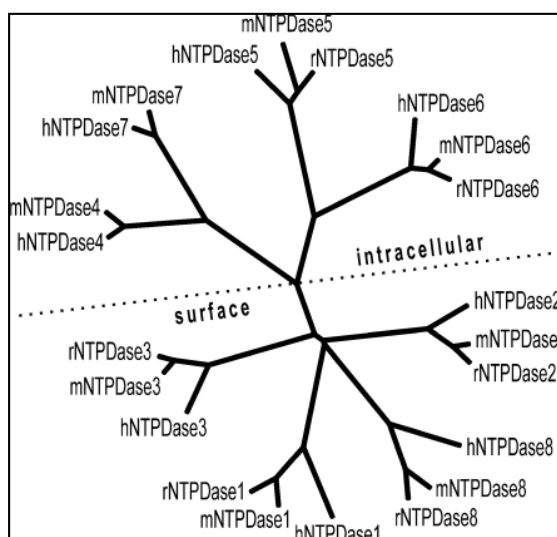
**FIGURA 2:** TOPOGRAFIA PREVISTA PARA AS ECTONUCLEOTIDASAS. A figura ilustra os dois domínios transmembrana da NTPDase1, 2 e 3 e o domínio transmembrana único da NTPDase5 e 6 e das NPPs. As âncoras de glicosil fosfatidil inositol (GPI) que podem ser clivadas liberando a fração extracelular estão destacadas em amarelo. As setas apontam os sítios de clivagem das enzimas solúveis. Adaptado de [http://www.ccri.ulaval.ca/uploads/pics/figure\\_sevigny\\_e.gif](http://www.ccri.ulaval.ca/uploads/pics/figure_sevigny_e.gif).

#### 1.1.4. FAMÍLIA DAS ECTO-NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES

As E-NTPDases são enzimas transmembrana glicosiladas que possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas intracelulares como o Complexo de Golgi e o Retículo Citoplasmático Rugoso. Necessitam de concentrações milimolares de  $Ca^{+2}$  ou  $Mg^{+2}$  (quando ausentes a enzima não mostra atividade) como cofatores para seu funcionamento (Schetinger *et al*, 2007). A propriedade de hidrólise do fosfato  $\beta$  e  $\gamma$  faz com que essas enzimas também utilizem substratos derivados da uridina, guanosina e inosina.

As NTPDases localizadas na membrana plasmática apresentam geralmente dois domínios transmembrana (domínio I e domínio II) de tamanhos similares, com segmentos -NH<sub>2</sub> e -COOH terminais citoplasmáticos e um grande domínio extracelular com a atividade enzimática formando uma grande fenda de catálise (Vorhoff *et al*, 2005).

Todas as enzimas possuem cinco regiões conservadas (Apyrase Conserved Regions – ACR) abreviadas de ACR1 a ACR5, entre as quais se encontra o sítio catalítico (Robson *et al*, 2006). As regiões ACR1 e ACR4 são similares aos domínios de ligação de fosfato β e γ da actina-hsp70 hexoquinase (A[IL]DLGG[TS]) sugerindo que essas proteínas podem ter um ancestral em comum (Flaherty *et al*, 1991; Zimmermann, 2001). A homologia a outras proteínas e a presença de cinco ACRs demonstra que essa família de enzimas é bem conservada evolutivamente (Figura 3) e sugere que possam ter um papel muito importante já que existem várias proteínas com funções redundantes conservadas.



**FIGURA 3:** ÁRVORE FILOGENÉTICA COMPARANDO AS NTPDASES 1-8 DE HUMANOS (h), RATOS (r) E CAMUNDONGOS (m). O alinhamento foi feito utilizando o software ClustalX 1.81, para o dendograma utilizou-se TreeView 1.6.6. O comprimento das linhas indica a diferença entre as sequências dos aminoácidos. Retirado de Vorhoff, 2005.

Até o presente momento, oito diferentes genes que codificam para NTPDases já foram descritos. Quatro deles codificam para NTPDases localizadas na superfície transmembrana com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8)(Figura 4). Os demais genes codificam para NTPDases intracelulares, as quais estão inseridas na membrana plasmática, mas que podem ser clivadas e secretadas (NTPDase 5 e 6) ou localizar-se na superfície luminal de organelas (NTPDase 4 e 7) (Robson *et al*, 2006; Knowles, 2011).



```

      10      20      30      40      50      60      70
ENTPD1  --MEDTKESN VKT-----FC SKNILAILGF SSIIVIALL AVGLTQN-KA LPENVKYGIV LDAGSSHTSL
ENTPD2  --.AGKVR.-.-----L.PP.-L LAAAGLAG.. LLCVPTRDVR E.PAL.....M
ENTPD3  MFTVL.RQPC EQAGLKALYR TPT.I.LVVL LVS.V.LVSI T.IQIHKQEV .PGL.....R.TV
ENTPD8  --.GLSRKE- -QVF..L..A .CVSGLT..I LLLVEATSVL .TDI.F... F.....

      80      90      100     110     120     130     140
ENTPD1  YIYKWPAEKE NDTGVVHQVE ECRVKGPCIS KFKVKVNEIG IYLTDCMERA REVIPRSQHQ ETPVYLGATA
ENTPD2  F.....D... ..I.G.HS S.D.P.G... SYADNPSGAS QS.VG.L.Q. LQDV.KER.A G..L.....
ENTPD3  .V.Q.....N...S.TF K.S...S... SYGNPQDVP RAFEE..QKV KGVV.SHL.G S..IH.....
ENTPD8  FL.Q.L.N...G...S.AL A.Q.E..... SYTSNAAQA. ES.QG.L.E. LVL..EA..R K..TF.....

      150     160     170     180     190     200     210
ENTPD1  GMRLLRMESE ELADRVLVVV ERSLSNYPFD FQGARIITQQ EEGAYGWITI NYLLGKFSQK TRWFSIVPYE
ENTPD2  .....NLNTP .ASTS..MA. THT.TQ....R...LS... ..VF..V.A ...EN.IKY G--WVGRWFR
ENTPD3  .....LQN. TA.NE..ESI QSYFKSQ...R.Q..S... ..V.....A ...M.N.LE. N--LWHMVWH
ENTPD8  .....SRKNS SQ.RDIFAA. TQV.GRS.V. .W..ELLA.. A...F...V ..G..TLVKY S--.TGEWIK

      220     230     240     250     260     270     280
ENTPD1  TNNQETFGAL DLGGASTQVT FVPQNQTIES PDNALQFRLY GKDYNVYTHS FLCYKQDQAL WOKLAKDIOV
ENTPD2  P-RKG.L..M .....I. .ETTSPAEDR A-SEV.LH...QH.R.....R..V. QRL..SAL.T
ENTPD3  PHGV..T... ..IS ..ACEKMDLN TSDIM.VS...YV.TL... ..Q...RNE.E KKF..MLL.N
ENTPD8  PPEEMLV...M.....I...GGPILDK S-TQAD....S..S.....Y..F.R..M. SRL.VGLV.S

      290     300     310     320     330     340     350
ENTPD1  ASNE-ILRDP CFHPGYKKVV NVSDLYKTPC TKRFEMTLP- -FQQFEIQGI GNYQQCHQSI LELENTSYCP
ENTPD2  HG-----FH. .WPR.FSTQ. LLG.V.QS...MAQRPNFN SSARVSL.S SDPHL.RDLV SG..SF.S..
ENTPD3  SPTKNH.TN. .YPRD.SISF TMGHVFDLSL. .VDQRPEYN PNDVITFE.T .DPSL.KEKV ASI.DFKA.H
ENTPD8  RPAA-L..H. .YLS..QTTL ALGP..ES...VHATPPLSL- -P.NLTVE.T ..PGA.VSA. R....F.S.Q

      360     370     380     390     400     410     420
ENTPD1  -YSQCAFNGI FLPPLQDFFG AFSAFYFVMK FLNLT--EK VSQEKVTEMM KKFCAQPWEE IKTSYAGVKE
ENTPD2  -F.R.S...V .Q..VA.N.V .....FYTVD .RTSMGLPV ATLQQLEAAA VNV.N.T.AQ LQARVP.-QR
ENTPD3  DQET.S.D.V YQ.KIK.P.V ..AG..YTAS A...SG---S F.LDTFNSST WN..S.N.SQ LPLLLPKFD.
ENTPD8  GQED...D.V YQ...R.Q.Y ...N..YTFH .....--RQ P-LST.NATI WE..QR..KL VEA..P.-QD

      430     440     450     460     470     480     490
ENTPD1  KYLSEYCFSG TYILSLLQG YHFTADSWEH IHFIGKIQGS DAGWTLGYML NLTNMIPAEQ PLSTPLSHST
ENTPD2  AR.AD..ACA MFVQQ..SR. .G.DERAFGG VI.QK.AADT AV..A.....L...DP ..GLRKGTDF
ENTPD3  V.ARS...A N..YH.FVN. .K..EET.PQ ...EKEVGN. SIA.S.....S...Q...S -LIR.PIEP
ENTPD8  RW.RD..A.. L...T..HE. .G.SEET.PS LE.RKQAG.V .I..... ..G...DA -AQWRAE.Y

      500     510     520     530
ENTPD1  YVFLMVLFSL VLFTVAIIGL LIFHKPSYFW KDMV-----
ENTPD2  SSWVVL.LLF ASALL.ALV. .LRQVH.AKL PSTI-----
ENTPD3  P..VGT.AFF TAAALLCLAF .AYLCSATRR .RHSEHAFDH AVDS
ENTPD8  G.WVAKVVFV .AL..VV.A ALVQ---L.. LQD-----

```

**FIGURA 4:** ALINHAMENTO DAS E-NTPDASES. Alinhamento entre as sequências humanas das quatro NTPDases localizadas na superfície da célula. Resíduos conservados são representados por “.”, *gap* ou falta de resíduo na espécie é representada por “-”, cores similares indicam hidrofobicidade similar.

As NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem dois domínios transmembrana, os quais as fixam firmemente a membrana, próximos a extremidade -NH<sub>2</sub> e -COOH terminal que causam a

interação entre os monômeros altamente glicosilados e lhes confere especificidade ao substrato (Grinthal e Guidotti, 2002; Carl *et al*, 1998). A NTPDase1 possui sítio de palmitoilação na sua extremidade N terminal o que contribui para sua localização membranar (Koziak *et al*, 2000) além disso possui sítios de fosforilação na sua cauda C terminal para suposta ação da proteína cinase C e para a proteína cinase dependente de AMPc o que sugere que ela pode ser regulada por fosforilação (Smith e Kirley, 1998).

Após as publicações na literatura das clonagens dos genes das diversas NTPDases, fez-se necessária uma reorganização da nomenclatura, e esta foi feita no Segundo Workshop Internacional sobre E-ATPases, intitulado: “Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases” ocorrido na Bélgica em 1999. Essa reorganização na nomenclatura, fez com que essas enzimas antes chamadas de ecto-apirases, ecto-ATPases, ecto-ATPDases e CD39, fossem chamadas coletivamente de NTPDases e numeradas de 1 a 8.

As NTPDases 1, 2, 3 e 8 podem ser parcialmente diferenciadas de acordo com a preferência pelo substrato. A taxa de hidrólise para nucleotídeos tri e difosfatados varia consideravelmente de acordo com a enzima (Robson *et al*, 2006). Enquanto a NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP em taxas equivalentes (1:1), as NTPDase 3 e 8 apresentam uma preferência um pouco maior por ATP sobre ADP: 3:1 e 2:1 respectivamente. A NTPDase2 apresenta uma maior preferência por ATP em comparação ao ADP (30:1). Como o produto formado é semelhante e em muitos casos mais de uma NTPDase é encontrada na superfície extracelular, a caracterização inicial baseava-se apenas nas diferentes taxas de hidrólise. A diferenciação completa só foi possível por métodos de biologia molecular como a clonagem e expressão em sistemas ortólogos. Foi o desenvolvimento dessa técnica que propiciou a descoberta da NTPDase8, já que esta possui razões de hidrólise ATP/ADP semelhante a NTPDase3 (Bigonnesse *et al*, 2004).

#### 1.1.5. NTPDASE2 (CD39L1)

A CD39L1 foi inicialmente clonada a partir de uma biblioteca de cDNA enriquecida para transcritos provenientes do cromossomo 9 e assim nomeada por apresentar grande homologia ao antígeno de ativação de células linfóides CD39, uma ecto-apirase conhecida de humanos e camundongos. O mesmo artigo científico que descreveu essa homologia em 1997, também mostrou que essa proteína de 472 aminoácidos é codificada por um gene que se localiza na região 9q34 e que seu transcrito possui 9 éxons (Chadwick e Frischauf, 1997).

Em 1999 foi clonada uma proteína contendo 495 aminoácidos idêntica àquela recentemente descrita como CD39L1, fato que sugeriu que há variantes de processamento para essa proteína. Além dessa importante descoberta os pesquisadores também demonstraram que essa variante de processamento possui atividade enzimática de hidrólise de ATP, diferente da proteína originalmente identificada com 23 aminoácidos a menos e caracterizaram essa variante da proteína quanto ao  $K_m$  e  $V_{max}$  para ATP e ADP (Mateo *et al*, 1999).

Foi durante o Segundo Workshop Internacional sobre E-ATPases, ocorrido na Bélgica em 1999 que se alterou o nome de CD39L1 para NTPDase2 (Zimmermann, 2001).

A NTPDase2 contém as 5 regiões conservadas das apirases (Apyrase Conserved Regions - ACRs) e 4 regiões conservadas (Conserved Region - CR), além de resíduos de lisina e arginina conservados na sua superfície. A enzima também contém seis sítios potenciais para glicosilação (Javed *et al*, 2007). Sua estrutura é bastante conservada entre as espécies (Figura 5).

Até o momento é conhecida por sua enorme capacidade de hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (ATP) e bem menor capacidade para nucleotídeos difosfatados (ADP), razão de hidrólise ATP/ADP de 30:1 (Robson *et al*, 2006).

Nos gliomas, verifica-se menor expressão dessa proteína com provável acúmulo de ATP no espaço peritumoral (Wink *et al*, 2003; Morrone *et al*, 2006). Esse ATP acumulado resulta em proliferação tumoral e neurotoxicidade do tecido nervoso. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a co-injeção de apirase solúvel (NTPDase1) em implantes de gliomas em ratos, diminui significativamente o crescimento e as características de malignidade. Indicando que o ATP tem um papel importante na manutenção do tumor (Morrone *et al*, 2006).

```

      10      20      30      40      50      60
Human  MAGKVRSLLP PLLLLAAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH TSMFIYKWP
Rat    ...LV..V. ....V.....Q.....V.....
Mouse  ...LV..V. ....V.....Q.....V.....

      70      80      90      100     110     120
Human  DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE RHAGTPLYLG
Rat    .....Q.. .....ND.. K.G...R.. ...R..RD ...S.....
Mouse  .....R.. .....ND.. R.G...E.. ...R...D ..Y.S.....

     130     140     150     160     170     180
Human  ATAGMRLNLN TNPEASTSVL MAVTHLTQY PFDFRGARIL SGQEEGVFGW VTANYLLENF
Rat    .....S..TAR.. E..Q..... .....D.....
Mouse  .....S..TAK.. E..Q..R..... .....D.....

     190     200     210     220     230     240
Human  IKYGVGRWF  RPRKGTLGAM DLGGASTQIT FETTSPAEDR ASEVQLHLYG QHYRVYTHSF
Rat    .....I..... .....S..P GN..H.R.....
Mouse  .....I..... .....S..P DN..H.R.....

     250     260     270     280     290     300
Human  LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP QNFNSSARVS
Rat    .....I.L..... I..R.....K.Y .....QE.. .....G... RA..G..I..
Mouse  .....I..R.....K.Y .....RE.. .....G... ..T...T..

     310     320     330     340     350     360
Human  LSGSSDPHLC RDLVSGLFSF SSCPFSRCSF NGVFQPPVAG NFVAFSAFFY TVDFLRITSMG
Rat    ..T.NAT.. ....R..NI .....Q..... ..I.....Y. ....T.V..
Mouse  ..T.NAA.. ....NI .....Q..... ..I.....Y. ....K.V..

     370     380     390     400     410     420
Human  LPVATLQQLE AAAMVNCNQT WAQLQARVPG QRARLADYCA GAMFVQQLS RYGFDERAF
Rat    ...G..K... E..TEIT... ..TE..... .KT..... V...IH.... ..H...S.
Mouse  ...G..K... D..TETT... ..E..... .QT..P... V...IH.... ..R...S.

     430     440     450     460     470     480
Human  GGVIPOKKAA DTAVGWALGY MLNLTNLIPA DPPGLRKGTD FSSWVLLLLL FASALLAALV
Rat    RE..V..... .....L.....H .....A.... TVLI.....
Mouse  R..V.E..... .....L.....H .....A.... TVLI.....

     490
Human  LLLRQVHSAK LPSTI
Rat    .....R... S.GAL
Mouse  .....R... S.GAL

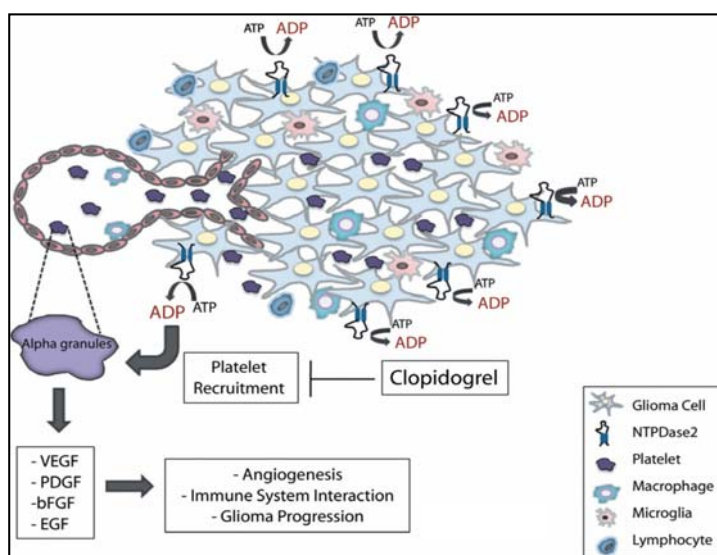
```

**FIGURA 5:** ALINHAMENTO DA NTPDASE2. Alinhamento entre as seqüências de proteína da NTPDase2 humana, de rato e de camundongo. Resíduos conservados são representados por ".", *gap* ou falta de resíduo na espécie é representada por "-", cores similares indicam hidrofobicidade similar.

### 1.1.6. RELAÇÃO ENTRE SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER

A importância do sistema purinérgico no desenvolvimento dos gliomas foi reforçada quando células de uma linhagem tumoral de glioma de rato (C6) com superexpressão da NTPDase2 foram implantadas no cérebro desses animais formando tumores maiores, mais invasivos, com maior recrutamento de micróglia e agregação plaquetária (Figura 6) (Braganhol *et al*, 2009). Essa observação demonstra que o ADP acumulado na região peritumoral tem papel desencadeante desses processos, já que a co-injeção de apirase, que degrada  $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$  não produz os mesmos efeitos (Morrone *et al*, 2006).

Além disso, a NTPDase2 também é expressa em outros tecidos normais e tumorais. Jhandier (Jhandier *et al*, 2005) utilizou co-culturas de colangiócitos (Mz-ChA-1 – células de colangiocarcinoma humano) e fibroblastos portais primários de fígado de rato, nas quais aumentou a expressão de NTPDase2 e observou diminuição da proliferação; nessas mesmas co-culturas, quando a NTPDase2 era silenciada por siRNA houve aumento da proliferação.



**FIGURA 6:** O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA NTPDASE2 GERA ACÚMULO DE ADP NO MICROAMBIENTE DO GLIOMA. Esse ADP induz migração endotelial e ativação plaquetária. Plaquetas ativas, por sua vez, liberam fatores que estimulam a resposta imune, a angiogênese e a proliferação tumoral. Retirado de Braganhol *et al*, 2009.

## 1.2. MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA TUMORAL

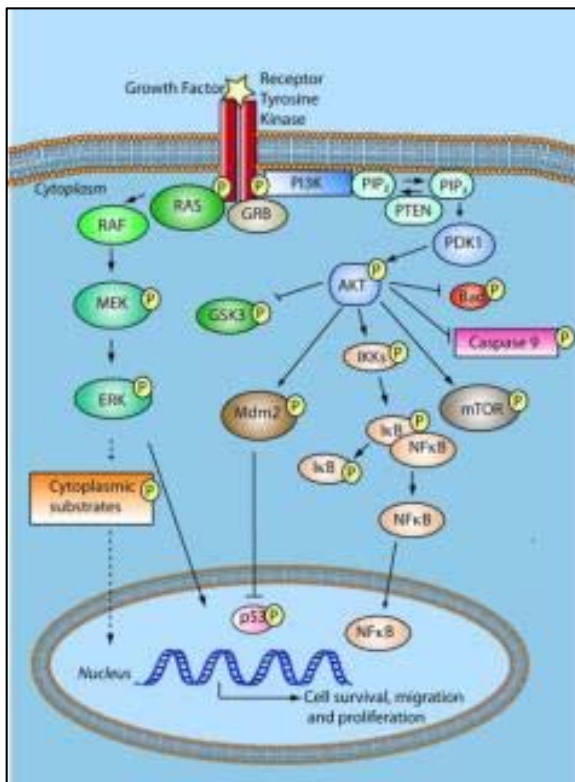
As células cancerosas possuem propriedades hereditárias diferentes das células normais, pois reproduzem-se sem obedecer aos limites normais da divisão devido à ausência de inibição por contato com outra célula e invadem e colonizam regiões diferentes do organismo.



O processo pelo qual as células normais se transformam em tumorais ainda não é bem esclarecido; sabe-se que requer vários passos de alterações celulares embora a ordem na qual ocorra permanece desconhecido. Segundo Hanahan existem seis marcas registradas do câncer: manutenção do sinal proliferativo, evasão à supressão do crescimento, resistência à morte, possibilidade de imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão e da metastátese (Hanahan e Weinberg, 2011). De uma forma ou de outra, as células tumorais que sobrevivem e formam metástases à distância precisam vencer essas seis barreiras.

### 1.2.1. DIMINUIÇÃO DA APOPTOSE E AUMENTO DA PROLIFERAÇÃO

As principais alterações, que podemos chamar até de marca registrada dos tumores é a alteração das vias de proliferação e de apoptose, pois juntas (apoptose diminuída e proliferação aumentada) são capazes de controlar a sobrevida tumoral. Essas vias, que em condições fisiológicas seriam ativadas pela ligação do fator de crescimento, em tumores encontra-se constitutivamente ativada (Figura 7), desencadeando o processo de proliferação desenfreado (Hanahan e Weinberg, 2011).



Essas vias são as mais estudadas e para elas busca-se desenvolver diversos medicamentos, embora acredita-se que agir apenas sobre uma delas não seja suficiente para obter efeitos terapêuticos duradouros (Krakstad e Chekenya, 2010).

**FIGURA 7:** SINALIZAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA. Receptores de tirosina quinase ligados ao ligante (condição fisiológica) ou constitutivamente ativados (condição patológica) upstream a via da RAS-MEK-ERK para mediar o crescimento celular e angiogênese, e upstream a via da PI3K/AKT para mediar a sobrevivência. AKT fosforila múltiplos substratos que levam a liberação de fatores de sobrevivência ou interfere na execução da apoptose através do bloqueio de Bad. Retirado de Krakstad e Chekenya, 2010.

### 1.2.2. AUMENTO DA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA E CÉLULA-MATRIZ

As células sentem, processam e respondem a estímulos mecânicos e biofísicos causados pela Matriz Extracelular (ECM) usando uma hierarquia interconectada de sistemas mecano-químico que inclui principalmente receptores de adesão, adesão focal intracelular e rearranjo do citoesqueleto.

Alterações nas interações mecânicas entre as células e o ambiente contribuem para a displasia tecidual associada à iniciação tumoral. Essas células transformadas podem expressar muitos perfis de filamentos intermediários e arquiteturas do citoesqueleto se comparadas às células normais. Quando presentes em substratos que suprimem o espalhamento e a proliferação de células normais, as células transformadas podem proliferar e mostrar uma força de tração além da normal, a qual pode romper a integridade das junções célula-célula, comprometer a polaridade tecidual, promover uma sobrevivência independente da ancoragem e aumentar a invasão (Kumar *et al*, 2009).

### 1.2.3. AUMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR

Algumas células individuais são capazes de se libertar do tumor e invadir o parênquima circundante, gerando força e mecanismos adicionais para regular seu comportamento. Esse fenômeno de migração foi melhor elucidado quando mostrou-se que os invadopódios são importantes nesse processo, pois provocam a digestão e invasão inicial da ECM. Sabe-se que a formação dessa estrutura é dependente de polimerização altamente localizada de actina e a coordenação da actina com múltiplas ligações em proteínas, incluindo cofilina, Arp2/3, e N-WASP (Yamaguchi *et al*, 2005).

As alterações na estrutura tumoral e os mecanismos durante a diminuição da adesão e a invasão são acompanhados por mudanças recíprocas na topologia da ECM (organizacional) e propriedade dos materiais (mecânica). A contração celular pode promover remodelamento da ECM, a qual pode criar feixes na matriz ou trajetórias de motilidade que podem facilitar a migração tridimensional (Kumar *et al*, 2009).

## 1.3. MECANISMOS DE ADESÃO

### 1.3.1. PROTEÍNAS DE ADESÃO CELULAR

A adesão célula-célula é mediada principalmente pela superfamília das caderinas (caderinas clássicas e não clássicas) que dependem do cálcio extracelular. Outras proteínas que estão envolvidas nesse processo são as integrinas (medeiam principalmente adesão

célula-matriz) e as selectinas, que também dependem desse íon e algumas vezes de magnésio. As moléculas independentes de  $\text{Ca}^{+2}$  em geral pertencem à superfamília das Imunoglobulinas (Tabela 1).

TABELA 1: PRINCIPAIS SUPERFAMÍLIAS DE MOLÉCULAS RESPONSÁVEIS PELA ADESÃO CELULAR. Adaptada de Alberts e cols, Molecular and Celular Biology of the Cell, 2010 e Hynes, 1999.

Superfamília de proteínas	Estrutura	Função
Caderinas	Todas possuem porção extracelular contendo múltiplas cópias dos motivos dos domínios das caderinas; a porção intracelular varia enormemente (que reflete a capacidade de ligação a diversos ligantes incluindo moléculas sinalizadoras bem como componentes que a ancoram ao citoesqueleto)	Principal molécula de ligação homofílica célula-célula. A ligação específica com a célula vizinha controla a organização seletiva das células (segregação dos tecidos)
Integrinas	Heterodímeros transmembrana que se ligam ao citoesqueleto formados por duas subunidades glicoprotéicas ( $\alpha$ e $\beta$ ) associadas de forma não covalente com pequena cauda $-\text{COOH}$ intracelular e grande domínio $-\text{NH}_2$ extracelular (responsável pela ligação a aminoácidos específicos da ECM)	Principal molécula de adesão célula-matriz, capaz de transmitir sinais do meio extracelular através da membrana
Selectinas	São proteínas transmembrana com domínio de lectina muito conservado que se liga a oligossacarídeos específicos em outra célula. Liga-se ao citoesqueleto de actina através de proteínas de ancoramento pouco conhecidas	Em vertebrados, sua principal função é na resposta inflamatória e na coordenação do tráfego dos leucócitos (controlam a ligação às células endoteliais permitindo a diapedese)
Imunoglobulinas	Contém um ou mais domínios extracelulares semelhantes às imunoglobulinas (Ig), característicos dos anticorpos. Apresentam um domínio $-\text{COOH}$ intracelular e a extremidade $-\text{NH}_2$ extracelular. Entre essas extremidades há domínios semelhantes a Ig e domínios de fibronectina tipo III (que contém sítio ATPásico)	Fora do sistema imunológico possuem várias funções, entre elas de moléculas de adesão. São as principais moléculas reconhecidas pelas integrinas dos leucócitos; também podem mediar adesões homofílicas (Ig ligada a Ig). Única classe que promove a adesão de forma independente de cálcio

Embora existam outras moléculas de adesão célula-célula, cabe ressaltar que a adesão feita por caderinas é a mais forte e mais importante para a célula e que permite a



organização dos organismos multicelulares como tal. Assim sendo, quase todas as células dos vertebrados e de outros animais, expressam uma ou mais proteínas dessa família. Essas proteínas se ligam as cateninas, que por sua vez se ligam à actina do citoesqueleto e a família Rho das GTPases. As moléculas de adesão (CAMs) entre células podem exercer sua função de três formas (Figura 8):

- I. Ligação homofílicas na qual uma molécula conecta-se a outra idêntica na célula vizinha;
- II. Ligação heterofílicas na qual a molécula conecta-se a moléculas diferentes na célula vizinha;
- III. Ligação dependente de ligante onde as proteínas de ligação são unidas por ligantes multivalentes (Alberts e cols, *Molecular and Cellular Biology of the Cell*, 2010).

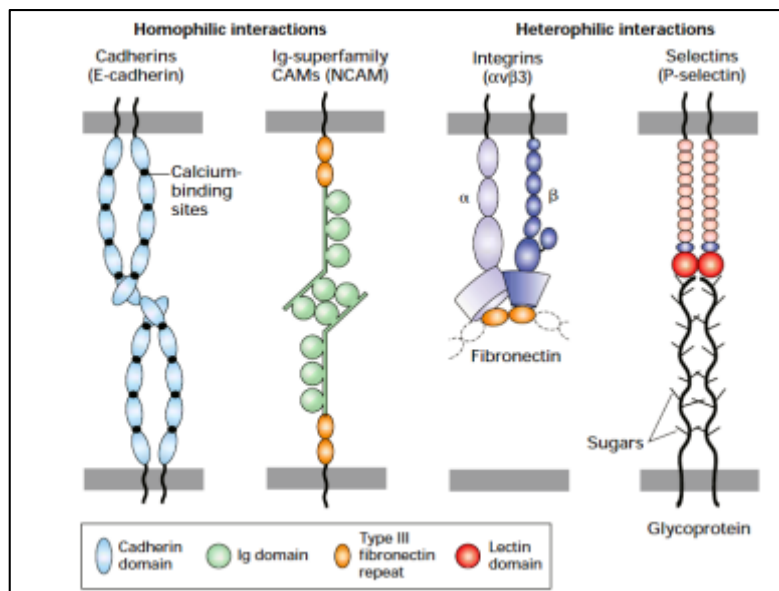


FIGURA 8: SUPERFAMÍLIAS DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA E CÉLULA-MATRIZ. Agrupadas de acordo com o tipo de ligação que realizam. Retirado de Lodish e cols, *Molecular Cell Biology*, 2003.

A adesão entre células tem um papel crucial em processos biológicos complexos que incluem crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Alterações em caderinas epiteliais (E-Caderinas) foram relatadas estando associadas com aumento da motilidade, invasão e metástases em carcinomas (Perego *et al*, 2002).

Moléculas de adesão celular (CAMs) possuem um papel central no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso sob condições normais. A sinalização intracelular induzida por essas moléculas é desencadeada pela via homofílica e heterofílica (Viollet e Doherty, 1997).

Outra proteína que participa da adesão celular é a L1-CAM. Ela participa da adesão homofílica e heterofílica com outras CAMs (NCAM, TAG-1/axonina-1, contactina/F3/F11), proteoglicanos, moléculas associadas à matriz extracelular (laminina), neutrofilina-1 e receptor tirosina fosfatase, FGFR (fibroblast growth factor receptors) e integrinas. No espaço intracelular interage com proteínas associadas ao citoesqueleto, incluindo anquirina, a qual se liga a F-actina via espectrina do citoesqueleto (Kiryushko, 2007). É importante para vários processos de desenvolvimento, incluindo crescimento do neurito, mielinização e migração de células neuronais precursoras. Cheng e colaboradores, em 2005, demonstraram que essa proteína está ligada a RanBPM (*Ran-binding protein M*).

RanBPM foi originalmente clonada como uma proteína ligante de Ran localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma, é bem conservada e amplamente expressa em várias linhagens e tecidos. Mais tarde foi demonstrada uma expressão ectópica interagindo com c-Met (um receptor tirosina quinase) pelo fator de crescimento de hepatócitos para regular a ativação de Ras. Também interagem com membros da família das integrinas (Denti *et al*, 2004). Em 2006, Wu e colaboradores demonstraram por imunoprecipitação que essa proteína também está ligada ao domínio intracitoplasmático N-terminal da NTPDase1, mostrando que essa enzima pode estar presente nos complexos de adesão formados por RanBPM. Além disso, que há uma modulação da atividade dessa NTPDase pela RanBPM (Wu *et al*, 2006).

### 1.3.2. MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A MEC é uma complexa rede de macromoléculas cuja importância vem aumentando nas últimas décadas (Lin e Bissell, 1993). É sobre esse substrato, de ocorrência natural *in vivo*, que as células migram, proliferam e se diferenciam. Além disso, a matriz funciona como um adesivo biológico responsável pela manutenção da citoarquitetura normal dos diferentes tecidos e definição da relação espacial entre os diferentes tipos celulares (Rutka *et al*, 1988).

Podemos dividir os componentes da matriz da seguinte maneira (Tabela 2):

- I) Moléculas adesivas e não adesivas: fibronectina, vitronectina, laminina e tenascina;
- II) Moléculas estruturais: colágeno e elastina;
- III) Moléculas de proteoglicanos (Lin e Bissell, 1993).

TABELA 2: ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR. Adaptada de Alberts e cols, Molecular and Celular Biology of the Cell, 2010.

Componentes da Matriz	Observações
Glicosaminoglicanas (GAGs)	<p><b>Estrutura:</b> Cadeias polissacarídicas lineares com carga negativa compostas de unidades repetidas de dissacarídeos (um açúcar aminado, normalmente sulfatado + segundo açúcar, normalmente um ácido urônico).</p> <p><b>Principais funções:</b> Suportam grandes forças de compressão devido à alta densidade de cargas osmoticamente ativas capazes de formar géis por absorver água.</p>
Proteoglicanas	<p><b>Estrutura:</b> Glicosaminoglicano ligado covalentemente a uma proteína.</p> <p><b>Principais funções:</b> Servem como filtro seletivo que regula o tráfego de moléculas e células, atuam na sinalização química entre as células e regulam atividades de outras proteínas secretadas.</p>
Colágenos	<p><b>Estrutura:</b> Proteína fibrosa longa e rígida de fita dupla helicoidal formada por três cadeias <math>\alpha</math> enroladas.</p> <p><b>Principais funções:</b> Responsável pela força tensora de várias estruturas (por exemplo: ossos, pele, tendões, ligamentos, cartilagem, órgãos internos, etc) que diferem entre si pela composição e quantidade de cada tipo de colágeno.</p>
Elastina	<p><b>Estrutura:</b> Composta por dois tipos de segmentos: hidrofóbicos (responsáveis pela elasticidade) e de hélice <math>\alpha</math> ricos em lisina e alanina (responsáveis pelas ligações cruzadas com outras moléculas).</p> <p><b>Principais funções:</b> Fornece a força elástica necessária a tecidos como pele, vasos sanguíneos e pulmão. É a principal componente da aorta.</p>
Fibronectina	<p><b>Estrutura:</b> Glicoproteína formada por dímeros de duas grandes subunidades ligadas por ligações dissulfeto.</p> <p><b>Principais funções:</b> Importante para interações célula-matriz. O módulo denominado repetição de fibronectina tipo III liga-se à integrina da superfície das células.</p>
Laminina	<p><b>Estrutura:</b> Complexo grande e flexível, formado por três cadeias de polipeptídeos na forma de uma cruz assimétrica unida através de pontes de dissulfeto.</p> <p>Encontrada exclusivamente na lâmina basal.</p> <p><b>Principais funções:</b> Envolvida em várias atividades biológicas, tais como: migração, expansão neurítica, diferenciação, adesão celular, metástase e apoptose.</p>

As classes de macromoléculas que constituem a matriz em diferentes tecidos animais são de certa forma similares, porém são as pequenas variações nas quantidades relativas e o modo de organização que dão origem a diversidade de materiais por elas formados. Por exemplo: a matriz pode tornar-se calcificada em estruturas rígidas como ossos e dentes, formar a estrutura cristalina da córnea ou adotar a forma elástica dos tendões (Alberts e cols, Molecular and Celular Biology of the Cell, 2010).

As interações entre células e matrizes extracelulares são reconhecidas como eventos importantes que influenciam diversos processos biológicos, como o desenvolvimento de órgãos, o crescimento normal, a expressão gênica e as funções dos tecidos, e até mesmo o desenvolvimento e manutenção das neoplasias (Rutka *et al*, 1988; Lin e Bissell, 1993; Gary e Hockfield, 2000).

#### 1.4. ADESÃO E O SISTEMA PURINÉRGICO

A busca do envolvimento do sistema purinérgico com a adesão celular é anterior a reestruturação da nomenclatura e o conhecimento da sequência de cada enzima. Isso dificulta o entendimento de alguns artigos já que na época em que foram escritos acreditava-se que existiam menos ectonucleotidasas do que se conhece hoje, após o advento da clonagem de sequências e correta denominação. Artigos antigos relatam a existência de ATPases com função de adesão, porém o discernimento de qual das ectonucleotidasas é a responsável por essa função não foi possível na época, causando dúvida na leitura e interpretação.

Um dos artigos pioneiros que envolvem atividade ATPásica e adesão celular foi publicado por Aurivillius e colaboradores em 1990, demonstrando que uma imunoglobulina de adesão extracelular também possuía um sítio de hidrólise de ATP. O motivo pelo qual moléculas de adesão possuam essa atividade enzimática ainda é desconhecido, porém esse mesmo artigo sugere e cita outro artigo (Jones, 1966) no qual a adição exógena de ATP inibe a adesão de células de fígado de rato, indicando que esse nucleotídeo talvez possa regular a adesão celular.

Alguns anos depois Dzhandzhugazyan e Bock (1993) publicaram um artigo demonstrando atividade de adesão em uma  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. No ano seguinte Stout e colaboradores publicaram um artigo mostrando que essa enzima não era capaz de atuar como molécula de adesão extracelular. Finalmente em 1997 Dzhandzhugazyan e Bock

demonstraram que a então descrita  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase se tratava da hoje conhecida molécula de adesão neuronal (NCAM) e que ela possui atividade ATPásica.

Poucos trabalhos na literatura investigaram funções de adesão entre as ectonucleotidases. Hoje é conhecido que a NTPDase1 através da interação com RanBPM (Wu *et al*, 2006) e principalmente a Ecto-5'-Nucleotidase exercem funções modulando a adesão extracelular (Wang *et al*, 2008; Cappelari *et al*, 2012).

Até o momento, a Ecto-5'-nucleotidase é a enzima do sistema purinérgico com envolvimento melhor elucidado na invasão, migração e adesão celular em câncer de mama e melanoma (Wang *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2007 a e b; Sadej e Skladanowski, 2012); sendo que o seu silenciamento é capaz de inibir o crescimento celular e invasão (Zhi *et al*, 2007). Há sugestões de que também possa ter atividade pró-metastática e servir como marcador diagnóstico e até mesmo como alvo terapêutico (Supernat *et al*, 2012; Wu *et al*, 2012). Um estudo recente demonstrou que, em melanoma, a participação dessa proteína na migração e na invasão é feita de forma dupla. Enquanto a atividade enzimática é importante para a invasão, para a adesão e migração sobre tenascina C a simples presença da proteína, sem atividade, é suficiente para ativação de FAK e conseqüente aumento da adesão, sugerindo que também possa realizar um papel de receptor (Sadej e Skladanowski, 2012).

Até o momento nenhum estudo foi encontrado relacionando as outras NTPDases com funções na adesão e migração celular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Investigar o papel da NTPDase2 na adesão, migração e proliferação celular *in vitro*.

### 2.2. ESPECÍFICOS

2.2.1. Analisar *in vitro*, o papel da NTPDase2 na adesão célula-matriz;

2.2.2. Analisar *in vitro*, o papel da NTPDase2 na adesão célula-célula;

2.2.3. Avaliar a capacidade de migração celular em células com superexpressão da NTPDase2;

2.2.4. Quantificar a taxa de proliferação de células com superexpressão da NTPDase2.

### 3. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

O manuscrito a seguir será submetido para a revista "Purinergic Signalling".

As figuras principais, bem como as suplementares aparecem ao longo do texto e não ao final, como forma de facilitar a leitura. A respectiva legenda aparece imediatamente abaixo de cada figura.

#### **Role of NTPDase2 in adhesion**

Franciele Cristina Kipper <sup>1</sup>, Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku <sup>2</sup>, Darlan Coterno Minussi <sup>3</sup>, Jose Eduardo Vargas <sup>1</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini <sup>4</sup>, Simon C. Robson <sup>5</sup>, Guido Lenz <sup>1\*</sup>, Márcia Rosângela Wink <sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Biophysics Department and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre;* <sup>2</sup> *Federal University of Pampas (UNIPAMPA), Uruguaiana,* <sup>3</sup> *Cellular Biology laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA),* <sup>4</sup> *Nucleotides Hydrolysis laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS,) Brazil,* <sup>5</sup> *Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA.*

\*Corresponding author: Departamento de Biofísica, IB, UFRGS, Av Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431, sala 107, Campus do Vale, CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: 55.51.33087620 Email: lenz@ufrgs.br

This article contains 3 Figures.

Financial Support:

Contract grant sponsor: FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul); Contract grant number: 0613760 and Pronex-2009.

Contract grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Contract grant number: 420036/2005-9 and 485444/2007-0.

FCK is recipient of CAPES fellowships.

DCM, AMOB, MRW and GL are recipient of CNPq fellowships.

## ABSTRACT (280 words)

NTPDase2 is an ectonucleotidase anchored in the plasma membrane through two transmembrane domains, with the catalytic site facing the extracellular environment. Its main function is the hydrolysis of nucleotide triphosphates turning them into diphosphate nucleotides plus inorganic phosphate. As its function is to remove the extracellular ATP, its absence causes the accumulation of nucleotide. It is old in literature the relation between ATPase and adhesion function. For example it is well known the ATPase site in Immunoglobulin adhesion proteins, less is know about NTPDases and adhesion. Some studies proved interaction between NTPDase1 and Ecto-5'-nucleotidase in this cell process and other like proliferation and migration *in vitro*. However, functions of NTPDase2 in these process have not been studied *in vitro*. In this work, NTPDase2 was overexpressed into Hek293, Cos-7 and HeLa cell lines in order to study its involvement in biological processes as adhesion, migration and cell proliferation, *in vitro*. Our studies show that overexpression of NTPDase2 do not alter the proliferation and do not modulate cell migration. However, its expression decreases in general the adhesion of transduced Hek293 cell line on extracellular matrices. Analyses of the images by a confocal microscopy, suggest that the enzyme do not concentrate at the cell-cell contact surface. However when the cells are over collagen type I and fibronectin there is a concentration in free membrane region. Measurment of the time to fluorescence recovery after photobleaching indicates that in these matrices there is an increased protein fluidity in free membrane regions. Moreover, our results in colocalization assay indicates that NTPDase2 is not located in focal complexes or focal adhesion. We can conclude that NTPDase2 do not physically modulate cell-cell or cell-matrix adhesion.

*Keywords: NTPDase2. Adhesion. Proliferation. Migration. FRAP.*

### List of abbreviations

ACR = Apyrase Conserved Domain	FM = free membrane region
CCC = cell-cell contact	FRAP = Fluorescence Recovery After
CR = Conserved Region	Photobleaching



## 1. Introduction

The development of the study of purinergic receptors lead to the conclusion that the biological function associated with extracellular nucleotide hydrolysis is to transform P2 to P1 receptor agonists. NTPDases are nucleotide-specific and they are able to hydrolyze nucleoside triphosphates and diphosphates resulting in nucleoside monophosphates and inorganic phosphate as hydrolysis product (Zimmermann *et al*, 2012). The NTPDase family includes four transmembrane members with the catalytic domain exposed towards the extracellular millieu named NTPDase 1, 2, 3 and 8 that are broad distributed in tissues and cell types with variation in expression and ATP/ADP preference from each one. NTPDase2 was first cloned in the end of 90s, as the others members of family has five extracellular apyrase conserved regions (ACR) and four conserved regions (CR) but differ from others due the high preference for ATP in comparison to ADP (Knowles, 2011).

Despite the growing amount of knowledge in the field, since the first apyrase were purified, so far their biological function is not completely understood. One proposal was the link between the enzymes able to hydrolyze ATP and adhesion molecules. The rat liver ATPase was first described around 1990s, after some time it was shown that their sequence was identical to Cell-CAM 105, an adhesion protein (Aurivillius *et al*, 1990). Identification and questions about cell adhesion proteins and ATPases follow during all decade: Dzhandzhugazyan and collaborators showed a  $\text{Ca}^{+2}\text{-Mg}^{+2}\text{-ATPase}$  activity in NCAM in 1993, which was questioned by Stout in the following year (Stout and Kirley, 1994), but later dismissed. Near this time, another author (Cunningham *et al*, 1993) published an ATPase activity in T-cadherin what was proved to be an artifact in 1994 by Stout (Stout *et al*, 1994). Until now, a dual role is well known to immunoglobulins which are proteins involved in homophilic and heterophilic adhesion and have an ATPase site in structure (Wai Wong *et al*, 2012). Little is known about the role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) and even less is known for NTPDases activity in adhesion. Some recent studies show involvement of CD73 in adhesion and metastasis formation (Zhi *et al*, 2007 and Zhou *et al*, 2007a and 2007b) and others shown a role in cell-matrix adhesion (Cappellari *et al*, 2012 and Sadej and

Skladanowski, 2012). NTPDase1 may affect cell adhesion indirectly, through the binding with RanBPM (Wu *et al*, 2006) that in turn interacts with adhesion molecules as integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) (Denti *et al*, 2004). So far, no other study could be found relating NTPDases with adhesion function in Pubmed. In order to address this question we constructed a chimera of NTPDase2 linked with EYFP and performed assays of cell-cell and cell-matrix adhesion as well as the analysis of other cell process where the NTPDase2 could be involved as cell proliferation and migration.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Cell lines culture**

The Hek293 (Human Embryonic Kidney) and Cos-7 (African green monkey fibroblast) cell lines (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) were grown in culture flasks and maintained in DMEM high glucose (Gibco BRL) containing 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 250 µg amphotericin B, and 50000 U penicillin/50000µg streptomycin (all from Gibco BRL) and supplemented with 10% (v/v) FBS (Gibco BRL). Cells were kept at a temperature of 37°C, humidity of 95% and 5% CO<sub>2</sub> in air.

### **2.2. Primary culture**

Primary astrocyte cultures were prepared as previously described (Wink *et al*, 2003). Briefly, the hippocampus, cortex and cerebellum of newborn Wistar rats (1–2 days old) were removed, and dissociated mechanically. The cells derived were plated at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in DMEM high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum onto 24 multiwell plates pre-treated with poly-D-lysine. Cultures were maintained for 21–28 days *in vitro* and then used to perform the cell-cell adhesion experiments.

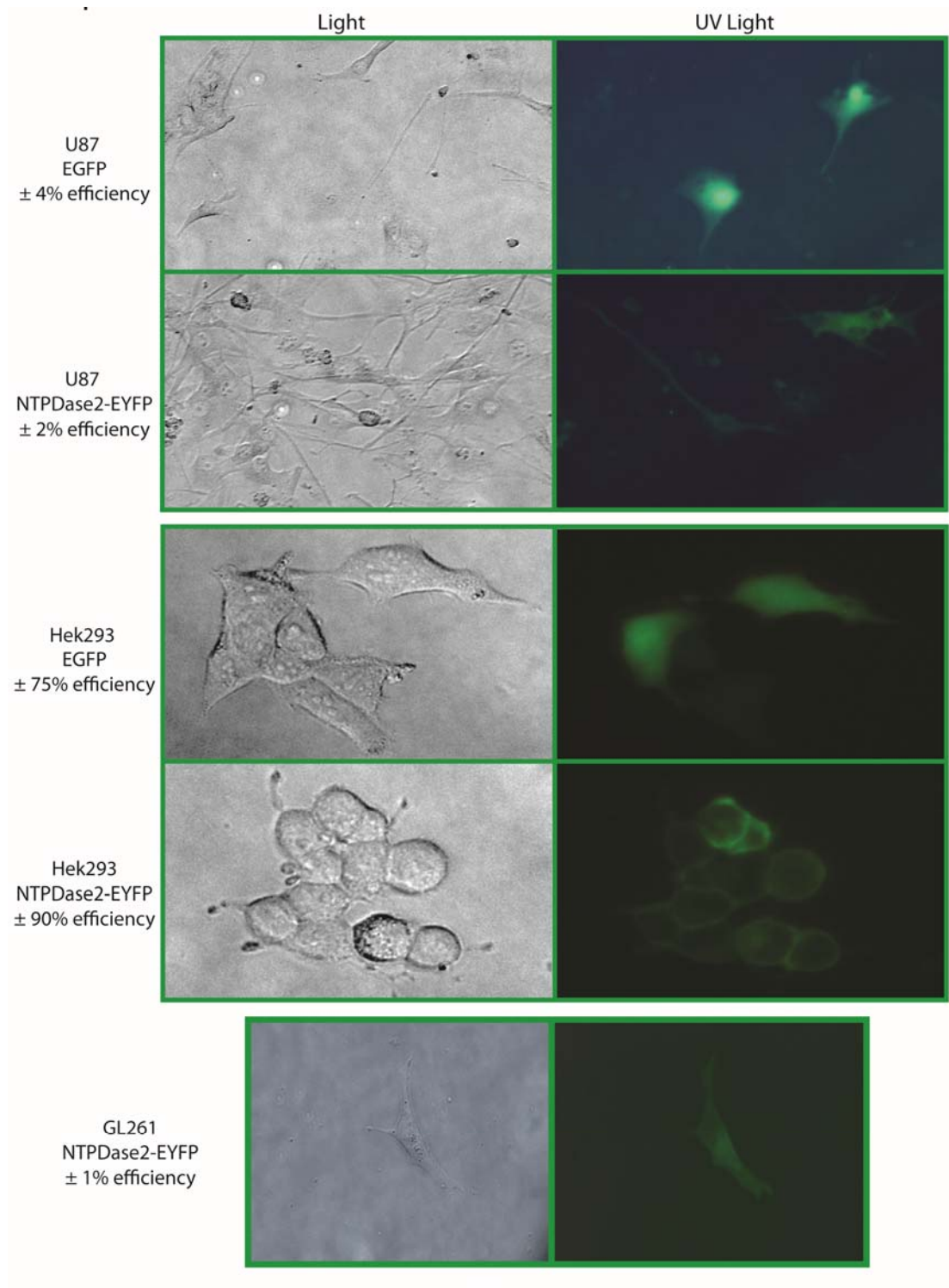
### **2.3. DNA construction**

Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)-NTPDase2 was constructed by inserting NTPDase2 from pGW1-hCD39L1 using EcoRI into the PBS-SKII plasmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA), sequencing it, and then inserting it into pEYFP-C1 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) using *Bam*HI and

*Sa*I restriction sites. The control fluorescence used was EGFP from Invitrogen. Constructions are shown in Figure 1a.

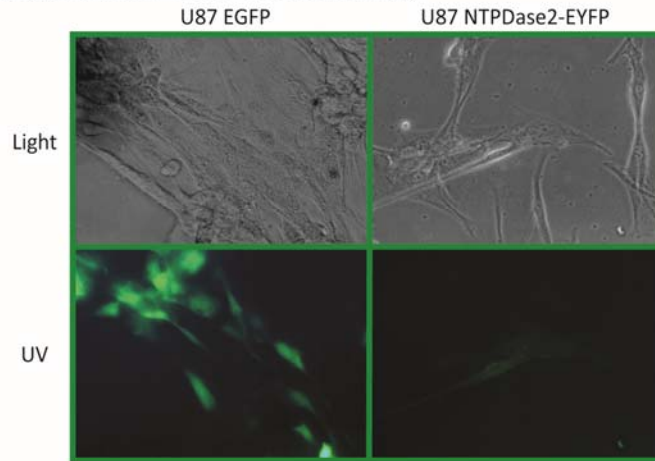
#### **2.4. Stable transduction**

Lentiviruses were produced by co-transfecting the EYFP-NTPDase2 plasmid with the helper plasmids pRSVREV, pVSV-G and pMDLgRRE (Dull *et al*, 1998) in sub-confluent Hek293 cells with Superfect Reagent (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Three days after transfection, supernatant was collected every day during one week, filtered through a 0.45 µm membrane and used immediately or stored at -80°C. One mL of medium containing virus was added to target cells, also at sub-confluent stage ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) in 24-well plates, together with 8 µg/mL of polybrene overnight. Cells were allowed 48 hours to express the fluorescence protein. After this time fluorescent colonies were isolated. The efficiency of transduction was confirmed by fluorescence and flow cytometry. The functionality of the plasmid encoding the EGFP or EYFP-NTPDase2 sequences was confirmed by evaluating the ATPase activity in Cos-7 and Hek293-transfected cells, as described below. We also transduced U87 and GL261 cell lines, and the chimera was also localized at the cell membrane, although some intracellular fluorescence was also observed (Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2).

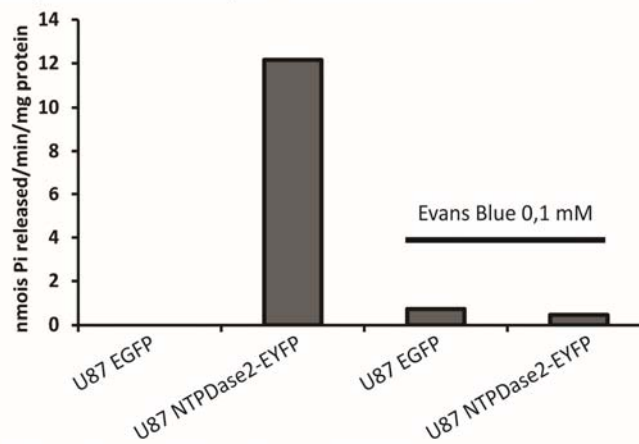


**SUPPLEMENTARY FIGURE 1: NTPDase2-EYFP or EGFP transduced cell lines.** Glioma cell line (U87 and GL261) present a diffuse fluorescence signal when compared to Hek293 transduced with the same lentiviral construct. In the other hand, Hek293 present a high % of cells GFP+.

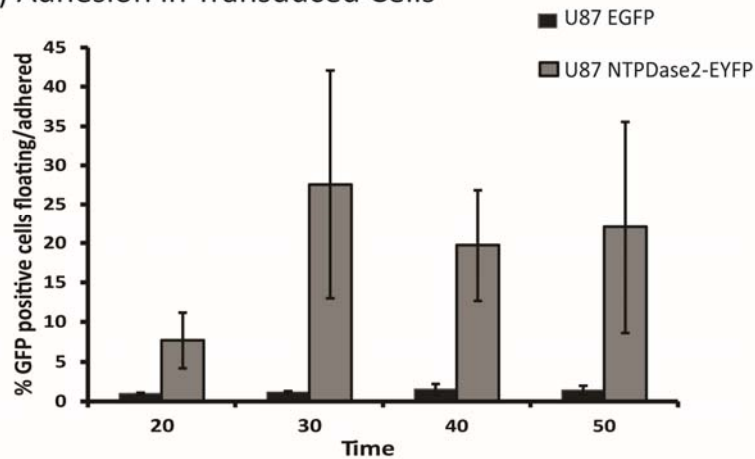
### A) Transduced Cells Morphology



### B) Enzymatic Activity in Transduced Cells



### C) Adhesion in Transduced Cells



**SUPPLEMENTARY FIGURE 2: U87 NTPDase2-EYFP and EGFP transduced cell line.** Glioma cell line presents small transduction efficiency but this was enough to increase ATP hydrolysis activity and modificate adhesion. A) Transduced cell line morphology and GFP expression. B) Enzymatic activity increase in NTPDase2 overexpression cells and this enzymatic activity can be blocked with Evans Blue 0.1 mM. C) NTPDase2 overexpression can modulate the adhesion rate, enriching the % of fluorescent cells in non-adhered fraction.

## **2.5. Transient transfection**

Cos-7 and HeLa cells were seeded in 12 or 24-multiwell plates and grown in DMEM with 10% FBS. Cells at 80% confluence were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) in accordance to the manufacturer's instructions with 1 µg/well of pEYFP-NTPDase2 (Cos-7 EYFP-NTPDase2 and HeLa EYFP-NTPDase2) or pEGFP vector (Cos-7 EGFP and HeLa EGFP). The transfected cells were used in ATPase activity and/or migration assays.

## **2.6. Flow cytometry**

For quantification of EYFP-NTPDase2 positive cells, the cells monolayer were enzymatically dissociated with 0.1% trypsin for 5 minutes, this reaction was stopped with high glucose medium containing 10% SFB. The live cells in suspension were then analyzed by flow cytometry in a PCA-96 System machine (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

## **2.7. ATPase activity assay**

Two days after transfection or after biosafety test in transduced cells, the ATPase activity was determined in Cos-7 or Hek293 cells respectively, as described previously (Wink *et al*, 2006) in incubation medium (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES [pH 7.4], and 3 mM of the nucleotide ATP ) incubated at 37°C. The release of inorganic phosphate (Pi) and the protein concentration were measured by the Malachite Green (Chan *et al*, 1986) and Coomassie Blue methods (Bradford, 1976) respectively. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

## **2.8. NTPDase2 inhibition**

In order to test effects of P2 receptors antagonists described as NTPDase inhibitors (Munkonda *et al*, 2007), cells were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of suramin (0.1 and 0.3 mM), Reactive Blue 2 (0.1 mM) and Evans Blue (0.1 mM). Subsequently, cells were incubated for 30 min in the incubation medium with 3 mM of ATP as described above. All assays were performed in triplicate. Specific activity was expressed as nmol Pi

released/min/mg of protein. The RB2 (0.1 mM) inhibitor was tested also on adhesion assay.

## **2.9. Determination of population doublings**

Hek293 wild type or Hek293 EYFP-NTPDase2 cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/ well in DMEM with 10% FBS in 24-multiwell plates and allowed to grow for increasing amounts of time. The cell number was assessed in the passages counting cells with a hemocytometer at days 3, 6 or 10. In each passage the initial number was replated. Population doublings (PD) were determined according to the formula  $PD = [\log N(t) - \log(N(t_0))]/\log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells per well at time of passage, and  $N(t_0)$  is the number of cells seeded at the previous passage. The sum of PDs was then plotted against time of culture (Zamin *et al*, 2009).

## **2.10. Scratch wound assay**

Cells were cultured in 12-multiwell plates and transfected as described above. After two days, when the transfection fluorescence appeared and the cultures were subconfluent, the monolayers were scratched using a fine micropipette tip. The monolayer was washed with PBS followed by fresh medium addition and the images were taken immediately, and after 6, 24 and 48 hours (Liang *et al*, 2007). The scratched areas were measured using the software ImageJ®. The healing was plotted versus time after scratch.

## **2.11. Adhesion**

### **2.11.1. Cell matrix adhesion**

In order to perform matrix adhesion assays, 96-multiwell plates were precoated overnight at 4°C with different extracellular matrices: poly-D-lysine (100 µg/mL), collagen type I (20 µg/mL), collagen type IV (20 µg/mL), laminin (20 µg/mL) and fibronectin (20 µg/mL). The plates were washed twice and  $1 \times 10^5$  cells/well were allow to adhere in culture medium with 10% FBS for 30 min. After this time, non-adherent cells were removed by washing three times with PBS. Adherent cells were fixed with formaldehyde 4%, stained with 0.5% violet crystal

and eluted in 100  $\mu$ L 10% acetic acid (v/v) for OD measurement at 570 nm in microplater reader (adapted from Wang *et al*, 2012).

#### 2.11.2. Cell-cell adhesion

The cell-cell adhesion experiments were done by plating for 15 minutes,  $1.5 \times 10^5$  Hek293 transduced with NTPDase2-EYFP or EGFP over the monolayer of rat astrocytes obtained from primary cultures of cortex, cerebellum and hippocampus as described above. After this time the non-adherent cells were washed out and counted in hemocytometer (modified from Kaczarek *et al*, 1999).

### 2.12. Immunofluorescent staining

For immunofluorescence staining, Hek293 transduced with NTPDase2-EYFP were cultured until semi-confluence in glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (Wink *et al*, 2006). Cells were pretreated with blocking solution (3% BSA in PBS) for 10 min and then incubated with primary anti-mouse antibodies from BD Bioscience: FAK (1:500), p130<sup>cas</sup> (1:500) and Paxillin (1:750) in blocking solution for 6 h. After washing, the Alexa Fluor 555 red-linked secondary goat anti-mouse (1:1000) antibodies (Invitrogen Molecular Probes) in blocking solution were used for 2 h. DNA was stained with DAPI (0.3  $\mu$ M) for 5 min and coverslips were washed with PBS and mounted using Fluoromount G (EMS, Washington, PA, USA). Fluorescence was analyzed under the Zeiss Axiovert 100 M microscope.

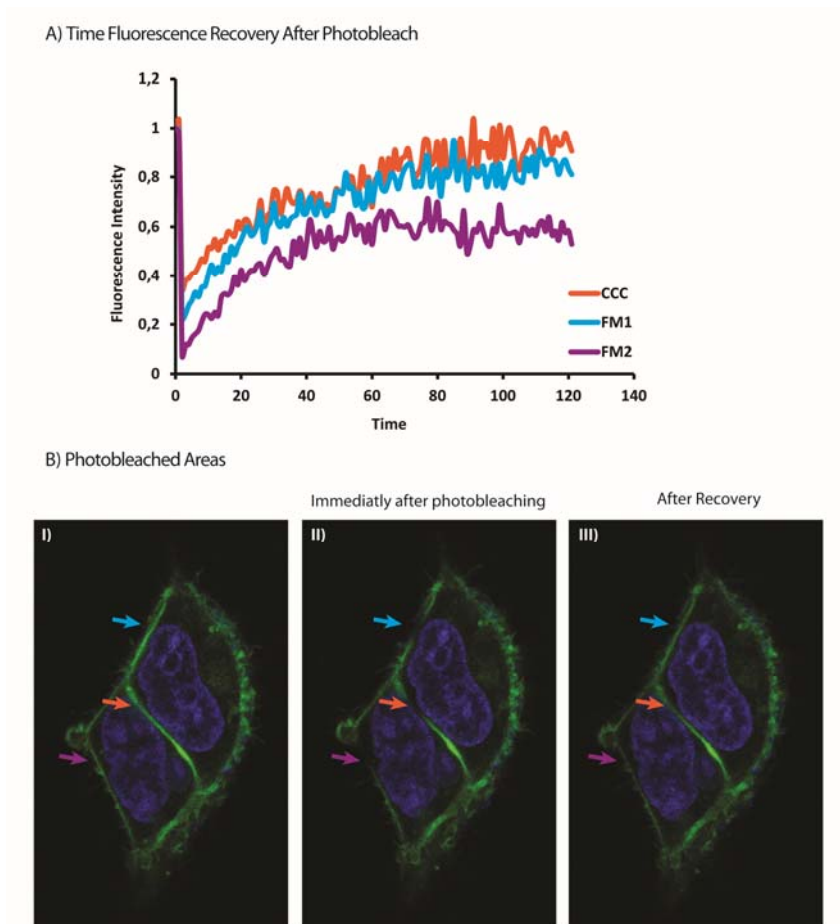
### 2.13. Fluorescence intensity

In order to compare the NTPDase2-EYFP concentration in cell-cell contacts with free membranes regions, the cells were plated over a glass coverslip in the bottom of a 24-multiwell plate and grown until semi-confluence. The coverslips with monolayers of live cells were mounted over glass slide and sealed with nail polish, without fixing. Cells were immediately observed in confocal microscopy (Olympus FluoView™ 1000) to quantify the fluorescence intensity accumulated in cell-cell contacts or free membrane (Figure 3a). The pictures were measured using the software ImageJ.



## 2.14. FRAP

Fluorescence recovery after photobleaching was performed in a confocal microscopy (Olympus FluoView™ 1000) using the slides with living cells as described above. The conditions of laser intensity and time for photobleach were standardized to abolish almost 80% of fluorescence. After two scans at laser low intensity, a circle in different regions of cell-cell contacts or free membrane were bleached for 2-8 s using a 488 and 405 nm laser at high intensity. After, the bleached areas were scanned for 2 min using laser low intensity (Supplementary Figure 3). The regions of interest (ROIs) in the images obtained were measured using the software ImageJ. To calculate the relation (R) between the time to half recovery in the cell-cell contacts compared to free membrane we use the formula:  $R = (F_e - F_0)/(F_i - F_0)$ , where  $F_e$  is the fluorescence at the end of the experiment,  $F_i$  is the fluorescence at the beginning and  $F_0$  is the fluorescence just after bleaching (Reits and Neefjes, 2001).

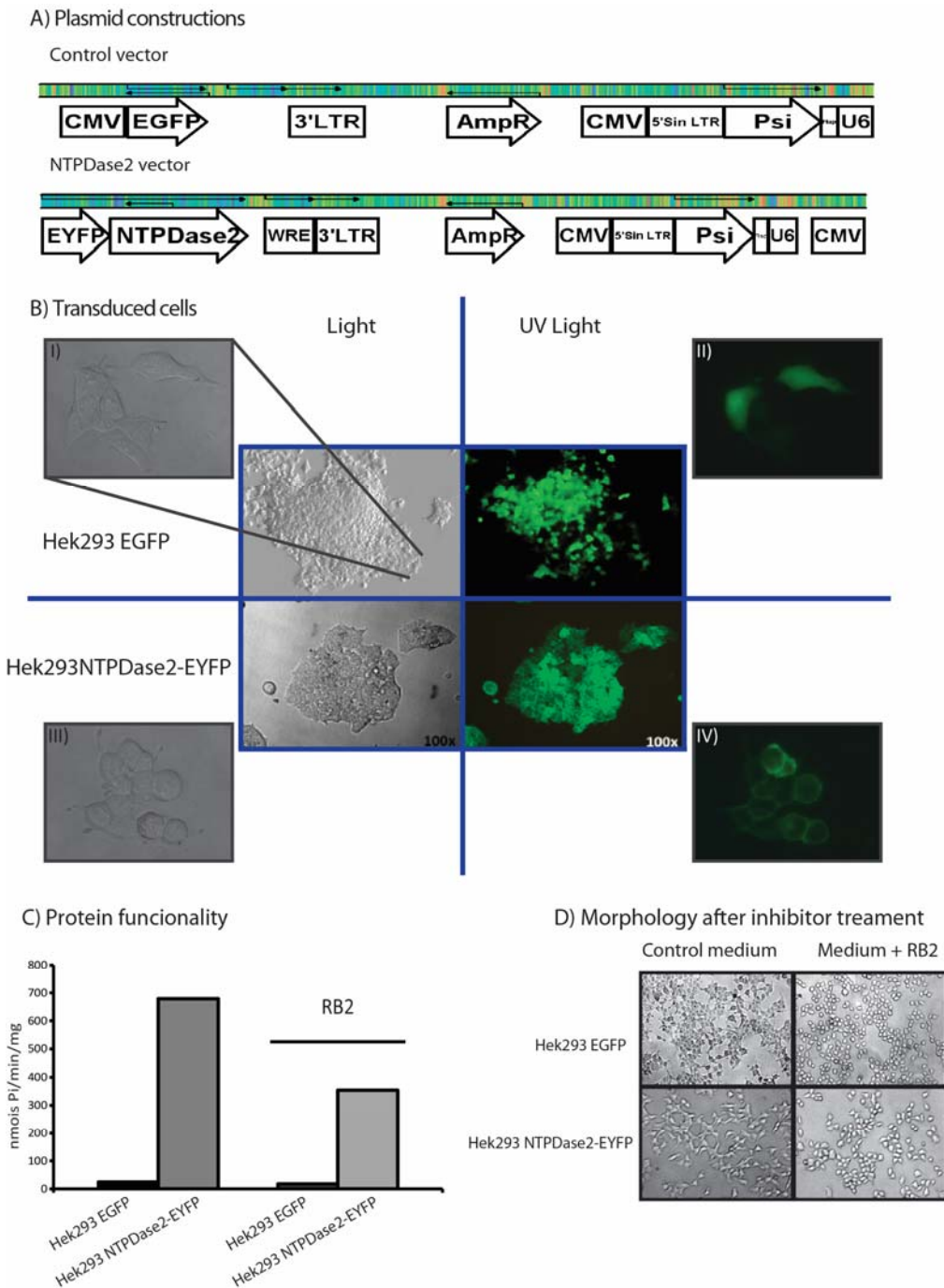


**SUPPLEMENTARY FIGURE 3: FRAP ASSAY.** A) Fluorescence recovery after photobleaching plotted in fluorescence intensity versus time in seconds. B) Photobleached areas are pointed with arrows. CCC: cell-cell contact, FM1 and FM2: free membrane. The same areas are showed in the same colors

### **3. Results**

#### **3.1. Functionality of the EYFP-NTPDase2 chimera**

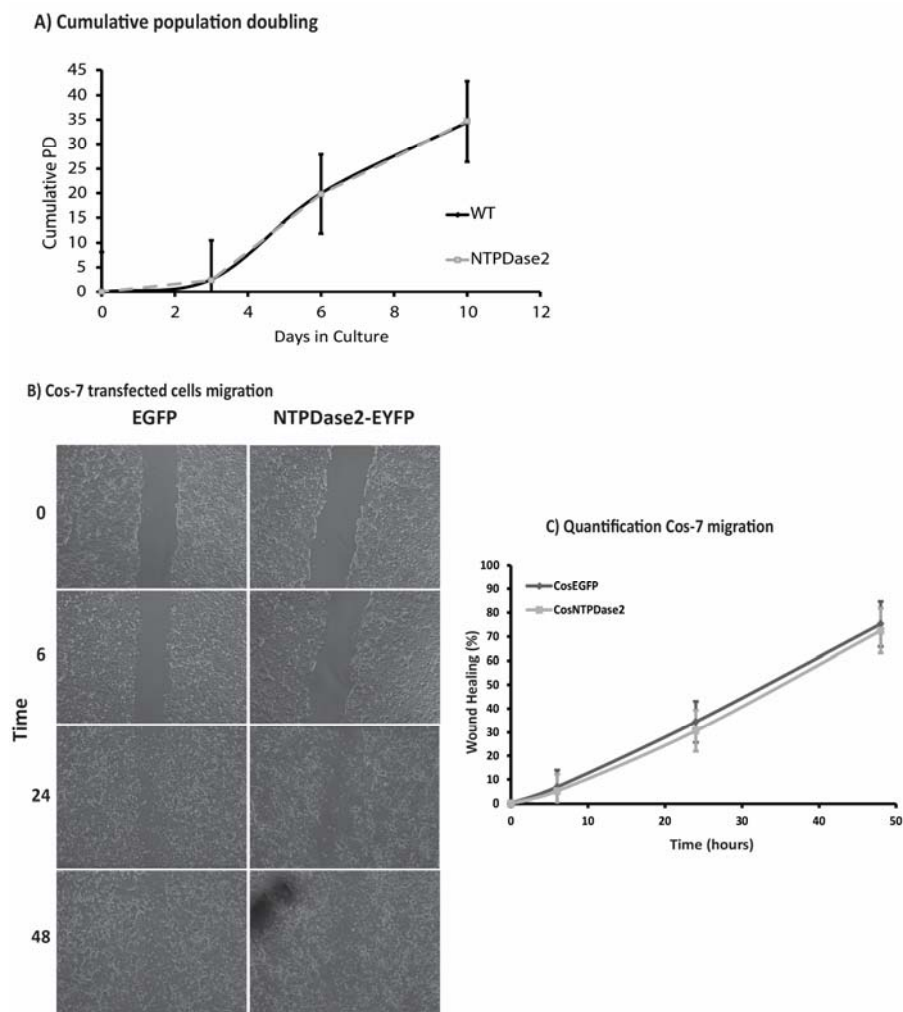
The analysis by fluorescence microscopy of the Hek293 transduced with the NTPDase2 chimera showed that the enzyme localizes almost exclusively to the cell membrane (Figure 1 a and b) conferring high activity to the expressing cells, which could be partially inhibited by the non-specific NTPDase2 inhibitor Reactive Blue 2 (Figure 1c) (Iqbal *et al*, 2005) and Evans Blue (data not shown) (Wink *et al*, 2006). When we performed the incubation with inhibitors, a difference in cell morphology was observed, both in control and NTPDase2 transduced cells (Figure 1d), and this alteration was never reported before. The ATPase activity obtained in the transduced cells is at a similar level of the activity found in astrocytes (the highest ATPase activity measured in cell surface up to now) (Wink *et al* 2003 and 2006), indicating that the expression level is comparable to levels obtained under physiologic conditions.



**FIGURE 1: Expression of functional NTPDase2 enzyme in Hek293 cells.** A) Lentiviral control vector coding for EGFP (upper) and vector coding for NTPDase2 fused to EYFP (lower). B) Hek293 transduced cells, colonies over uncovered wells. In more details I) Hek293 EGFP, II) Hek293 UV light, III) Hek293 NTPDase2-EYFP, IV) Hek293 NTPDase2-EYFP UV light. C) Activity and D) Morphology of transduced cells with or without the NTPDase inhibitor RB2.

### 3.2. NTPDase2 did not alter the proliferation or wound healing rates

The overexpression of NTPDase2 in Hek293 cells did not alter the proliferation rate as measured by cumulative population doubling assay or migrations as evaluated by the scratch wound assay in Cos-7 (Supplementary Figure 4) and HeLa cells (data not shown). The migration could not be observed in Hek293 transduced cells because this cell line presented a high proliferation rate masking the migration.



**SUPPLEMENTARY FIGURE 4: NTPDase2 did not alter cell proliferation and migration.** A) Cumulative population doubling of Hek293 wild type cells compared to Hek293 transduced with NTPDase2-EYFP after 10 days in culture. The results are showed in average $\pm$ SD. B) Scratch wound assay in Cos-7 transfected cells with NTPDase2-EYFP or EGFP vector. Pictures were taken in 100x immediately and after 6, 24 and 48 hours. C) The wound healing quantification from pictures showed in b. The results are showed in average $\pm$ SD.

### 3.3. NTPDase2 overexpression can modify cell-matrix adhesion

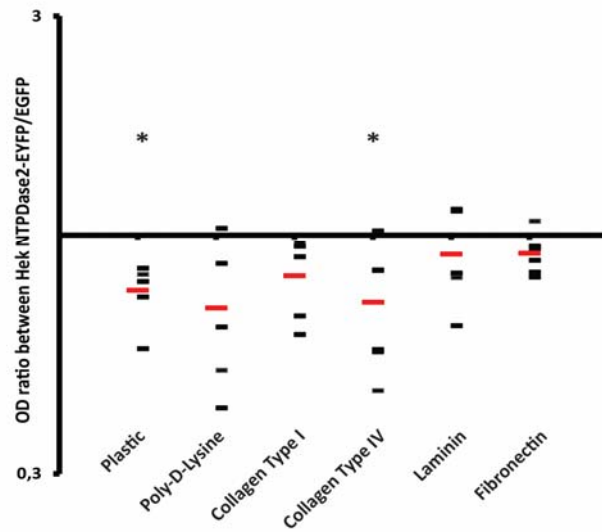
According to previous reports, some ATPase enzymes can act increasing adhesion rates, as for example immunoglobulin (Aurivillius *et al*, 1990; Wai Wong *et al*, 2012), Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer (Vagin *et al*, 2012), ecto-5'-nucleotidase (Wang *et al*, 2008). The two first ATPases act by homophilic interactions in cell-cell adhesion and the last one in substrate adhesion (Cappellari *et al*, 2012). In our work we evaluated these two types of adhesion: cell-matrix and cell-cell. In the cell adhesion assay over extracellular matrices we used five kinds of matrices (poly-D-lysine, collagen type I, collagen type IV, laminin and fibronectin) with different properties and uncovered plastic wells. We observed an overall significant decrease in adhesion when the cells overexpress NTPDase2 independent of substrate (Figure 2a). When independently considering the individual matrices, only when the cells were plated on uncovered plastic and collagen type IV wells this reduction was observed. These results suggest that NTPDase2 are not actively involved in mediating cell-matrix adhesion, but somehow negatively affect adhesion.

In order to evaluate the role of NTPDase2 in cell-cell adhesion, an assay similar with the cell-matrix was developed, using instead of matrices, a monolayer of cells. The monolayer chosen was primary rat astrocytes from cortex, cerebellum and hippocampus which are cells that endogenously express a high level of NTPDase2 (Wink *et al*, 2006), but with different levels of expression among cultures from different structures (Wink *et al*, 2003). The Hek293 cells overexpressing NTPDase2 were allowed to adhere separately over the three different monolayers of astrocyte cultures. This model of cell-cell adhesion assay showed that NTPDase2 did not modulate cell-cell adhesion (Fig 2 b).

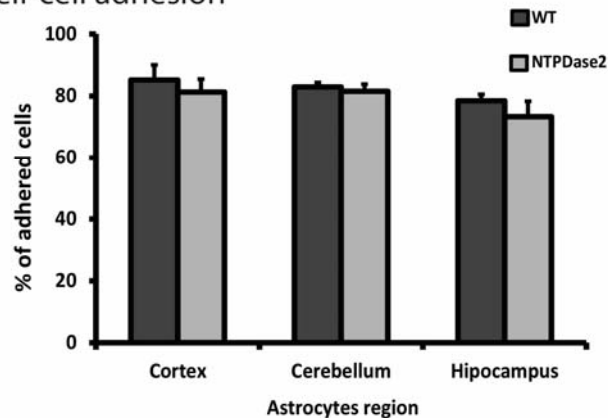
In order to analyze whether NTPDase2-EYFP chimera concentrates at cell-cell contacts in comparison with free membrane regions, we compared the fluorescence intensity of these regions using confocal microscopy of cell plated over different extracellular matrices (Figure 3a). The cell-cell contact regions (CCC region) had similar fluorescence intensity as the sum of the fluorescence intensity of free membrane (FM 1 and 2) of the cells in contact for all substrate, except collagen type I and fibronectin, in which the fluorescence in the contact region

was smaller when compared to the free membrane (Figure 3b), arguing against homophilic interactions capable of concentrating NTPDase2 in the adhesion site.

A) Cell-matrix adhesion



B) Cell-cell adhesion

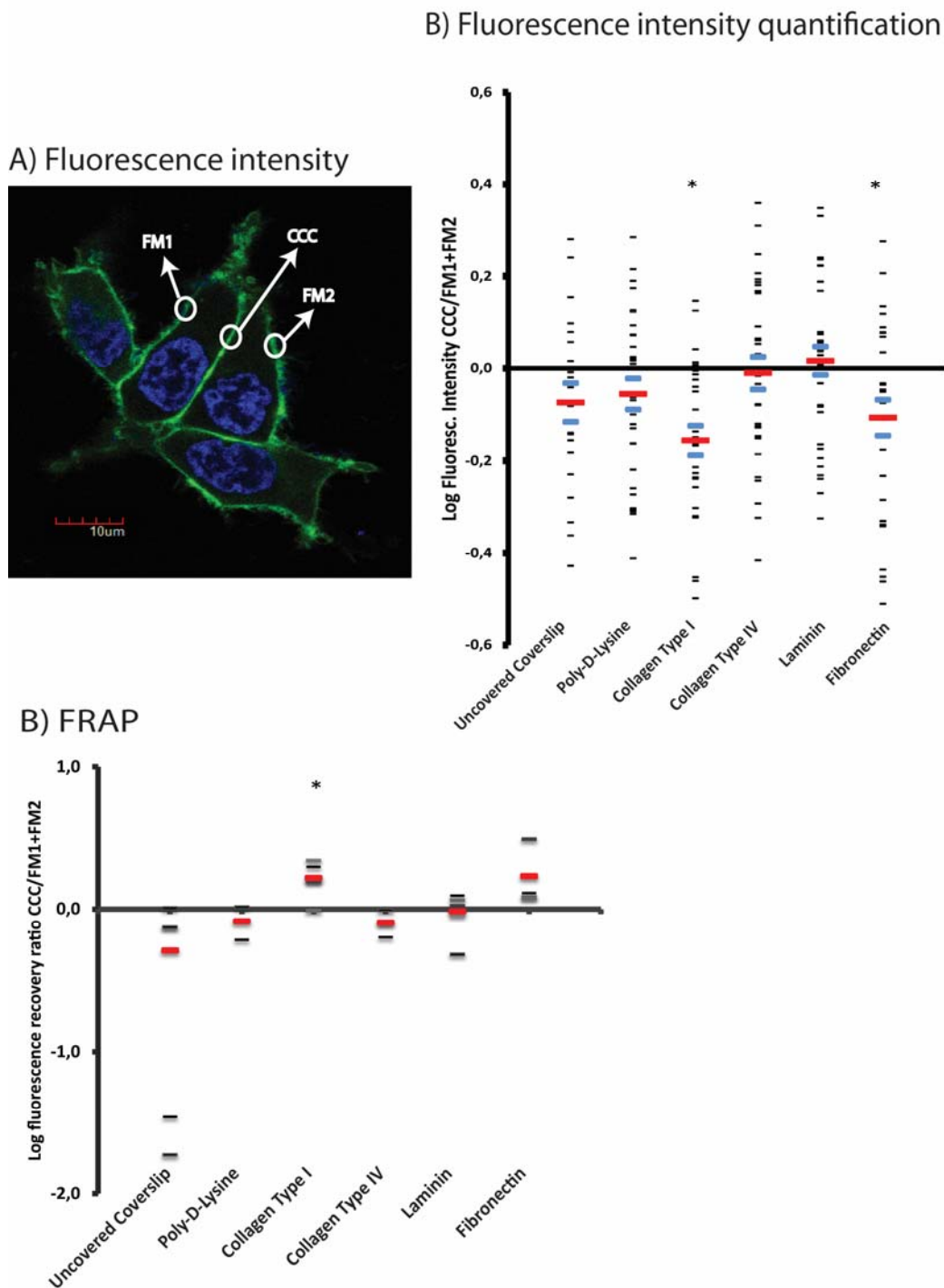


**FIGURE 2: NTPDase do not enhanced cell-cell or cell-matrix adhesion.** A) Cell adhesion over poly-D-lysine (100  $\mu\text{g/ml}$ ), collagen type I (20  $\mu\text{g/ml}$ ), collagen type IV (20  $\mu\text{g/ml}$ ), laminin (20  $\mu\text{g/ml}$ ) and fibronectin (20  $\mu\text{g/ml}$ ). After 30 min incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$ , adherent cells were fixed and stained with crystal violet and eluted with 10% acetic acid (v/v). OD was read at 570nm. The results shown OD for Hek293 NTPDase2/EGFP; average is shown in red; \*,  $p < 0.05$ . B) Adhesion over a confluent monolayer of rat astrocytes. The cells were plated over the monolayer for 15 minutes, non-adherent cells were removed and counted in hemocytometer. The number of adherent cells was calculated. The results are showed in average $\pm$ SD.

### **3.4. NTPDase2 is not associated with the adhesion proteins FAK, Paxillin or p130<sup>cas</sup>**

The FRAP assays were used to measure diffusion on the membrane plane, we did not find significant differences between the half-time of fluorescence recovery of paired cell-cell contact and lateral membranes (Figure 3c), indicating that NTPDase2 located in cell-cell contacts is not differentially linked to cytoskeleton or adhesion complexes when compared to that localized in free membrane areas.

Kaczmareck (2005) and her group showed that extracellular ATP can stimulate phosphorylation of paxillin, focal adhesion kinase (FAK) and p130<sup>cas</sup> leading cytoskeletal changes, cellular adhesion and motility. Based on this facts, we hypothesized that an ATPase located in the opposite side from leading migration could help migration direction. In order to evaluate if NTPDase2 could be co-localized inside or outside adhesion complexes former by paxillin, FAK and/or p130cas an immunofluorescence was performed. This assay did not show co-localization between NTPDase2 and paxillin, FAK or p130<sup>cas</sup> (data not shown).



**FIGURE 3: Confocal microscopy analysis.** A) Example of fluorescent areas measured to compare fluorescence intensity. CCC: cell-cell contact, FM1 and 2: free membrane 1 and 2. B) Quantification of fluorescence intensity: logarithm intensity in cell-cell contacts divided by the sum intensity in two free membrane of the same cell. Means are shown in red and standard deviation in blue. C) Logarithm time to half recovery fluorescence ratio between cell-cell contact and free membrane regions. Cells were plated on different extracellular matrices. Non-fixed cells regions were 80% photobleached and the half-time to fluorescence recovery of cell-cell contacts and free membrane rate is shown. Means are shown in red.  $*=p<0.05$ .



#### 4. Discussion

The history involving extracellular nucleotide and nucleoside degrading enzymes acting in adhesion dates back to 90s. Some enzymes were shown to be involved in this process due direct physical association, as for example immunoglobulin (Aurivillius *et al*, 1990; Wai Wong *et al*, 2012), and Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer (Vagin *et al*, 2012). Others are involved in adhesion through their structure and function as enzymes, such as ecto-5'-nucleotidase (Sadej and Skladanowski, 2012; Wang *et al*, 2008; Cappellari *et al*, 2012). ATP seems to be important in proliferation and migration as well as in adhesion. In 1990, Aurivillius stated that: "Interactions between the Ig-domains of C-CAM may be the structural basis for the specific homophilic binding. Binding and hydrolysis of ATP may then modify this binding in a manner similar to the ATP-regulated binding between actin and myosin" (Aurivillius *et al*, 1990) suggesting that the association between immunoglobulins could be modulated through the ATP present in the extracellular compartment. In this case, structure and function can be correlated. Additionally, extracellular ATP can stimulate N-cadherin expression and surface localization in astrocytes through activation of purinergic receptor, which indirectly affects cell adhesion (Tran *et al*, 2008).

In our study, we observed a modulation in general cell-matrix adhesion caused by NTPDase2 overexpression, where this enzyme disturbs cell-matrix adhesion. One hypothesis for this disturbance is ATP depletion caused by NTPDase2 substrate hydrolysis. Resuspension and replating of cells could be a stress factor able to release ATP in the culture medium, since it is well know that some cells can release ATP to guide chemotaxis (Chen *et al*, 2006 and Elliott *et al*, 2009) and adhesion molecule expression (Neary *et al*, 2006 and Tran *et al*, 2008), and the depletion of ATP due to NTPDase overexpression would therefore reduce expression of adhesion molecules. The fact that NTPDase2 modulate adhesion over all extracellular matrices tested reinforce the idea that enzymatic ATP depletion is an important player in the effect observed. So far the only evidence regarding NTPDase and adhesion was obtained for NTPDase1. This ectonucleotidase is able to interact with RanBPM that is known to bind to Sos protein and activate ERK/Ras which lead to proliferation pathway activation (Wu

*et al*, 2004, Denti *et al*, 2004; Wang *et al*, 2002). In this case, NTPDase1, Sos and ERK/Ras are tightly associated and controlled by RanBPM, suggesting a interaction between NTPDases and proliferation pathway proteins.

Jhandier and collaborator (2005) co-cultured human cholangiocarcinoma cells with primary portal fibroblasts and observed decrease in proliferation of cholangiocytes. They explained these results with the abolishment of ATP action due to the high NTPDase2 activity in portal fibroblasts, since cholangiocytes release ATP in culture medium to induce its own proliferation. The ADP formed by this hydrolysis was not able to activate the proliferation in cholangiocytes through P2Y, a known proliferation pathway (Jhandier *et al*, 2005, Lenz *et al*, 2000). In this case the effect is solely based on the enzymatic activity due to agonist (ATP) degradation. Therefore, the absence of effect of NTPDase2 over-expression on proliferation assay could be explained by the low levels of ATP in basal culture medium (Elliot *et al*, 2009). This low ATP concentration could not be sufficient to reach the threshold of the P2Y receptors present in these cells (Fischer *et al*, 2005; Buzzi *et al*, 2010), as found by Jhandier and collaborators. Moreover, chronic experiments with extracellular ATP in cell culture are difficult to performed since this molecule is thermolabile and stable addition is necessary or co-culture with a cell lineage that releases ATP, like that used by Jhandier and cols (2005). The role of NTPDase2 in proliferation process was confirmed *in vivo* during neurogenesis because knockout animals for this enzyme presented an increase in cell proliferation in the subependymal zone and hippocampus (Zimmermann *et al*, 2011 and 2012).

The NTPDase2 is a key protein in brain during neurogenesis. Their expression appears first in the border cells of ventricular zone and in the course of time the expression disappears from this zone and appears in sheaths around subependymal doublecortin-positive cells what suggest a participation in neuronal migration (Zimmermann *et al*, 2011). The absence in migration observed *in vitro* could be due to the absence of gradient ATP concentration (Elliott *et al*, 2009) since this molecule is a strong chemoattractive *in vitro* when transwell assays were performed (Chen *et al*, 2006 and Elliott *et al*, 2009) and *in vivo* (Zimmermann *et al*, 2011). Besides, extracellular ATP is able to stimulate

the phosphorylation of paxillin, focal adhesion kinase (FAK) (Yu *et al*, 2010) and p130cas inducing cytoskeletal remodeling. Thus an ATPase located in the opposite side from leading edge of migration could be necessary.

We conclude that NTPDase2 is not a protein involved directly with adhesion function, but it is an important player in a pathway involved with this biological function. In other words NTPDase2 *per se* can not modulate adhesion, proliferation or migration, but ATP or ADP can. Our work corroborates the importance of finetuned extracellular ATP control and an involvement with between purinergic signalization and adhesion. In proliferation or migration our results showed that *in vitro* NTPDase2 is not able to modulate these functions, at least in cell lines utilized.

5. Conflict of interest: We declare that we have no conflict of interest.

**Acknowledgments:** The present research was supported by grants from Brazilian funding agencies FAPERGS (Procoredes III 06/1376.0 and Pronex 10/0044-3) and CNPq (420036/2005-9). F. C. Kipper was recipient of CAPES fellowship.

## References

1. Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MB, Bock E, Obrink B. (1990) The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. FEBS Lett. May 21;264(2):267-9.
2. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254
3. Buzzi N, Boland R, Russo de Boland A. (2010) Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells. Biochim Biophys Acta. Sep;1800(9):946-55.

4. Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. (2012) Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Mol Cell Biochem.* Jan;359(1-2):315-22. doi: 10.1007/s11010-011-1025-9. Epub 2011 Aug 21.
5. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
6. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* Dec 15;314(5806):1792-5.
7. Cheng L, Lemmon S, Lemmon V (2005) RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 94(4):1102-10
8. Cunningham HB, Yazaki PJ, Domingo RC, Oades KV, Bohlen H, Sabbadini RA, Dahms AS (1993) The skeletal muscle transverse tubular Mg-ATPase: identity with Mg-ATPases of smooth muscle and brain. *Arch Biochem Biophys* 15;303(1):32-43
9. Cunningham HB, Yazaki PJ, Domingo RC, Oades KV, Bohlen H, Sabbadini RA, Dahms AS. (1993) The skeletal muscle transverse tubular Mg-ATPase: identity with Mg-ATPases of smooth muscle and brain. *Arch Biochem Biophys.* May 15;303(1):32-43.
10. de Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22):14542-7
11. Denti S, Sirri A, Cheli A, Rogge L, Innamorati G, Putignano S, Fabbri M, Pardi R, Bianchi E (2004) RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 279(13):13027-34
12. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* Nov;72(11):8463-71.
13. Dzhandzhugazyan K, Bock E. (1993) Demonstration of (Ca<sup>2+</sup>)-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* Dec 27;336(2):279-83.
14. Dzhandzhugazyan K, Bock E. (1997) Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry.* Dec 9;36(49):15381-95.
15. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* Sep 10;461(7261):282-6. doi: 10.1038/nature08296.
16. Fischer W, Franke H, Gröger-Arndt H, Illes P (2005) Evidence for the existence of P2Y1,2,4 receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y1 receptors after repetitive agonist application. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology* 371(6):466-72
17. Iqbal J, Vollmayer P, Braun N, Zimmermann H, Müller CE (2005) A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate

- diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Purinergic Signal* 1(4):349-58
18. Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sévigny J, Dranoff JA. (2005) Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem.* Jun 17;280(24):22986-92.
  19. Kaczarek E, Zapf S, Bouterfa H, Tonn JC, Westphal M, Giese A (1999) Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype. *Int J Dev Neurosci* 17(5-6):625-41
  20. Knowles AF. (2011) The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal.* Mar;7(1):21-45.
  21. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2):329-33
  22. Munkonda MN, Kauffenstein G, Kukulski F, Lévesque SA, Legendre C, Pelletier J, Lavoie EG, Lecka J, Sévigny J. (2007) Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol.* Nov 15;74(10):1524-34.
  23. Neary JT, Kang Y, Shi YF, Tran MD, Wanner IB. (2006) P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions. *Novartis Found Symp.*;276:131-43; discussion 143-7, 233-7, 275-81.
  24. Reits EA, Neefjes JJ. (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol.* Jun;3(6):E145-7.
  25. Sadej R, Skladanowski AC. (2012) Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol.*;59(4):647-52.
  26. Stout JG, Brittsan A, Kirley TL (1994) Brain ECTO-Mg-ATPase is not the neural cell adhesion molecule. *Biochem Mol Biol Int* 33(6):1091-8
  27. Stout JG, Kirley TL (1994) Purification and characterization of the ecto-Mg-ATPase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biochem Biophys Methods* 29(1):61-75
  28. Tran MD, Wanner IB, Neary JT. (2008) Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures. *J Neurochem.* Apr; 105(1):272-86.
  29. Vagin O, Dada LA, Tokhtaeva E, Sachs G (2012) The Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer as a cell adhesion molecule in epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(9):C1271-81
  30. Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR (2012) The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol* 2012:340296
  31. Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. (2002) Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem.* Sep 27;277(39):36216-22.
  32. Wang JJ, Sanderson BJ, Zhang W. (2012) Significant anti-invasive activities of  $\alpha$ -mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines. *Anticancer Res.* Sep;32(9):3805-16.
  33. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. (2008) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* Mar; 134(3):365-72.

34. Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJF, Battastini AMO (2003) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 43:621–628
35. Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Seigny J, Battastini AM, Robson SC (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138:421–432
36. Wu Y, Sun X, Enjyoji K *et al* (2004) NTPDase1 interacts with RanBPM to directly modulate Ras activation and cellular proliferation in liver regeneration following partial hepatectomy. *Hepatology*. Volume 40, Issue Supplement S4, page 62A, poster #135
37. Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, Dwyer KM, Bianchi E, Usheva A, Robson S (2006) RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem. J.* 396: 23–30
38. Yu T, Junger WG, Yuan C, Jin A, Zhao Y, Zheng X, Zeng Y, Liu J. (2010) Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar;298(3):C457-64. doi: 10.1152/ajpcell.00342.2009.
39. Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G. (2009) Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci.* Sep;100(9):1655-62.
40. Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L. (2007) RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis.*;24(6):439-48.
41. Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. (2007) Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther.* Mar;6(3):426-31.
42. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, Ou Z, Yin L. (2007) Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* Jun;17(6):1341-6.
43. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8(3):437-502.
44. Zimmermann H. (2011) Purinergic signaling in neural development. *Semin Cell Dev Biol.* Apr;22(2):194-204.

## 4. DISCUSSÃO

Os experimentos demonstraram que conseguimos transduzir de forma estável células com NTPDase2 fusionada a EYFP, produzindo atividade ATPásica muito maior que os exibida por Hek293 (célula renal embrionária humana) selvagem (Figure 1 do manuscrito), mas similar à atividade encontrada em astrócitos (Wink *et al*, 2003 e 2006). É importante enfatizar que a adição de uma proteína de 27 kDa como a YFP poderia interferir na sua localização subcelular ou atividade. Nós observamos que nas linhagens Hek293, Cos-7 (célula renal de macaco verde africano) e HeLa (adenocarcinoma cervical humano) a localização da fluorescência é quase que exclusivamente membranar, enquanto que nas linhagens U87 e GL261 (glioblastoma humano e murino respectivamente) foi encontrada fluorescência interna e pouca fluorescência membranar (Supplementary Figure 1 e Supplementary Figure 2 do manuscrito), talvez decorrente de um acúmulo no retículo endoplasmático ou incapacidade de endereçamento para a membrana, eventos comuns na superexpressão de proteínas. A localização subcelular e a atividade enzimática observada na linhagem Hek293 repetiu-se tanto na expressão por transfecção (episomal) como na transdução (incorporação ao DNA genômico) sugerindo que ambos métodos são capazes de produzir uma quimera funcional. As linhagens de glioma, transduzidas com o vetor, apresentaram baixa taxa de incorporação das partículas lentivirais e/ou produção da quimera (entre 2-4% das células apresentaram fluorescência). As linhagens HeLa e Cos-7 foram transfectadas com o plasmídeo, nessas linhagens, assim como na Hek293, a quantidade de proteína produzida de maneira geral é considerada alta, motivo pelo qual são utilizadas para expressão de proteínas recombinantes (Thomas e Smart, 2005 e Birkholtz *et al*, 2008), de fato que acúmulos citoplasmáticos por saturação no sistema de transporte poderiam ter acontecido. O motivo exato do não endereçamento das quimeras para a membrana nas linhagens de gliomas utilizadas é desconhecido visto que na transdução as taxas de produção de proteína são mais estáveis que na transfecção e o número de cópias de DNA hospedeiro é menor, o que permite que o sistema de modificação pós-traducional e endereçamento funcionem de forma menos sobrecarregada. Uma possível explicação seria devido a modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais que levariam ao silenciamento ou à rápida degradação da NTPDase2 nos gliomas, já que nenhuma deleção cromossômica foi encontrada na região codificante para essa enzima durante o sequenciamento de U87 (Clark *et al*, 2010) e trabalhos anteriores mostram que a expressão é baixa nessa linhagem (Wink *et al*, 2003).

O sistema purinérgico de maneira geral não possui inibidores específicos para cada um dos seus membros. Tal inespecificidade pode ser considerada causa e consequência de confusões na nomenclatura que só foi unificada após 1999. O advento da clonagem e do RNA de interferência tornaram possível diferenciar entre as NTPDases expressas em cada tipo celular e suas diferentes especificidades pelos substratos. Os inibidores conhecidos e disponíveis são bastante generalistas, por exemplo, Reactive Blue 2 é capaz de bloquear tanto NTPDases, com pequenas diferenças de especificidade para cada uma delas, quanto receptores purinérgicos (Bültmann *et al*, 1996a e 1996b), dessa forma, seu uso isolado em caracterizações não pode ser feito. Um achado interessante do nosso trabalho foi a alteração da morfologia da linhagem Hek293 transduzida sob microscopia após incubação de 30 minutos com inibidores inespecíficos das NTPDases. Após esse tempo podemos observar diferenças significativas na morfologia, as células da monocamada aderida encolhem suas protrusões do citoplasma (Figure 1 do manuscrito). Esse evento é bastante comum em células entrando em apoptose, fato que nos chamou atenção. Experimentos de viabilidade não foram feitos, porém quando o mesmo inibidor foi utilizado para adesão celular, tanto as células transduzidas com NTPDase2-EYFP quando as células transduzidas controle (EGFP) tiveram sua adesão aos substratos prejudicada.

Os experimentos de migração precisaram ser classificados como inconclusivos quando realizados com Hek293, pois essa linhagem não é capaz de migrar de forma esperada para o tipo de ensaio feito. Buscando pelos termos “Hek293” e “Scratch wound assay” no Pubmed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) não encontramos nenhum artigo que demonstre a realização desse experimento com eficiência; um único artigo realiza esse mesmo experimento, porém observando os dados com cuidado observamos que o artefato do excesso de proliferação dentro da lesão parece acontecer da mesma forma que no nosso experimento (Tanaka *et al*, 2010). A ausência de migração pode ser devido ao excesso de proliferação apresentado por essa linhagem, já que a literatura sugere que esses mecanismos são temporalmente excludentes (Zheng *et al*, 2009). Ensaio preliminares feitos em outras linhagens disponíveis no nosso laboratório e até mesmo já transduzidas por nós com NTPDase2-EYFP (U87 e GL261) demonstram que essas outras linhagens são capazes de migrar quando o experimento é realizado nas mesmas condições que o descrito para Hek293. A eficiência da transdução foi baixa nessas linhagens de glioma (apenas entre de 2-4% apresentavam fluorescência) o ensaio de migração não pode ser realizado com sucesso, tentativas de acompanhamento de células únicas foram feitas mas seus resultados foram inconclusivos. Tentativas de isolar grupos de células manualmente fracassaram e



uma purificação das células transduzidas utilizando citometria com separadores celulares (*cell sorter*) poderia ser feita para purificar a população expressando a proteína NTPDase2-EYFP. A alternativa encontrada foi a transfecção de duas outras linhagens celulares: HeLa e Cos-7 que são bastante utilizadas na literatura como modelo para diversos experimentos por serem de fácil cultivo e eficientemente transfectadas (Thomas e Smart, 2005 e Birkholtz *et al*, 2008). Após a transfecção, pelo menos 40% das células apresentaram expressão de fluorescência, e essa concentrava-se na membrana das células. Os experimentos de Scratch Wound Assay mostraram que ambas as linhagens transfectadas com o vetor controle EGFP ou com o vetor codificante para NTPDase2 fusionada a EYFP migram de forma similar, sem diferença significativa entre elas (Supplementary Figure 4 do manuscrito), e o tempo necessário para reposição da monocamada no interior da lesão foi igual em ambas situações.

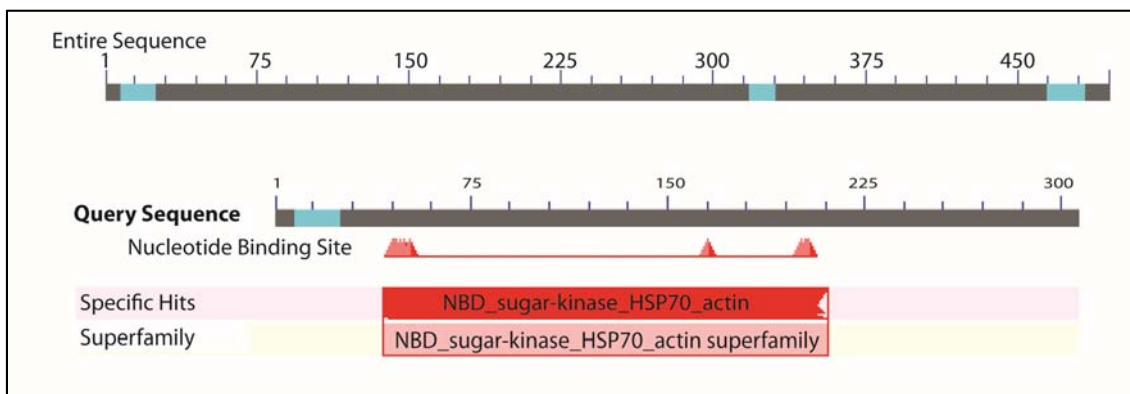
Até o momento, as NTPDases de uma forma geral não são conhecidas por influenciar o ciclo celular de forma a modificar a proliferação. A literatura menciona que a adesão celular, além de modificar a migração também pode interferir na via proliferativa (Kumar *et al*, 2009; Brábek *et al*, 2010). Nos nossos resultados, a superexpressão da NTPDase2 não foi capaz de alterar a capacidade de proliferação *in vitro*. Postulou-se que devido a baixa atividade NTPDásica dentro dos gliomas, combinado com a morte celular do tecido circundante *in vivo* os níveis de ATP dentro do tumor seriam elevados. Essa teoria foi parcialmente comprovada com dados obtidos por Morrone em 2006, onde a adição de apirase solúvel dentro de glioma de rato foi capaz de diminuir a massa tumoral, contudo nesse caso não é possível excluir outras causas para diminuição do volume tumoral. Trabalhos de outros grupos (Fischer *et al*, 2005; Buzzi *et al*, 2010) demonstraram que o ATP é um importante ativador da proliferação via receptores P2Y que estão expressos na linhagem Hek293. Infelizmente a concentração desse nucleotídeo no meio de cultura sem injúrias ou estresse, conforme mencionado acima é baixo para ativar essas vias (Elliott *et al*, 2009). Outros resultados prévios *in vivo* mostrados por Braganhol (Braganhol *et al*, 2009) demonstram que há um aumento da malignidade e do tamanho de tumores quando a NTPDase2 é super-expressa em gliomas de rato. A super-expressão da NTPDase2, por hidrolisar ATP de forma eficaz, mas não tão eficientemente ADP, leva a um acúmulo do nucleotídeo difosforilado capaz de induzir resposta inflamatória, o que parece ser o mecanismo de aumento da massa tumoral nesse caso. Ko e colaboradores (2011) demonstraram que o ADP é mais potente que o ATP em induzir proliferação celular via receptores P2Y1 e P2Y6 em células epiteliais dos ductos pancreáticos. Animais com deleção

do gene que codifica para NTPDase2 apresentam aumento de proliferação na zona supendimal e no hipocampo (Zimmermann *et al*, 2011 e 2012), é interessante citar que dentre as culturas de astrócitos nas quais foi medida e reportada a expressão de NTPDases, o hipocampo é o que possui a maior expressão de NTPDase2 (Wink *et al*, 2003). Como o nosso trabalho *in vitro* é um sistema isolado, sem influência do sistema circulatório e/ou imune e com baixas taxas de ATP e conseqüentemente ADP (de Miranda *et al*, 2002) a simples presença da enzima não é suficiente para ativar as vias proliferativas, corroborando com a literatura no que se refere ao fato de o ATP (Yu *et al*, 2009) e não a enzima ser o agente indutor de proliferação.

Após a transdução das células a observação de forte intensidade de fluorescência nos contatos célula-célula nos chamou a atenção quando as observávamos em microscópio invertido. Pesquisando a literatura observamos que é antiga a relação entre moléculas hidrolisadoras de ATP com papel na adesão extracelular. Um exemplo bem conhecido é a família das imunoglobulinas que possuem na sua porção constante um sítio de hidrólise de ATP (Aurivillius *et al*, 1990). O papel extracelular do ATP e outros nucleotídeos em modular a adesão e a migração são conhecidos, sabe-se que eles podem agir sobre receptores do tipo P2Y capazes de modular a adesão (Sud'ina *et al*, 1998; Kaczmarek *et al*, 2005 e Chen *et al*, 2006) ou como um comutador de NCAM (Kiselyov *et al*, 2005). Os nossos experimentos demonstram que de maneira geral as células que superexpressam NTPDase2 aderem menos aos diferentes substratos, essa diferença só foi significativa quando as células foram colocadas para aderir sobre poços não tratados com matrizes extracelulares (plástico) e sobre colágeno tipo IV. A explicação mais provável seria que o ATP, imprescindível para outras moléculas de adesão clássicas como já demonstrado para NCAM (Kiselyov *et al*, 2005), estaria depletado quando a NTPDase2 está superexpressa. Em experimentos anteriores do nosso grupo nós observamos que, em gliomas, a superexpressão da NTPDase2 também diminui a adesão aos substratos e que quando utiliza-se um bloqueador inespecífico da atividade enzimática, as células recuperam a capacidade de adesão reforçando a hipótese da importância do ATP mesmo que em baixas concentrações no meio. As tentativas de repetir esse experimento com a linhagem modelo utilizada nesse estudo (Hek293) apresentaram grandes desvios, talvez devido a grandes inespecificidade desses bloqueadores ou a ativação de vias apoptóticas nessa linhagem específica e por isso não são mostradas no manuscrito em preparação. Uma possível solução para esse problema será repetir os experimentos adicionando-se pirase solúvel no meio das células Hek293 transduzidas para depletar o ATP e o ADP (Jackson *et al*, 2007; Chen *et al*, 2006) e analisar

a adesão sem esses nucleotídeos. Esse experimento poderia distinguir entre os efeitos da atividade enzimática e da estrutura da proteína na adesão celular, confirmando a importância da molécula de ATP mais do que da proteína NTPDase2 na adesão celular.

Analisando a sequência da NTPDase2 em bancos de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) e procurando por domínios de adesão conservados, não encontramos regiões de conservação com outras proteínas adesivas, nem homologia com a porção N-terminal da NTPDase1 (Figura 4) – região que se liga a RanBPM, uma molécula envolvida em complexos de adesão.



**FIGURA 9:** DOMÍNIOS CONSERVADOS DA NTPDASE2. A NTPDase2 apresenta apenas domínios conservados com HSP70, mas nenhum domínio conservado com proteínas de adesão.

A obtenção dos astrócitos foi fundamental para a realização dos experimentos de adesão célula-célula. Como os astrócitos possuem grande expressão da NTPDase2 (Wink *et al*, 2003) e formam uma monocamada bastante aderente esperávamos que quando as células Hek293 superexpressando NTPDase2 fossem colocadas sobre eles haveria uma maior adesão sobre a monocamada caso essa proteína formasse dímeros extracelulares ou favorecesse a formação de complexos de adesão. O resultado observado não foi como esperado já que não houve modificação da adesão causada pelo aumento da expressão da NTPDase2. O fato de colocar células de duas espécies diferentes para aderir entre si poderia mascarar uma interação facilitada pela NTPDase2, uma vez que as interações entre as moléculas clássicas de adesão, como caderinas e imunoglobulinas, é extremamente forte e que elas são tecido específicas. Isso seria compatível já que células de um mesmo tecido tem maior facilidade de aderir entre si do que com células de tecidos diferentes, isto considerando apenas dentro da mesma espécie (Alberts *e cols*, 2010). Cruzar células de diferentes tecidos e espécies poderia fazer com que elas só aderissem entre si e seria improvável que a NTPDase2 tivesse propriedades de vencer essa força de adesão. Esse

experimento poderia ser contornado utilizando células provenientes da mesma espécie na monocamada inicial e na hospedeira. Para isso seria necessário uma linhagem transduzida capaz de formar uma monocamada de aderência forte ao substrato marcada com um corante fluorescente e colocar sobre esta células hospedeiras da mesma espécie transduzidas com NTPDase2 ou com o controle marcadas com fluorescência diferente. As células transduzidas Hek293 não formam uma monocamada aderente o suficiente para a realização desse padrão de experimento e por isso não puderam ser utilizadas na monocamada inicial.

A partir desses resultados inconclusivos de adesão célula-célula, fez-se necessário a investigação das regiões de contato célula-célula sob microscopia confocal. Sabe-se que nesse microscópio é possível observar as células em planos bastante finos, o que pode gerar uma imagem tridimensional quando reconstruída computacionalmente. Esse tipo de microscopia elimina o artefato do microscópio de luz, no qual é possível ver apenas em dois planos (X e Y) ficando as estruturas do plano Z sobrepostas, sendo que essa sobreposição pode gerar erros de interpretação. Uma imagem obtida pelo microscópio confocal é capaz de mostrar as interações em um único plano da célula, que não excede alguns poucos micrometros, dessa forma se houver maior concentração da enzima em algum ponto podemos afirmar com certeza de onde ele parte e com quais estruturas se relaciona (Paddock, 1999). Uma maior concentração de fluorescência, que sabemos estar fusionada a NTPDase2, nos revela que a enzima e não a EYFP (que é intracelular) está concentrada nos contatos entre as células. Uma concentração nos contatos célula-célula pode sugerir uma adesão homofílica ou capacidade de dimerização extracelular, embora também não possa ser excluída a possibilidade de que uma proteína ligada a NTPDase2 esteja formando dímeros extracelulares. Essa hipótese foi verificada através da medida da intensidade de fluorescência utilizando o software ImageJ (disponível para download em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A intensidade de fluorescência das regiões de contato célula-célula foi comparada com a intensidade nas regiões de membrana livre, lembrando-se sempre de dividir a intensidade das regiões de contato por dois, já que equivale a membrana de duas células adjacentes. Surpreendentemente encontramos uma menor intensidade de fluorescência nos contatos quando as células estão sobre colágeno tipo I e fibronectina, indicando que a NTPDase2 não se concentra com complexos de adesão de forma a favorecer ou trabalhar como uma molécula adesiva. Para que se possa avançar nessa hipótese, esse experimento precisará ser repetido com uma molécula que sabidamente não interfira na adesão.

Nós tentamos a construção de uma proteína fluorescente farnesilada. Tecnicamente o sinal de farnesilação é um tipo de modificação pós-traducional que endereça as proteínas para a face interna da membrana citoplasmática, um exemplo de proteína que sofre essa modificação é a Ras (Albrecht *et al*, 2010). Dessa forma a sequência que codifica para os aminoácidos modificados na Ras foi comprada e inserida na extremidade C-terminal do plasmídeo verde fluorescente.

Segundo a literatura e alguns plasmídeos comercializados na Addgene® (www.addgene.org) essa modificação seria suficiente para endereçar a proteína para a membrana celular, sem o risco de que ela possa formar dímeros extracelulares capazes de interferir na adesão visto que a proteína fica ancorada apenas na face interna desta. Ao contrário do esperado, o sinal membranar obtido com a modificação não é comparável ao da NTPDase2-EYFP, já que pouca proteína fluorescente foi eficientemente endereçada à membrana, resultando em um sinal membranar fraco e grande background intracelular. Embora tenha sido feita a transfecção em diferentes linhagens celulares e diferentes diluições do plasmídeo para evitar a saturação do processo de farnesilação, não conseguimos realizar a construção de um plasmídeo controle ideal dessa maneira. Outra estratégia possível para construção do controle seria a clivagem do plasmídeo contendo EYFP fusionado à NTPDase2, essa estratégia compreende utilizar o mesmo plasmídeo onde o EYFP localiza-se na porção amino-terminal e a NTPDase2 localiza-se na porção carboxi-terminal sendo deletada toda sequência após a primeira região transmembrana da enzima. Assim seria possível avaliar se há concentração da intensidade de fluorescência nos contatos célula-célula ou célula-matriz de forma diferencial nas células transduzidas com NTPDase2-EYFP ou apenas EYFP ancorado a membrana. Também permitiria observar se o tempo de recuperação da fluorescência é modulado pela NTPDase2 ou não.

A adesão e a migração das células dependem de uma fina regulação de associação e dissociação de proteínas. Inicialmente, complexos de adesão são formados com as proteínas  $\alpha\beta3$ -integrina, seguidas por paxilina e talina, que ativam vias de sinalização através da fosforilação em resíduos de tirosina (Zaidel-Bar *et al*, 2004). Mais tarde há a associação de vinculina e  $\alpha$ -actinina cuja entrada leva ao desenvolvimento das adesões focais junto com FAK, VASP e p130<sup>cas</sup> (Donato *et al*, 2009). A composição exata do complexo de adesão depende do tempo de maturação (Zaidel-Bar *et al*, 2004). Na tentativa de elucidar uma possível participação da NTPDase2 em complexos de adesão e nas adesões focais os experimentos de co-localização foram realizados. Os resultados nos sugerem que a NTPDase2 não co-localiza com FAK, p130<sup>cas</sup> ou paxilina, indicando que não está presente na

forma imatura e matura de protusão. Esses resultados são corroborados pelos resultados dos ensaios de FRAP. Proteínas ligadas ao citoesqueleto apresentam pouca mobilidade e capacidade de difusão na membrana plasmática se comparadas às proteínas firmemente ligadas a essa estrutura intracelular (Reits e Neefjes, 2001). Os resultados do tempo necessário para recuperação da fluorescência indicam que a NTPDase2 está igualmente ancorada a membrana tanto nos contatos célula-célula quanto nas regiões de membrana livre quando as células estão sobre diferentes substratos. Curiosamente, quando as células estão sobre colágeno tipo I e fibronectina, a intensidade de fluorescência nas regiões de membrana livre é maior que nos contatos célula-célula (Figure 3 a e b) e o tempo de recuperação nas mesmas condições é menor se comparadas com as regiões de contato célula-célula (Figure 3 c). Uma maior concentração poderia explicar uma maior difusão, porém o motivo que leva a essa diferença na concentração precisa ser melhor elucidado, talvez buscando uma co-localização da NTPDase2 com outras moléculas, como caderinas, integrinas ou selectinas, ou quem sabe imunoprecipitando NTPDase2 seguido por espectrometria de massa para identificar sua ligação a novas proteínas.

De maneira geral, podemos dizer que nossos dados estão de acordo com a literatura para funções do ATP frente aos eventos de proliferação, migração e adesão embora novas funções para a NTPDase2 enquanto proteína não puderam ser encontradas.

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. GERAIS

A NTPDase2 quando superexpressa em células Hek293, não se concentra na superfície de contato célula-célula e a sua presença diminui a adesão sobre diferentes matrizes extracelulares sem modular a proliferação, migração ou adesão célula-célula.

### 5.2. ESPECÍFICAS

- A quimera NTPDase2-EYFP produz uma proteína capaz de ser endereçada para a membrana plasmática e com atividade enzimática;
- O experimento de *Scratch Wound* revela que as células que superexpressam NTPDase2-EYFP não são capazes de migrar de maneira diferente das células que não superexpressam esta proteína;
- A taxa de crescimento da linhagem Hek293 não foi alterada pelo aumento da expressão de NTPDase2;
- A superexpressão da NTPDase2-EYFP nas células Hek293 fez com que essas apresentassem uma adesão menor a diferentes matrizes extracelulares do que as que expressam EGFP, sendo essa diferença significativa quando as células estavam sobre plástico e colágeno tipo IV;
- A superexpressão da NTPDase2 nas células Hek293 fez com que essas apresentassem uma tendência de aderir menos sobre a monocamada de astrócitos de diferentes estruturas cerebrais (hipocampo, córtex e cerebelo), não sendo significativa a diferença sobre nenhuma das monocamadas;
- A NTPDase2 fusionada a EYFP não co-localiza com outras proteínas de adesão como FAK, Paxilina ou p130cas, o que sugere não estar presente em complexos de adesão focal;
- A NTPDase2 quando superexpressa em células Hek293, não se concentra na superfície de contato célula-célula, pelo contrário, sua concentração nas regiões de contato é menor quando as células estão sobre duas diferentes matrizes extracelulares (colágeno tipo I e fibronectina);
- O tempo necessário para recuperação da fluorescência após “photobleaching” nos contatos célula-célula é semelhante ao tempo necessário para recuperação nas regiões de membrana em contato com a matriz, indicando que a proteína está igualmente fluida na

membrana em ambas porções, sem ligação diferencial ao citoesqueleto ou a proteínas na célula vizinha ou na matriz. A exceção quando as células estão sobre colágeno tipo I e fibronectina, onde a recuperação dos contatos célula-célula é mais lento que as regiões de membrana livre.



## 6. PERSPECTIVAS

Os dados apresentados são suficientes para sustentar a nossa hipótese, porém para responder todos os nossos objetivos iniciais alguns experimentos ainda precisariam ser realizados, como por exemplo:

- Produzir um plasmídeo contendo a proteína fluorescente fusionada a NTPDase2 parcialmente deletada que possa ser utilizado como controle nos experimentos de FRAP e co-localização;
- Testar a adesão célula-célula utilizando uma monocamada de Cos-7 transduzida com NTPDase2-EYFP e colocar sobre ela células hospedeiras também transduzidas com NTPDase2-EYFP marcadas com outro corante fluorescente (por exemplo Qtracker) e depois quantificar as células aderidas por citometria de fluxo. Assim também se evitaria o viés de cruzamento de espécie causado na adesão sobre a monocamada de astrócitos;
- Realizar ensaios de adesão celular utilizando apirase solúvel e diferentes concentrações de ATP e ADP no meio, com intuito de comprovar se a diferença na adesão deve-se a presença da enzima ou a sua atividade enzimática. Esses experimentos também poderiam ser feitos com NTPDase2 com mutações no sítio catalítico, porém no momento não possuímos plasmídeos codificantes para construir essas linhagens.

## 7. REFERÊNCIAS

Abbracchio MP, Burnstock G. **Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?** Pharmacol Ther. 64(3):445-75, 1994.

Alberts e cols. **Biologia Molecular da Célula**. Edição 5ª. Porto Alegre: Editora ARTMED, 2010.

Albrecht S, Usmani SM, Dietl P, Wittekindt OH. **Plasma membrane trafficking in alveolar type II cells**. Cell Physiol Biochem.; 25(1):81-90, 2010.

Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MBS, Bock E, Öbrink B. **The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily**. FEBS LETTERS. 264: (2): 267-269, 1990.

Ballerini P, Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, Caciagli F. **Influence of Ca<sup>2+</sup> channel modulators on [3H]purine release from rat cultured glial cells**. Neurochem Res. Jun; 20(6):697-704, 1995.

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sévigny J. **Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8**. Biochemistry. May 11; 43(18):5511-9, 2004.

Birkholtz LM, Blatch G, Coetzer TL, Hoppe HC, Human E, Morris EJ, Ngcete Z, Oldfield L, Roth R, Shonhai A, Stephens L, Louw AI. **Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation**. Malar J. Oct 1; 7:197, 2008

Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Veselý P, Fabry B. **The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion**. Cell Commun Signal. Sep 7;8:22, 2010.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal Biochem 72:248-254, 1976

Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AMO. **Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth**. Cancer Sci. 100: (8): 1434-1442, 2009.

Braun N, Sévigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H. **Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain**. Eur J Neurosci. Apr; 17(7):1355-64, 2003

Burnstock G. **Purine and pyrimidine receptors**. Cell. Mol. Life Sci. 64: 1471-83, 2007.

Burnstock G. **Purinergic receptors**. J Theor Biol. Oct 21; 62(2):491-503, 1976.

Burnstock, G. **Purinergic signalling: past, present and future.** Braz J Med Biol Res. 42(1) 3-8, 2009.

Buzzi N, Boland R, Russo de Boland A. **Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells.** Biochim Biophys Acta. Sep; 1800(9):946-55, 2010

Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. **Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion.** Mol Cell Biochem. Jan; 359(1-2):315-22, 2012

Carl, S.A.L., Smith, T.M., and Kirley, T.L. **Crosslinking induces homodimer formation and inhibits enzymic activity of chicken stomach ecto-apyrase.** Biochem. Mol. Biol. Int. 44 463-470, 1998.

Chadwick BP, Frischauf AM. **Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes.** Mamm Genome. Sep; 8(9):668-72, 1997.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. **A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity.** Anal Biochem 157: 375-380, 1986.

Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. **ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors.** Science. Dec 15; 314(5806):1792-5, 2006.

Cheng L, Lemmon S, Lemmon V. **RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation.** J Neurochem. Aug; 94(4):1102-10, 2005.

Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. **U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line.** PLoS Genet. Jan 29; 6(1):e1000832, 2010.

Cunningham HB, Yazaki PJ, Domingo RC, Oades KV, Bohlen H, Sabbadini RA, Dahms AS. **The skeletal muscle transverse tubular Mg-ATPase: identity with Mg-ATPases of smooth muscle and brain.** Arch Biochem Biophys. May 15; 303(1):32-43, 1993.

de Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H. **Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine.** Proc Natl Acad Sci USA 99(22):14542-7, 2002.

Denti S, Sirri A, Cheli A, Rogge L, Innamorati G, Putignano S, Fabbri M, Pardi R, Bianchi E. **RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1.** J Biol Chem. Mar 26; 279(13):13027-34, 2004.

Donato DM, Ryzhova LM, Meenderink LM, Kaverina I, Hanks SK. **Dynamics and mechanism of p130<sup>Cas</sup> localization to focal adhesions.** J Biol Chem. Jul 2; 285(27):20769-79, 2010.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. **A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.** J Virol. Nov; 72(11):8463-71, 1998.

Dzhandzhugazyan K, Bock E. **Demonstration of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule.** FEBS Lett. Dec 27; 336(2):279-83, 1993.

Dzhandzhugazyan K, Bock E. **Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding.** Biochemistry. Dec 9; 36(49):15381-95, 1997.

Elliott MR, Chekeni FB, Tramont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. **Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance.** Nature. Sep 10; 461(7261):282-6, 2009.

Fischer W, Franke H, Gröger-Arndt H, Illes P. **Evidence for the existence of P2Y<sub>1,2,4</sub> receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y<sub>1</sub> receptors after repetitive agonist application.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. Jun; 371(6):466-72, 2005.

Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC. **Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein.** Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 1; 88(11):5041-5, 1991.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. **International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.** Pharmacol Rev. Dec; 53(4):527-52, 2001.

Gary SC, Hockfield S. **BEHAB/brevican: an extracellular matrix component associated with invasive glioma.** Clin Neurosurg. 47:72-82, 2000.

Grinthal A, Guidotti G. **Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras.** Biochemistry. Feb 12; 41(6):1947-56, 2002.

Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. Mar 4;144(5):646-74, 2011.

Iqbal J, Vollmayer P, Braun N, Zimmermann H, Müller CE. **A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction.** Purinergic Signal 1(4):349-58, 2005.

Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, Sundberg C, Robson SC. **Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice.** Am J Pathol. Oct; 171(4):1395-404, 2007.

Javed R, Yarimizu K, Pelletier N, Li C, Knowles AF. **Mutagenesis of lysine 62, asparagine 64, and conserved region 1 reduces the activity of human ecto-ATPase (NTPDase 2).** *Biochemistry*. Jun 5; 46(22):6617-27, 2007.

Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie ÉG, Sévigny J, Dranoff J. **Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2.** *J Biol Chem*. 280: (24): 22986–22992, 2005.

Jones, PCT. **A unifying hypothesis of cell adhesion.** *Nature*. 212, 365-369, 1966.

Junger, Wolfgang G. **Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling.** *Nature Reviews Immunology*, March 11, 201-212, 2011.

Kaczarek E, Zapf S, Bouterfa H, Tonn JC, Westphal M, Giese A. **Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype.** *Int J Dev Neurosci* 17(5-6):625-41, 1999.

Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, Blusztajn JK, Trinkaus-Randall V, Weisman GA, Robson SC. **Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways.** *Thromb Haemost. Apr*; 93(4):735-42, 2005.

Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. **Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR.** *J Neurochem. Sep*; 94(5):1169-79, 2005.

Knowles AF. **The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions.** *Purinergic Signal. Mar*; 7(1):21-45, 2011.

Koziak K, Kaczmarek E, Kittel A, Sévigny J, Blusztajn JK, Schulte Am Esch J 2nd, Imai M, Guckelberger O, Goepfert C, Qawi I, Robson SC. **Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae.** *J Biol Chem. Jan 21*; 275(3):2057-62, 2000.

Krakstad C, Chekenya M. **Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics.** *Mol Cancer. Jun 1*; 9:135, 2010

Kumar S, Weaver VM. **Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell.** *Cancer Metastasis Rev. Jun*; 28(1-2):113-27, 2009.

Lenz G, Gottfried C, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Nie WJ, Kang Y, Neary JT. **P<sub>2</sub>Y purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes.** *Br J Pharmacol. Mar*; 129(5):927-36, 2000.

Lenz G, Gonçalves D, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Neary JT. **Extracellular ATP stimulates an inhibitory pathway towards growth factor-induced cRaf-1 and MEKK activation in astrocyte cultures.** *J Neurochem. May*;77(4):1001-9. 2001

Liang CC, Park AY, Guan JL. **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** Nat Protoc 2(2):329-33, 2007.

Lin CQ, Bissell MJ. **Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix.** FASEB J. Jun; 7(9):737-43, 1993.

Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu DT, Botchway SW, Webb SE, Mongrand S, Maurel C, Martin-Fernandez ML, Kleine-Vehn J, Friml J, Moreau P, Runions J. **Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins.** Proc Natl Acad Sci USA 109(31):12805-10, 2012.

Mateo J, Harden TK, Boyer JL. **Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase.** Br J Pharmacol. Sep; 128(2):396-402, 1999.

Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO. **In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model.** BMC Cancer. 23: (6): 226, 2006.

Munkonda MN, Kauffenstein G, Kukulski F, Lévesque SA, Legendre C, Pelletier J, Lavoie EG, Lecka J, Sévigny J. **Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists.** Biochem Pharmacol. Nov 15; 74(10):1524-34, 2007.

Neary JT, Kang Y, Shi YF, Tran MD, Wanner IB. **P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions.** Novartis Found Symp.; 276:131-43; discussion 143-7, 233-7, 275-81, 2006.

Neary JT, Zimmermann H. **Trophic functions of nucleotides in the central nervous system.** Trends in Neurosciences 32: 189-198, 2009.

Ohana G, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P. **Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor.** J Cell Physiol. Jan; 186(1):19-23, 2001.

Paddock, SW. **Confocal microscopy methods and protocols.** Volume 122. Totowa: Editora Humana Press. 1999

Perego C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Póla S, Cattaneo MG, Francolini M, Vicentini LM, Pietrini G. **Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system.** Journal of Cell Science. 115: 3331-3340, 2002.

Plesner L. **Ecto-ATPases: identities and functions.** Int Rev Cytol 158:141-214, 1995.

Ralevic V, Burnstock G. **Receptor for purines and pyrimidines.** Pharmacol, 50: 413-492, 1998.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. **Trophic effects of purines in neurons and glial cells.** Prog Neurobiol. Dec; 59(6):663-90, 1999.

Reits EA, Neefjes JJ. **From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.** Nat Cell Biol. Jun; 3(6):E145-7, 2001.

Robson S, Sévigny J, Zimmermann H. **The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.** Purinergic Signal. 2: 409–430, 2006.

Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. **The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function.** J Neurosurg. Aug; 69(2):155-70, 1988

Sadej R, Skladanowski AC. **Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells.** Acta Biochim Pol; 59(4):647-52, 2012.

Schetinger MR, Morscha VM, Bonanb CD, Wysec ATS. **NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health.** BioFactors. 31:77–98, 2007.

Smith TM, Kirley TL. **Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases.** Biochim Biophys Acta. Jul 28; 1386(1):65-78, 1998.

Stout JG, Brittsan A, Kirley TL. **Brain ECTO-Mg-ATPase is not the neural cell adhesion molecule.** Biochem Mol Biol Int. Aug; 33(6):1091-8, 1994.

Stout JG, Kirley TL. **Purification and characterization of the ecto-Mg-ATPase of chicken gizzard smooth muscle.** J Biochem Biophys Methods 29(1):61-75, 1994.

Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Galkina SI, Pushkareva MA, Ullrich V. **Involvement of ecto-ATPase and extracellular ATP in polymorphonuclear granulocyte-endothelial interactions.** FEBS Lett. Feb 20; 423(2):243-8, 1998.

Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. **CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. Mar; 20(2):103-7, 2012.

Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Yokote H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. **SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion.** Int J Cancer. Mar 1; 124(5):1072-80, 2009

Thomas P, Smart TG. **HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins.** J Pharmacol Toxicol Methods. May-Jun; 51(3):187-200, 2005.

Tran MD, Wanner IB, Neary JT. **Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures.** J Neurochem. Apr; 105(1):272-86, 2008.

- Vagin O, Dada LA, Tokhtaeva E, Sachs G. **The Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer as a cell adhesion molecule in epithelia.** *Am J Physiol Cell Physiol* 302(9):C1271-81, 2012.
- Viollet C, Doherty P. **CAMs and the FGF receptor: an interacting role in axonal growth.** *Cell Tissue Res. Nov*; 290(2):451-5, 1997.
- von Kügelgen I, Wetter A. **Molecular pharmacology of P2Y-receptors.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. Nov*; 362(4-5):310-23, 2000.
- Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N. **Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin.** *Purinergic Signal. Sep*; 1(3):259-70, 2005.
- Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR. **The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis.** *Int J Cell Biol* 2012:340296, 2012.
- Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. **Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM.** *J Biol Chem. Sep 27*; 277(39):36216-22, 2002.
- Wang JJ, Sanderson BJ, Zhang W. **Significant anti-invasive activities of  $\alpha$ -mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines.** *Anticancer Res. Sep*; 32(9):3805-16, 2012.
- Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. **Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells.** *J Cancer Res Clin Oncol. Mar*; 134(3):365-72, 2008.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJF, Battastini AMO. **Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions.** *Neurochem Int* 43:621-628, 2003.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sevigny J, Battastini AM, Robson SC. **Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes.** *Neuroscience* 138:421-432, 2006.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ, Battastini AM. **Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions.** *Neurochem Int.* 43(7): 621-628, 2003.
- Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartsmann G, Sarkis JJ, Battastini AM. **Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines.** *Cancer Letters.* 198: 211 - 218, 2003.
- Wu Y, Sun X, Enyoji K *et al.* **NTPDase1 interacts with RanBPM to directly modulate Ras activation and cellular proliferation in liver regeneration following partial hepatectomy.** *Hepatology.* Volume 40, Issue Supplement S4, page 62A, poster #135, 2004.



Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, Dwyer KM, Bianchi E, Usheva A, Robson S. **RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity.** *Biochem. J.* 396: 23–30, 2006.

Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J. **Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin.** *J Cell Biol.* Jan 31; 168(3):441-52, 2005.

Yu T, Junger WG, Yuan C, Jin A, Zhao Y, Zheng X, Zeng Y, Liu J. **Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation.** *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar; 298(3):C457-64, 2010.

Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. **Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes.** *Biochem Soc Trans.* Jun; 32(Pt3):416-20, 2004.

Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G. **Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells.** *Cancer Sci.* 100 (9): 1655-62, 2009.

Zheng PP, Severijnen LA, van der Weiden M, Willemsen R, Kros JM. **Cell proliferation and migration are mutually exclusive cellular phenomena in vivo: implications for cancer therapeutic strategies.** *Cell Cycle.* Mar 15;8(6):950-1, 2009.

Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L. **RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion.** *Clin Exp Metastasis.* 24(6):439-48, 2007.

Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. **Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix.** *Cancer Biol Ther.* Mar; 6(3):426-31, 2007.

Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, Ou Z, Yin L. **Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo.** *Oncol Rep.* Jun; 17(6):1341-6, 2007.

Zimmerman H. **Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature.** *Drug. Dev. Res.*, 52: 44-56, 2001.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. **Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases.** *Purinergic Signal* 8(3):437-502, 2012.

Zimmermann H. **Purinergic signaling in neural development.** *Semin Cell Dev Biol.* Apr;22(2):194-204, 2011.

Elsevier Editorial System(tm) for BBA - Biomembranes  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Role of NTPDase2 in adhesion

Article Type: Regular Paper

Keywords: NTPDase2;  
Adhesion;  
Proliferation;  
Migration;  
FRAP

Corresponding Author: Dr. Marcia Rosangela Wink, PhD

Corresponding Author's Institution: UFCSPA

First Author: Franciele C Kipper, Msc

Order of Authors: Franciele C Kipper, Msc; Alessandra S Tamajusuku, PhD; Darlan C Minussi, Msc; José E Vargas, PhD; Ana Maria O Battastini, PhD; Elzbieta Kaczmarek, PhD; Simon C Robson, PhD; Guido Lenz, PhD; Marcia Rosangela Wink, PhD

Abstract: NTPDase2 is an ectonucleotidase anchored in the plasma membrane through two transmembrane domains, with the catalytic site facing the extracellular space. Its main function is the hydrolysis of nucleoside triphosphates turning them into diphosphate nucleosides plus inorganic phosphate. Some proteins, such as immunoglobulin, combine ecto-ATPase activity with cell adhesion function. Some studies suggest that NTPDase1 and Ecto-5'-nucleotidase (CD73/E5NT) may play a role in cell adhesion, proliferation and migration in vitro. However, the role of NTPDase2 in these processes has not been studied. Our results show that overexpression of NTPDase2 in HEK293, COS-7 and HeLa cells affects neither proliferation nor cell migration, but decreases the adhesion of stable transduced cells to some extracellular matrices. Moreover, we demonstrate that transduced NTPDase2 does not concentrate at the cell-cell contact sites. Measurements of the time necessary to fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), indicate an increased NTPDase2-EYFP mobility in free membrane regions, compared to cell-cell contacts, arguing against homophilic interactions. Taking together our data indicates that NTPDase2 is not a direct player in adhesion, only affecting it through its enzymatic activity.

Suggested Reviewers: Terry L Kirley PhD  
Professor, Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati  
terry.kirley@uc.edu

This researcher is an expert in structure and function of ecto-ATPases and ecto-apyrases.

Jean Sevigny PhD  
Professor, Department of microbiology, infectious diseases and immunology, Université Laval  
jean.sevigny@crchul.ulaval.ca  
This researcher is an expert in the Purinergic field, having published many papers related with NTPDase2 structure and function.

Alexander H Ulrich PhD

Associated Professor, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo

henning@iq.usp.br

This researcher is an expert in Purinergic Signaling and Director of Brazilian Purines Club.

Andrzej C Skladanowski PhD

Professor, Department of Molecular Enzymology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk

acskla@gumed.edu.pl

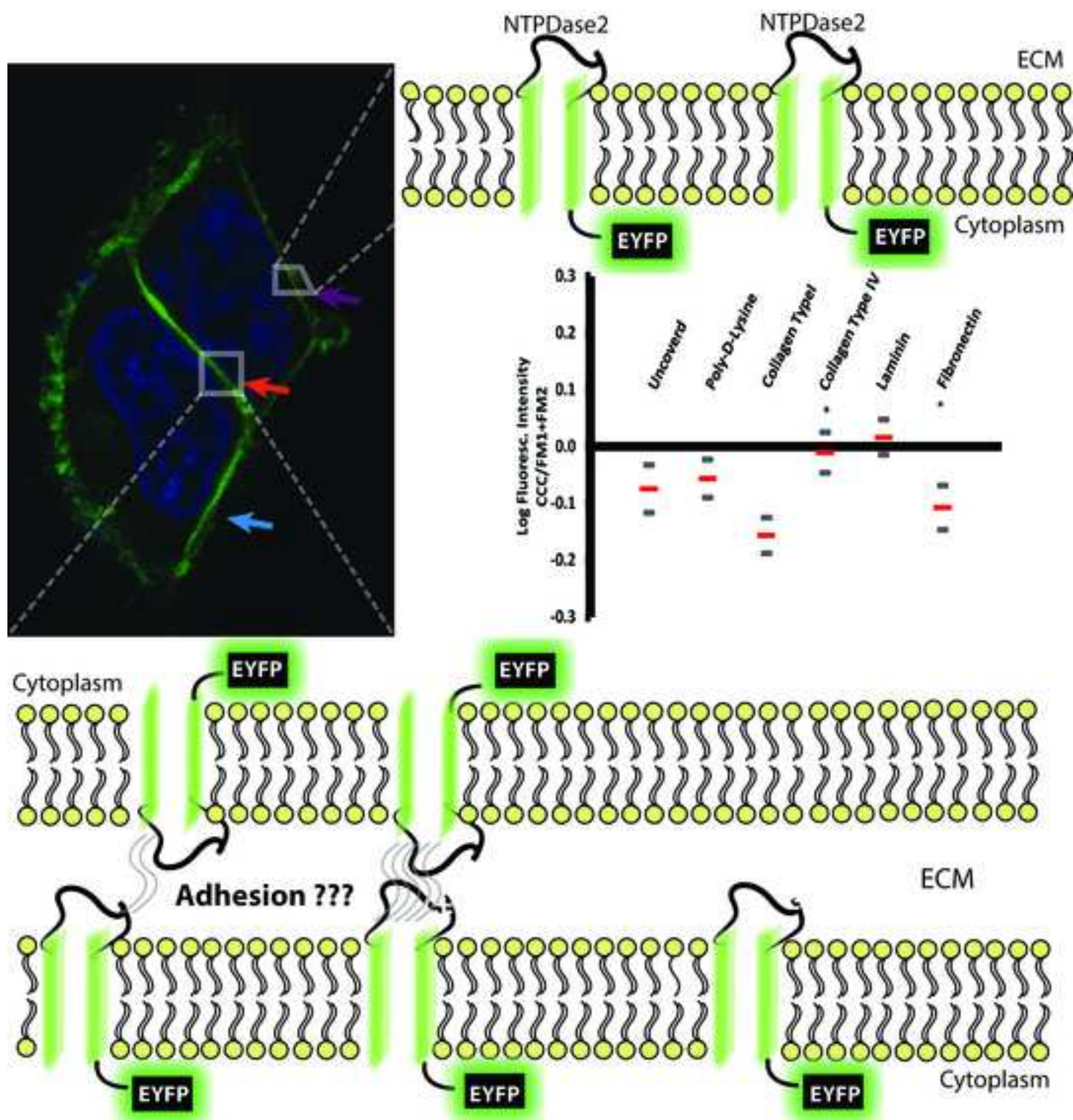
This researcher works with the 5'-ectonucleotidase and its role in cell adhesion.

Dear Dr. Shai, executive editor of BBA Biomembranes:

Please find enclosed our manuscript entitled: "Role of NTPDase2 in adhesion" by Franciele Kipper and collaborators. In this work we investigate the role of NTPDase2 in cell and matrix adhesion, by stably transducing cells with the fluorescent-tagged NTPDase2. The localization of EYFP-NTPDase2 was evaluated by tools as FRAP and confocal microscopy. This work fills an important hole in the Purinergic field, since for many years it was not clear as to whether this ectonucleotidase could also act as an adhesion protein.

My best regards,

Márcia Rosângela Wink



## Role of NTPDase2 in adhesion

Franciele Cristina Kipper<sup>1</sup>, Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku<sup>2</sup>, Darlan Conterno Minussi<sup>3</sup>, José Eduardo Vargas<sup>1</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>4</sup>, Elzbieta Kaczmarek<sup>5</sup>, Simon C. Robson<sup>6</sup>, Guido Lenz<sup>1</sup>, Márcia Rosângela Wink<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>*Biophysics Department and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre;* <sup>2</sup>*Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana,* <sup>3</sup>*Cellular Biology laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA),* <sup>4</sup>*Nucleotides Hydrolysis laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS,) Brazil,* <sup>5</sup>*Center for Vascular Biology Research, Department of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA,* <sup>6</sup>*Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA.*

\*Corresponding author: Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

Email: [marciawink@yahoo.com.br](mailto:marciawink@yahoo.com.br); [mwink@ufcspa.edu.br](mailto:mwink@ufcspa.edu.br)

FAX: +55 (51) 3303-8810

*Keywords: NTPDase2. Adhesion. Proliferation. Migration. FRAP.*

### List of abbreviations

ACR = Apyrase Conserved Domain

CCC = cell-cell contact

CR = Conserved Region

RB2 = Reactive Blue 2

FM = free membrane region

FRAP = Fluorescence Recovery After  
Photobleaching

## ABSTRACT

NTPDase2 is an ectonucleotidase anchored in the plasma membrane through two transmembrane domains, with the catalytic site facing the extracellular space. Its main function is the hydrolysis of nucleoside triphosphates turning them into diphosphate nucleosides plus inorganic phosphate. Some proteins, such as immunoglobulin, combine ecto-ATPase activity with cell adhesion function. Some studies suggest that NTPDase1 and Ecto-5'-nucleotidase (CD73/E5NT) may play a role in cell adhesion, proliferation and migration *in vitro*. However, the role of NTPDase2 in these processes has not been studied. Our results show that overexpression of NTPDase2 in HEK293, COS-7 and HeLa cells affects neither proliferation nor cell migration, but decreases the adhesion of stable transduced cells to some extracellular matrices. Moreover, we demonstrate that transduced NTPDase2 does not concentrate at the cell-cell contact sites. Measurements of the time necessary to fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), indicate an increased NTPDase2-EYFP mobility in free membrane regions, compared to cell-cell contacts, arguing against homophilic interactions. Taking together our data indicates that NTPDase2 is not a direct player in adhesion, only affecting it through its enzymatic activity.

## 1. Introduction

NTPDases are nucleotide-specific enzymes hydrolyzing nucleoside tri- and diphosphates to monophosphates and inorganic phosphate [1]. The extracellular NTPDase family consists of four members, NTPDase 1, 2, 3, and 8, characterized by the presence of transmembrane domains and a catalytic domain exposed towards the extracellular milieu. These enzymes are ubiquitously distributed in various tissue types with different levels of mRNA and protein expression. Moreover, these four enzyme subtypes have specific activities towards their substrates, ATP and ADP.

NTPDase2 was first cloned more than 20 years ago. Like the other members of this family, it consists of five extracellular apyrase conserved regions (ACR) and four conserved regions (CR). Contrary to other NTPDases, it has a distinct higher preference for ATP when compared to ADP [2].

A small group of proteins presents ectonucleotidase activity together with a clear function in adhesion as observed in Cell-CAM 105, an adhesion protein, which sequence has been shown to be identical to rat liver ATPase [3, 4]. Dzhandzhugazyan and Bock showed a  $\text{Ca}^{+2}\text{-Mg}^{+2}\text{-ATPase}$  activity in neural cell adhesion molecule (NCAM) in 1993, which were reinforced by the same authors in 1997 [5, 6]. Also, immunoglobulins, which are involved in homophilic and heterophilic adhesion, have an ATPase site in their structure [7, 8]. However, little is known about the role of ectonucleotidases in adhesion. There are reports of the involvement of the 5'Nucleotidase CD73 in cell-cell adhesion and metastasis formation [9-11], and in cell-matrix adhesion [12, 13]. It was shown that NTPDase1 may affect cell adhesion indirectly, through the binding with RanBPM [14] that interacts with adhesion molecules, such as integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) [15]. To the best of our knowledge, there are no other studies associating NTPDases with adhesion function. In order to address this question, we constructed a chimera of NTPDase2 linked with EYFP and performed assays of cell-cell and cell-matrix adhesion, as well as the analysis of other cell process that NTPDase2 could be involved, such as cell proliferation and migration.



## **2. Material and methods**

### **2.1. Cell lines culture**

HEK293 and COS-7 cells (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) were grown in DMEM with high glucose containing 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 250 µg amphotericin B, 100U penicillin/mL, 100µg streptomycin/mL (all from Gibco BRL) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL). HeLa and U87 cells (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) were cultured in the same medium but with low glucose concentration. Cells were cultured at 37°C, with 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> in air.

### **2.2. Primary culture**

Primary rat astrocyte cultures were prepared as previously described [16]. The protocol was approved by the UFCSPA Research Ethical Committee at number 127/12. Briefly, the hippocampus, cortex and cerebellum of Wistar rats (1–2 days old) were removed, and dissociated mechanically. The cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in DMEM high glucose (Gibco BRL) containing 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 U penicillin and 100 µg streptomycin (all from Gibco BRL) supplemented with 10% FBS in 24-well plates pre-treated with poly-D-lysine. Cultures were maintained for 21–28 days with medium changed every 2-3 days and then used to perform the cell-cell adhesion experiments.

### **2.3. DNA construction**

Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)-NTPDase2 was constructed by inserting NTPDase2 from pGW1-hCD39L1 (gift from Dr. Guido Guidotti) using *EcoRI* restriction site into the PBS-SKII plasmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA). After sequencing, the gene was inserted into pEYFP-C1 vector (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) using *BamHI* and *SalI* restriction sites. Plasmid containing enhanced green fluorescent protein (EGFP) was used as a control (Invitrogen). Schemes of the constructs were drawn in pDraw ([www.acaclone.com](http://www.acaclone.com)) (Fig 1A).

#### **2.4. Stable transduction**

Lentiviruses were produced by co-transfecting the NTPDase2-EYFP plasmid with the helper plasmids pRSVREV, pVSV-G and pMDLgRRE [17] in sub-confluent HEK293 cells using Superfect Reagent (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Three days after transfection, supernatants were collected every day for one week, filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane and used immediately or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . One mL of medium containing virus was added to target cells (HEK293 or U87), also at sub-confluent stage ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) in 24-well plates, together with 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polybrene, and incubated overnight. Cells were grown for 48 h to express the fluorescent protein and fluorescent colonies were isolated and expanded.

#### **2.5. Transient transfection**

COS-7 and HeLa cells were seeded in 12 or 24-well plates and grown in DMEM with 10% FBS. Cells at 80% confluence were transfected with 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  of pNTPDase2-EYFP (COS-7 NTPDase2-EYFP and HeLaNTPDase2-EYFP) or pEGFP vector (COS-7 EGFP and HeLa EGFP) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) in accordance to the manufacturer's instructions. The transfected cells were used in migration assays.

#### **2.6. Flow cytometry**

For quantification of NTPDase2-EYFP positive cells, the cells monolayer were enzymatically dissociated with 0.1% trypsin for 5 minutes, and reaction was stopped with culture medium containing 10% SFB. The live cells in suspension were then analyzed by flow cytometry using a PCA-96 System (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

#### **2.7. ATPase activity assay**

The ATPase activity was determined in HEK293 cells as described previously [18] in the incubation medium (2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES [pH 7.4], and 3 mM ATP) at  $37^{\circ}\text{C}$ . The release of inorganic phosphate (Pi) and the protein concentration were measured by the Malachite Green [19] and Coomassie Blue methods [20], respectively. Specific activity was expressed in nmol Pi released/min/mg protein.

## **2.8. NTPDase2 inhibition**

In order to test the possible effects of P2 receptor antagonists described as NTPDase inhibitors [21], cells were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of Suramin (0.1 and 0.3 mM), Reactive Blue 2 (RB2; 0.1 mM) and Evans Blue (0.1 mM). Subsequently, cells were incubated for 10 min in the incubation medium with 3 mM ATP as described above. All assays were performed in triplicate. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein. The RB2 (0.1 mM) inhibitor was also used in the adhesion assay.

## **2.9. Determination of population doublings**

HEK293 wild type or HEK293 transduced with NTPDase2-EYFP were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well in DMEM with 10% FBS in 24-well plates. The cells were counted at 3, 6 and 10 days after plating using a hemocytometer. In these indicated days the cells were resuspended, counted and the initial cell number ( $1 \times 10^5$ ) was reseeded. Population doublings (PD) were determined according to the formula  $PD = [\log N(t) - \log(N(t_0))]/\log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells counted per well at time of passage; and  $N(t_0)$  is the number of cells seeded at the previous passage ( $1 \times 10^5$ ). The sum of PDs was then plotted against time of culture [22].

## **2.10. Scratch wound assay**

Cells were cultured in 12-well plates and transfected as described above. After two days, subconfluent cultures were scratched using a fine micropipette tip. The monolayer was washed with PBS followed by fresh medium addition and the images were taken immediately, and after 6, 24 and 48 h [23]. The scratched areas were measured using the software ImageJ<sup>®</sup>. The healing percentage was plotted versus time after scratch.

## **2.11. Cell adhesion**

### **2.11.1. Cell matrix adhesion**

In order to perform matrix adhesion assays, 96-well plates were pre-coated with different extracellular matrices: poly-D-lysine (100  $\mu$ g/mL), collagen type I (20  $\mu$ g/mL), collagen type IV (20  $\mu$ g/mL), laminin (20  $\mu$ g/mL) and fibronectin (20  $\mu$ g/mL) overnight at 4°C. The wells were washed twice with PBS and  $1 \times 10^5$

cells/well were allowed to adhere in culture medium with 10% FBS for 30 min. Non-adherent cells were removed by washing three times with PBS. Adherent cells were fixed with 4% formaldehyde, stained with 0.5% crystal violet and washed again with PBS. Cell-bound crystal violet was eluted in 100  $\mu$ L 10% acetic acid (v/v) for OD measurement at 570 nm in microplate reader [24].

U87 cells transduced with NTPDase2-EYFP (around 2% of population) or GFP (around 4% of population) were detached from flasks and allowed to adhere over plastic in a 24-wells plate. After 20, 30, 40 and 50 min, the non-adherent cells (called as floating cells) were collected. The adhered cells that remained on wells were enzymatically dissociated and collected. The floating or adhered fluorescent cells were counted and the ratio between adhered and floating cells was determined.

#### **2.11.2. Cell-cell adhesion**

The cell-cell adhesion experiments were done by plating for 15 min,  $1.5 \times 10^5$  HEK293 cells transduced with NTPDase2-EYFP or EGFP over the monolayer of rat astrocytes obtained from primary cultures of cortex, cerebellum and hippocampus as described above. After this time the non-adherent cells were washed out and counted in hemocytometer [25].

#### **2.12. Fluorescence intensity**

In order to compare the NTPDase2-EYFP concentration in cell-cell contacts with free membrane regions, the transduced HEK293 cells were seeded on glass coverslips placed in a 24-well plate and grown until semi-confluence. The coverslips with monolayers of live cells were mounted over glass slide and sealed with nail polish, without fixing. Cells were immediately analyzed by confocal microscopy (Olympus FluoView™ 1000) to quantify the fluorescence intensity accumulated in cell-cell contacts (CCC) or free membrane (FM) (Fig 4A). The fluorescence intensity was measured using the software ImageJ.

#### **12.4. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)**

FRAP was performed with the confocal Olympus FluoView™ 1000 microscope using the slides covered with live cells as described above. The

conditions of laser intensity and time for photobleaching were standardized to abolish almost 80% of fluorescence. After that, two scans at laser low intensity filled circles in different regions of cell-cell contacts or free membrane were bleached for 2-8 s using a 488 and 405 nm laser at high intensity. The bleached areas were scanned for 2 min using laser low intensity (Supplementary Fig 3). The regions of interest (ROIs) in the obtained images were measured using the software ImageJ. To calculate the relation (R) between the time to half recovery in the cell-cell contacts compared to free membrane we use the formula:  $R = (F_e - F_0) / (F_i - F_0)$ , where  $F_e$  is the fluorescence at the end of the experiment,  $F_i$  is the fluorescence at the beginning and  $F_0$  is the fluorescence just after bleaching [26].

### 3. Results

#### ***3.1 Functionality of the NTPDase2-EYFP chimera***

The efficiency of transduction was confirmed by flow cytometry (Supplementary Fig 1). The analysis of the HEK293 stable transduced with the NTPDase2 chimera by fluorescence microscopy showed that the enzyme is localized almost exclusively in the cell membrane (Fig 1B). The expressed enzyme, compared to the control EGFP vector, has a high ATPase activity, which could be partially inhibited by the non-specific NTPDase2 inhibitor, Reactive Blue 2 [27] (Fig 1C) and Evans Blue [18] (data not shown). Incubation with inhibitors induced changes in cell morphology in both, control and NTPDase2-transduced cells (Fig 1D). The ATPase activity measured in the HEK293 transduced cells was similar to that found in astrocytes under physiologic conditions (the highest ecto-ATPase activity measured in non-transformed cells) [16, 18].

In the cell line U87, the majority of the chimeras were localized at the cell membrane, although some intracellular fluorescence was also observed (Supplementary Fig 1 and Supplementary Fig 2A). The functionality of the plasmid encoding the EGFP or NTPDase2-EYFP genes was confirmed by evaluating the ATPase activity in the same way that described to HEK293. Despite the ATPase activity in U87 transduced cell line be smaller than in

HEK293, due to only 2% of effectively transduced cells, the increase in the ATP degradation was more than 14 times in relation to EGFP only (Supplementary Fig 2B).

### **3.2. *NTPDase2 does not alter cell proliferation and migration***

The overexpression of NTPDase2 neither altered the cell proliferation measured by cumulative population doubling assay in HEK293 cells (Fig 2A), nor migration, as evaluated by the scratch wound assay in COS-7 (Fig 2B and 2C) and HeLa cells (data not shown). We were not able to measure migration in HEK293 cells because this cell line presented a high proliferation rate, and a very low migration rate (data not shown).

### **3.3 *NTPDase2 overexpression can modify cell-matrix adhesion***

According to previous reports, some adhesion molecules, including immunoglobulin [3, 8], Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer [28], and CD73/E5NT [29] demonstrate nucleotidase activity. While the two first ATPases are involved in homophilic interactions in cell-cell adhesion, the CD73/E5NT plays a role in adhesion to matrix proteins [12]. Therefore we evaluated both cell-matrix and cell-cell adhesion. To investigate cell-matrix adhesion we used five matrices, poly-D-lysine, collagen type I, collagen type IV, laminin and fibronectin, plus uncovered plastic wells. The NTPDase2-EYFP-transduced HEK293 cells seeded on uncovered plastic or collagen type IV wells had a significantly reduced cell-matrix adhesion compared to EGFP-expressing cells. A decreased adhesion tendency was observed for all matrices tested (Fig 3A). This reduced adhesion on plastic was confirmed also in another cell line, the glioma U87 (Fig 3B). These results suggest that NTPDase2 is not actively involved in mediating cell-matrix adhesion, but rather negatively affects adhesion.

The role of NTPDase2 in cell-cell adhesion was analyzed through a model using a monolayer of cells as the adhesion substrate. The HEK293 cells overexpressing NTPDase2 were seeded over three different monolayers of astrocyte cultures. The monolayers chosen were primary rat astrocytes from cortex, cerebellum and hippocampus, which express different levels of endogenous NTPDase2 [16, 18]. In this model of adhesion, NTPDase2 did not significantly influence cell-cell adhesion with primary astrocytes (Fig 3C and D).

### **3.4. NTPDase2 does not localize in cell-cell contacts**

In order to evaluate whether the NTPDase2-EYFP would be localized at the cell-cell contacts or in free membrane regions, we measured the fluorescence intensity of transduced cells seeded over different extracellular matrices (Fig 4A).

The cell-cell contact regions (CCC region) had similar fluorescence intensities when compared to the sum of the fluorescence intensity of the two free membranes areas (FM 1 and 2) of the same cells (Fig 4A). This was observed when cells were grown in all substrates tested, except collagen type I and fibronectin, in which the fluorescence in the CCC region was smaller when compared to the FM region (Fig 4B). These results argue against homophilic interactions capable of concentrating NTPDase2 in the cell-cell adhesion sites.

FRAP assay was used to measure diffusion of the protein on the membrane plane and did not show significant differences between the half-time of fluorescence recovery of paired cell-cell contact and lateral membranes (Fig 4C and Supplementary Fig 3A and 3B). This indicates that NTPDase2 located in cell-cell contacts is not differentially linked to cytoskeleton or adhesion complexes, when compared to that localized in free membrane areas.

## **4. Discussion**

The history involving extracellular nucleotide and nucleoside degrading enzymes acting in adhesion dates back to the nineties, when the immunoglobulin Cell-CAM 105 was shown to have an ecto-ATPase activity [3, 8]. Recently, Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer [28] was reported to be directly involved in adhesion. In the same way, CD73/E5NT was shown to be involved in this cellular process [12, 13, 29]. Among the NTPDases, NTPDase1 might be indirectly linked to adhesion proteins, since it binds to RanBPM that is known to interact with many proteins. One of them is LFA-1, an integrin that in turn, mediates cell-cell and cell-matrix interactions [15, 30]. ATP seems to be important in proliferation and migration as well as in cell adhesion. In 1990, Aurivillius stated that: "*Interactions between the Ig-domains of C-CAM may be the structural basis for the specific homophilic interaction*". Binding and

hydrolysis of ATP may then modify this interaction in a manner similar to the ATP-regulated binding between actin and myosin” [3]. This suggests that the association among immunoglobulins could be modulated through the ATP present in the extracellular compartment. Additionally, extracellular ATP acting through purinergic receptors, can stimulate N-cadherin expression and its localization on astrocytes surface, thus indirectly affecting cell adhesion [31].

In our study, we observed a trend towards decreased cell-matrix adhesion caused by NTPDase2 overexpression. One hypothesis for this disturbance would be the ATP depletion caused by NTPDase2 enzymatic activity. Minimal mechanical alterations such as resuspension and reseeding of cells may cause a release of ATP in the culture medium [32]. Since it was shown that some cells can release ATP to guide chemotaxis, in concentrations as low as 100 nM [33, 34] and induce expression of adhesion molecules [31, 35], the depletion of ATP due to NTPDase2 overexpression, could therefore, block this process. The fact that NTPDase2 may modulate adhesion when cells are seeded on different extracellular matrices, reinforces the idea that the enzymatic depletion of ATP is an important player in the observed effect. Additionally, our unpublished results suggest that the non-specific NTPDase inhibitor, suramin is capable to partially revert the decrease in adhesion caused by NTPDase2 overexpression in U87 cells.

The NTPDase2 is a key protein in brain during neurogenesis. Knockout animals for this enzyme had an increased cell proliferation in the subependymal zone and hippocampus [1, 36]. NTPDase2 expression appears first in the border cells of ventricular zone. Later, its expression disappears from this zone and appears in sheaths around subependymal doublecortin-positive cells, suggesting a role in neuronal migration [36, 37]. We did not observe changes in *in vitro* migration of NTPDase2-transduced cells. This could be due to the absence of a gradient in the ATP concentration [34] knowing that ATP is a strong chemo attractant [33, 34, 36].

We conclude that NTPDase2 is not directly involved in HEK293 and COS-7 cell proliferation or migration. The enzyme expression was not increased in cell-cell contact regions and its overexpression decreased the cell adhesion to selected matrices. Considering the high affinity of NTPDase2 to ATP, it is



possible that degradation of this nucleotide is responsible for the decreased adhesion observed in NTPDase2-transduced cells.

**Conflict of interest:** We declare that we have no conflict of interest.

### **Fouding:**

This work was supported by Pronem-FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul), process number 11/2072-2; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and Probitec-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), number 004/2012. FCK and JEV were recipient of CAPES and DCM was recipient of CNPq fellowship. AMOB, MRW and GL are recipient of CNPq research productivity fellowships.

### **References**

- [1] H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Strater, Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases, *Purinergic signalling*, 8 (2012) 437-502.
- [2] A.F. Knowles, The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions, *Purinergic signalling*, 7 (2011) 21-45.
- [3] M. Aurivillius, O.C. Hansen, M.B. Lazrek, E. Bock, B. Obrink, The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily, *FEBS letters*, 264 (1990) 267-269.
- [4] S.H. Lin, O. Culic, D. Flanagan, D.C. Hixson, Immunochemical characterization of two isoforms of rat liver ecto-ATPase that show an immunological and structural identity with a glycoprotein cell-adhesion molecule with Mr 105,000, *The Biochemical journal*, 278 ( Pt 1) (1991) 155-161.
- [5] K. Dzhandzhugazyan, E. Bock, Demonstration of (Ca<sup>2+</sup>)-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule, *FEBS letters*, 336 (1993) 279-283.
- [6] K. Dzhandzhugazyan, E. Bock, Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding, *Biochemistry*, 36 (1997) 15381-15395.
- [7] V.V. Kiselyov, V. Soroka, V. Berezin, E. Bock, Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR, *Journal of neurochemistry*, 94 (2005) 1169-1179.
- [8] C. Wai Wong, D.E. Dye, D.R. Coombe, The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis, *International journal of cell biology*, 2012 (2012) 340296.

- [9] X. Zhi, S. Chen, P. Zhou, Z. Shao, L. Wang, Z. Ou, L. Yin, RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion, *Clinical & experimental metastasis*, 24 (2007) 439-448.
- [10] P. Zhou, X. Zhi, T. Zhou, S. Chen, X. Li, L. Wang, L. Yin, Z. Shao, Z. Ou, Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix, *Cancer biology & therapy*, 6 (2007) 426-431.
- [11] X. Zhou, X. Zhi, P. Zhou, S. Chen, F. Zhao, Z. Shao, Z. Ou, L. Yin, Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo, *Oncology reports*, 17 (2007) 1341-1346.
- [12] A.R. Cappellari, G.J. Vasques, L. Bavaresco, E. Braganhol, A.M. Battastini, Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion, *Molecular and cellular biochemistry*, 359 (2012) 315-322.
- [13] R. Sadej, A.C. Skladanowski, Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells, *Acta biochimica Polonica*, 59 (2012) 647-652.
- [14] Y. Wu, X. Sun, E. Kaczmarek, K.M. Dwyer, E. Bianchi, A. Usheva, S.C. Robson, RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity, *The Biochemical journal*, 396 (2006) 23-30.
- [15] S. Denti, A. Sirri, A. Cheli, L. Rogge, G. Innamorati, S. Putignano, M. Fabbri, R. Pardi, E. Bianchi, RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 13027-13034.
- [16] M.R. Wink, E. Braganhol, A.S. Tamajusuku, E.A. Casali, J. Karl, M.L. Barreto-Chaves, J.J. Sarkis, A.M. Battastini, Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions, *Neurochemistry international*, 43 (2003) 621-628.
- [17] T. Dull, R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, L. Naldini, A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system, *Journal of virology*, 72 (1998) 8463-8471.
- [18] M.R. Wink, E. Braganhol, A.S. Tamajusuku, G. Lenz, L.F. Zerbini, T.A. Libermann, J. Sevigny, A.M. Battastini, S.C. Robson, Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes, *Neuroscience*, 138 (2006) 421-432.
- [19] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> - stimulated ATPase activity, *Analytical biochemistry*, 157 (1986) 375-380.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 248-254.

- [21] M.N. Munkonda, G. Kauffenstein, F. Kukulski, S.A. Levesque, C. Legendre, J. Pelletier, E.G. Lavoie, J. Lecka, J. Sevigny, Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists, *Biochemical pharmacology*, 74 (2007) 1524-1534.
- [22] L.L. Zamin, E.C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego, G. Lenz, Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells, *Cancer science*, 100 (2009) 1655-1662.
- [23] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature protocols*, 2 (2007) 329-333.
- [24] J.J. Wang, B.J. Sanderson, W. Zhang, Significant anti-invasive activities of alpha-mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines, *Anticancer research*, 32 (2012) 3805-3816.
- [25] E. Kaczarek, S. Zapf, H. Bouterfa, J.C. Tonn, M. Westphal, A. Giese, Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype, *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 17 (1999) 625-641.
- [26] E.A. Reits, J.J. Neefjes, From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells, *Nature cell biology*, 3 (2001) E145-147.
- [27] J. Iqbal, P. Vollmayer, N. Braun, H. Zimmermann, C.E. Muller, A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction, *Purinergic signalling*, 1 (2005) 349-358.
- [28] O. Vagin, L.A. Dada, E. Tokhtaeva, G. Sachs, The Na-K-ATPase alpha(1)beta(1) heterodimer as a cell adhesion molecule in epithelia, *American journal of physiology. Cell physiology*, 302 (2012) C1271-1281.
- [29] L. Wang, X. Zhou, T. Zhou, D. Ma, S. Chen, X. Zhi, L. Yin, Z. Shao, Z. Ou, P. Zhou, Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134 (2008) 365-372.
- [30] D. Wang, Z. Li, E.M. Messing, G. Wu, Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 36216-36222.
- [31] M.D. Tran, I.B. Wanner, J.T. Neary, Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures, *Journal of neurochemistry*, 105 (2008) 272-286.
- [32] J.T. Neary, Y. Kang, K.A. Willoughby, E.F. Ellis, Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves

extracellular ATP and P2 purinergic receptors, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (2003) 2348-2356.

[33] Y. Chen, R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P.A. Insel, W.G. Junger, ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors, *Science*, 314 (2006) 1792-1795.

[34] M.R. Elliott, F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, K.S. Ravichandran, Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance, *Nature*, 461 (2009) 282-286.

[35] J.T. Neary, Y. Kang, Y.F. Shi, M.D. Tran, I.B. Wanner, P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions, *Novartis Foundation symposium*, 276 (2006) 131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.

[36] H. Zimmermann, Purinergic signaling in neural development, *Seminars in cell & developmental biology*, 22 (2011) 194-204.

[37] V. Shukla, H. Zimmermann, L. Wang, H. Kettenmann, S. Raab, K. Hammer, J. Sevigny, S.C. Robson, N. Braun, Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus, *Journal of neuroscience research*, 80 (2005) 600-610.

## LEGENDS

**FIGURE 1 Expression of functional NTPDase2 enzyme in HEK293 cells.** A) Lentiviral control EGFP-coding vector (upper) and NTPDase2 fused to EYFP-coding vector (lower). B) HEK293-transduced cells, colonies seeded in matrix uncovered wells (magnification 100x). In more details I) Hek293 EGFP, II) HEK293 UV light, III) Hek293 NTPDase2-EYFP, IV) HEK-293 NTPDase2-EYFP UV light (magnification 400x). C) ATPase activity and D) Morphology of transduced cells with or without the NTPDase inhibitor RB2 (magnification 100x).

**FIGURE 2 NTPDase2 does not alter cell proliferation and migration.** A) Cumulative population doubling of HEK-293 cells compared to HEK-293 transduced with NTPDase2-EYFP after 10 days in culture. The results are presented as average  $\pm$  SD. B) Scratch assay in COS-7 transfected with NTPDase2-EYFP or EGFP plasmid. Pictures were taken just after scratching and 6, 24 and 48 h later (magnification 100x). C) The scratch-induced wound healing quantification from pictures showed in B. The results are presented as average  $\pm$  SD.

**FIGURE 3 NTPDase overexpression does not enhance cell-matrix or cell-cell adhesion.** A) Hek293 cell adhesion over poly-D-lysine (100  $\mu$ g/ml), collagen type I (20  $\mu$ g/ml), collagen type IV (20  $\mu$ g/ml), laminin (20  $\mu$ g/ml) and fibronectin (20  $\mu$ g/ml). After 30 min of incubation at 37  $^{\circ}$ C, adherent cells were fixed and stained with crystal violet. The results show log of OD 570 ratio of HEK-293 transduced with NTPDase2-EYFP versus cells expressing EGFP only; average is shown in red; B) U87 NTPDase2-EYFP overexpression reduced the adhesion rate, enriching the % of fluorescent cells recovered in non-adhered fraction. C) Adhesion of Hek293 NTPDase2-EYFP and EGFP-transduced cells to rat astrocytes. Cells were seeded over a confluent monolayer of rat astrocytes for 15 min, non-adherent cells were removed and counted in hemocytometer. The number of adherent cells was calculated. The results are presented as an average  $\pm$  SD. D) Visualization of HEK-293 expressing NTPDase2-EYFP seeded over the astrocyte monolayer (magnification 200x). \*  $p < 0.05$ .

**FIGURE 4 Confocal microscopy analysis of NTPDase2 expression in cell membrane.** A) An example of the fluorescent areas measured to compare fluorescence intensity. CCC: cell-cell contact, FM1 and 2: free membrane 1 and 2. B) Quantification of fluorescence intensity: intensity in cell-cell contacts divided by the sum intensity in two free membrane of the same cell. Means are shown in red and standard deviation in blue. C) Time to half recovery fluorescence ratio between cell-cell contact and free membrane regions. Cells were seeded on different extracellular matrices. Non-fixed cells regions were 80% photobleached and the half-time to fluorescence recovery of cell-cell contacts and free membrane rate is shown. Means are presented in red. \* $p < 0.05$ .

## SUPPLEMENTAL FIGURES

**SUPPLEMENTARY FIGURE 1 NTPDase2-EYFP or EGFP-transduced cells.** Glioma cell line (U87) show a diffused fluorescence signal compared to HEK-293 cells transduced with the same lentiviral construct (magnification 400x).

**SUPPLEMENTARY FIGURE 2 Analysis of NTPDase2-EYFP functionality in transduced U87 cells.** Glioma cell line presents small transduction efficiency but this was sufficient to increase the rate of ATP hydrolysis. A) Morphology and fluorescence of cells transduced with EGFP and NTPDase2-EYFP (magnification 400x). B) ATP hydrolysis was increased in NTPDase2 transduced cells and blocked by 0.1 mM Evans Blue.

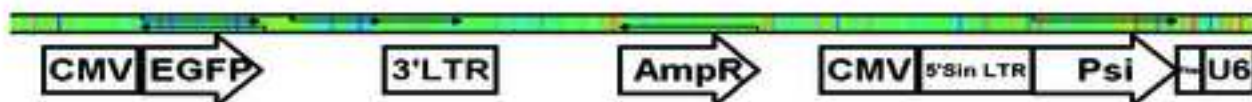
**SUPPLEMENTARY FIGURE 3 FRAP ASSAY IN HEK293 CELLS TRANSDUCED WITH NTPDASE2-EYFP.** A) Example of fluorescence recovery after photobleaching, plotted in fluorescence intensity versus time in seconds. B) Photobleached areas are pointed with arrows (magnification 600x). CCC: cell-cell contact (orange), FM1 and FM2: free membrane (purple and blue). The same areas are showed in the same colors.

Figure 1

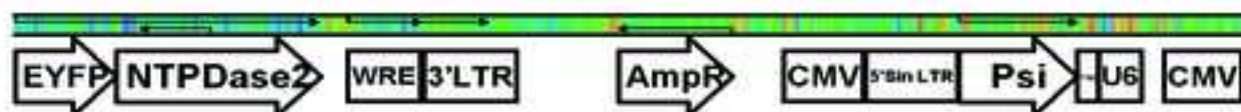
[Click here to download high resolution image](#)

A) Plasmid constructions

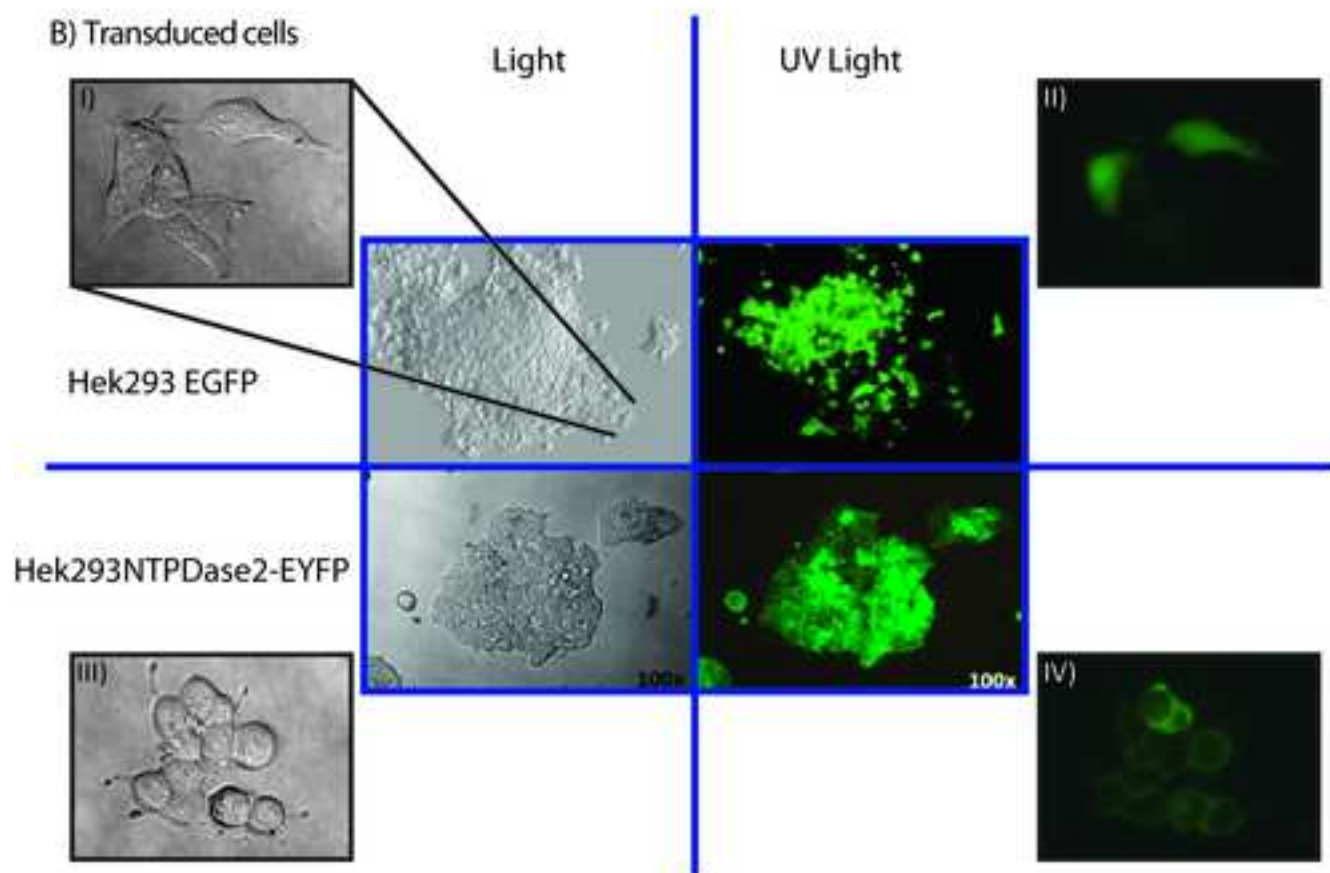
Control vector



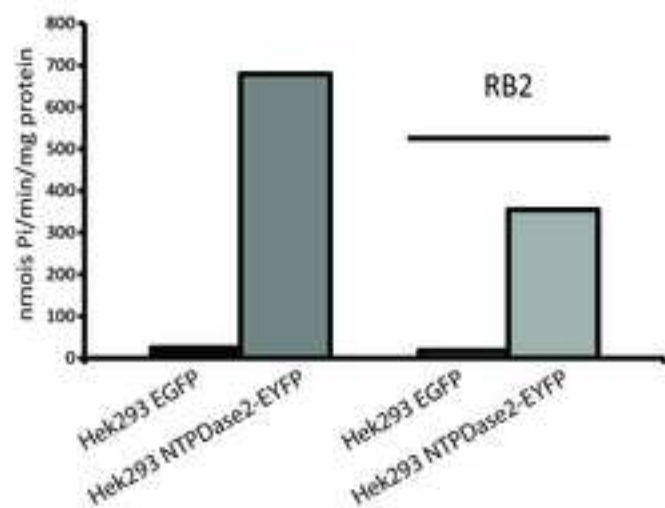
NTPDase2 vector



B) Transduced cells



C) Protein functionality



D) Morphology after inhibitor treatment

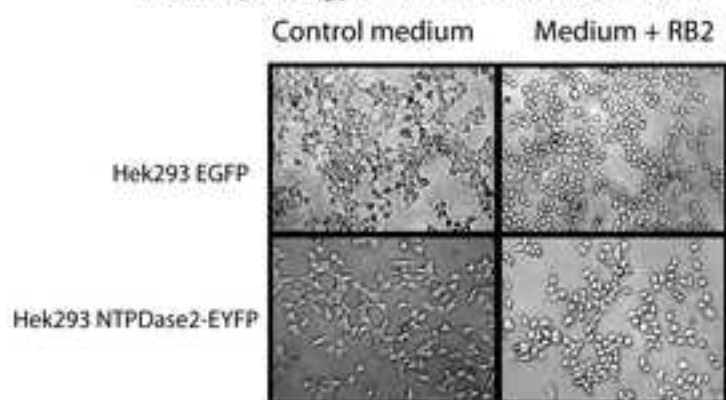
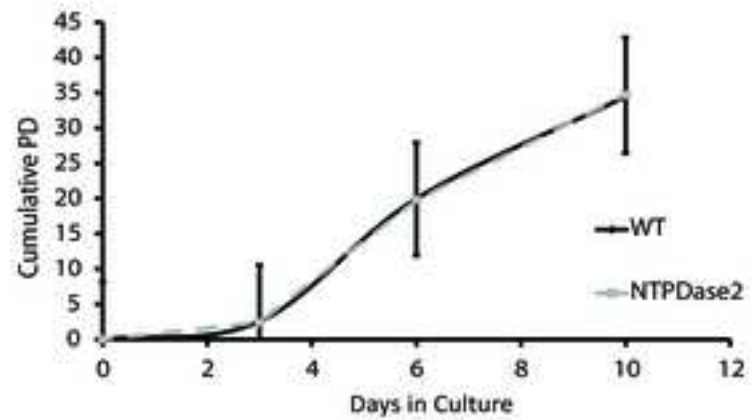
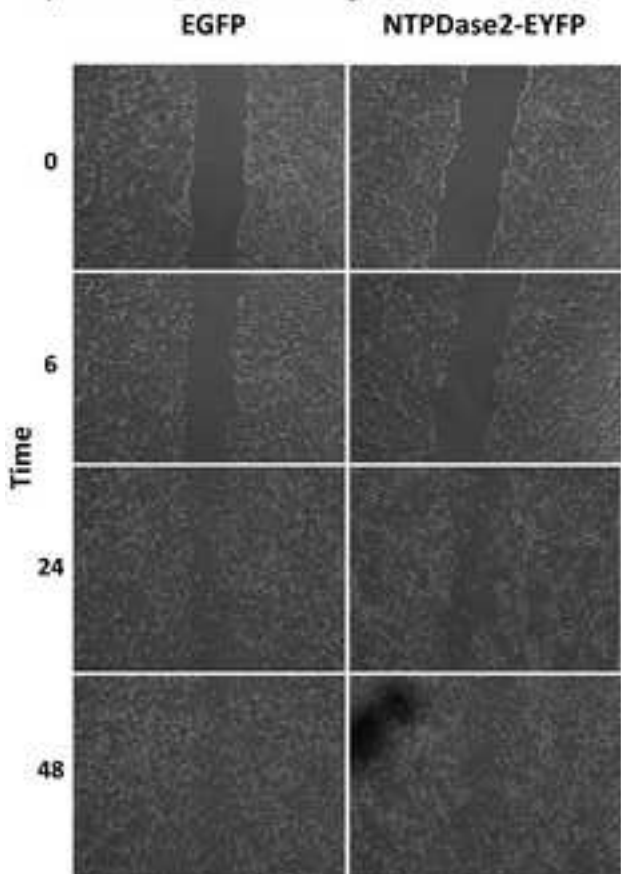


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

A) Cumulative population doubling



B) Cos-7 transfected cells migration



C) Quantification Cos-7 migration

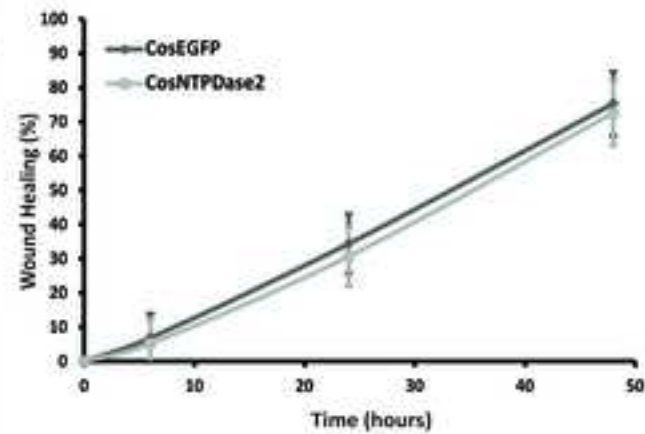




Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

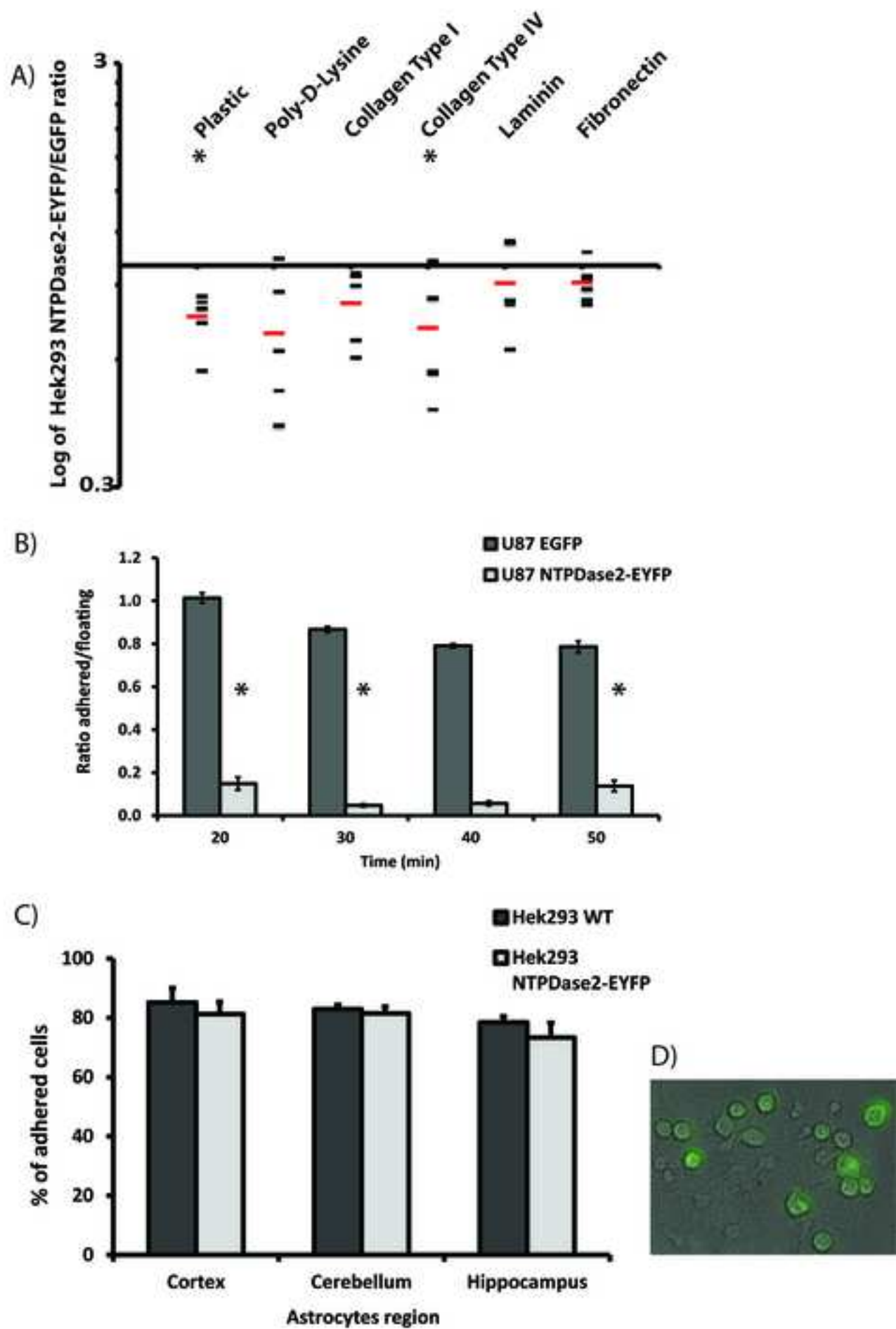
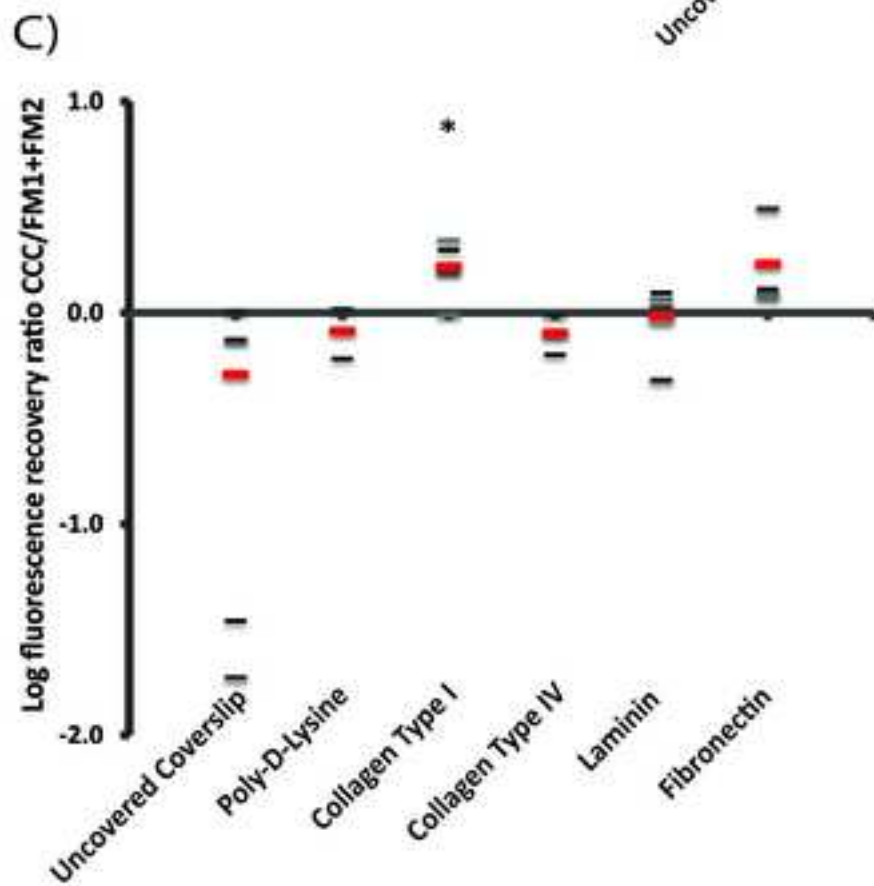
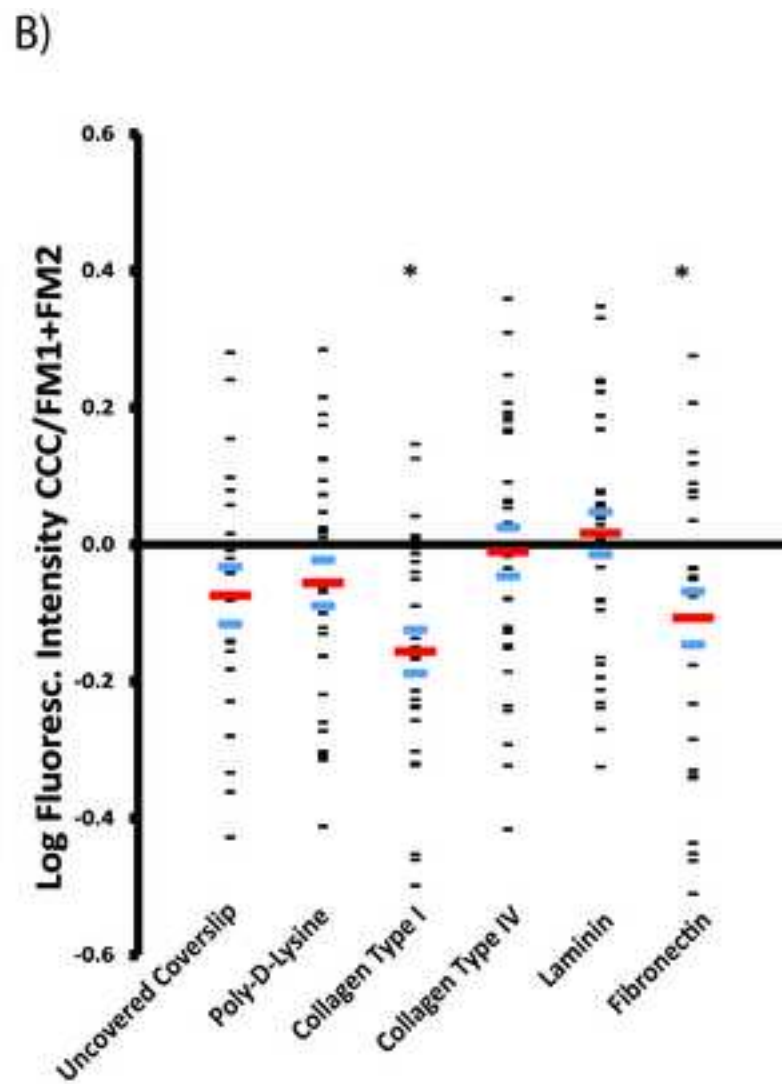
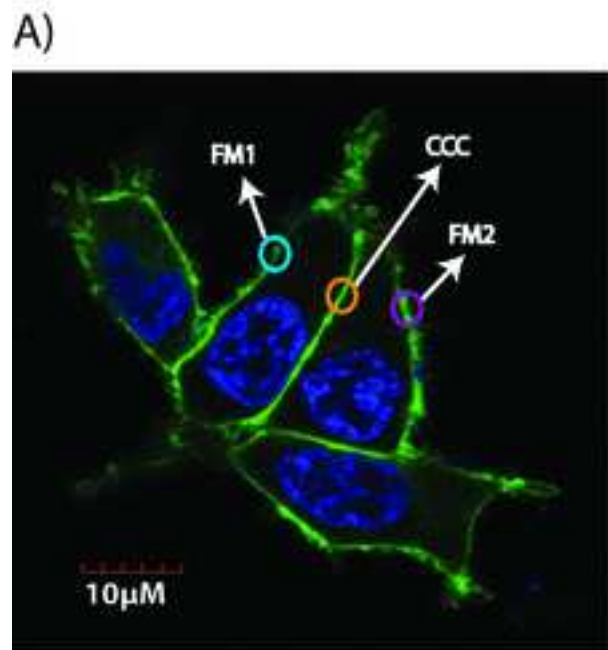
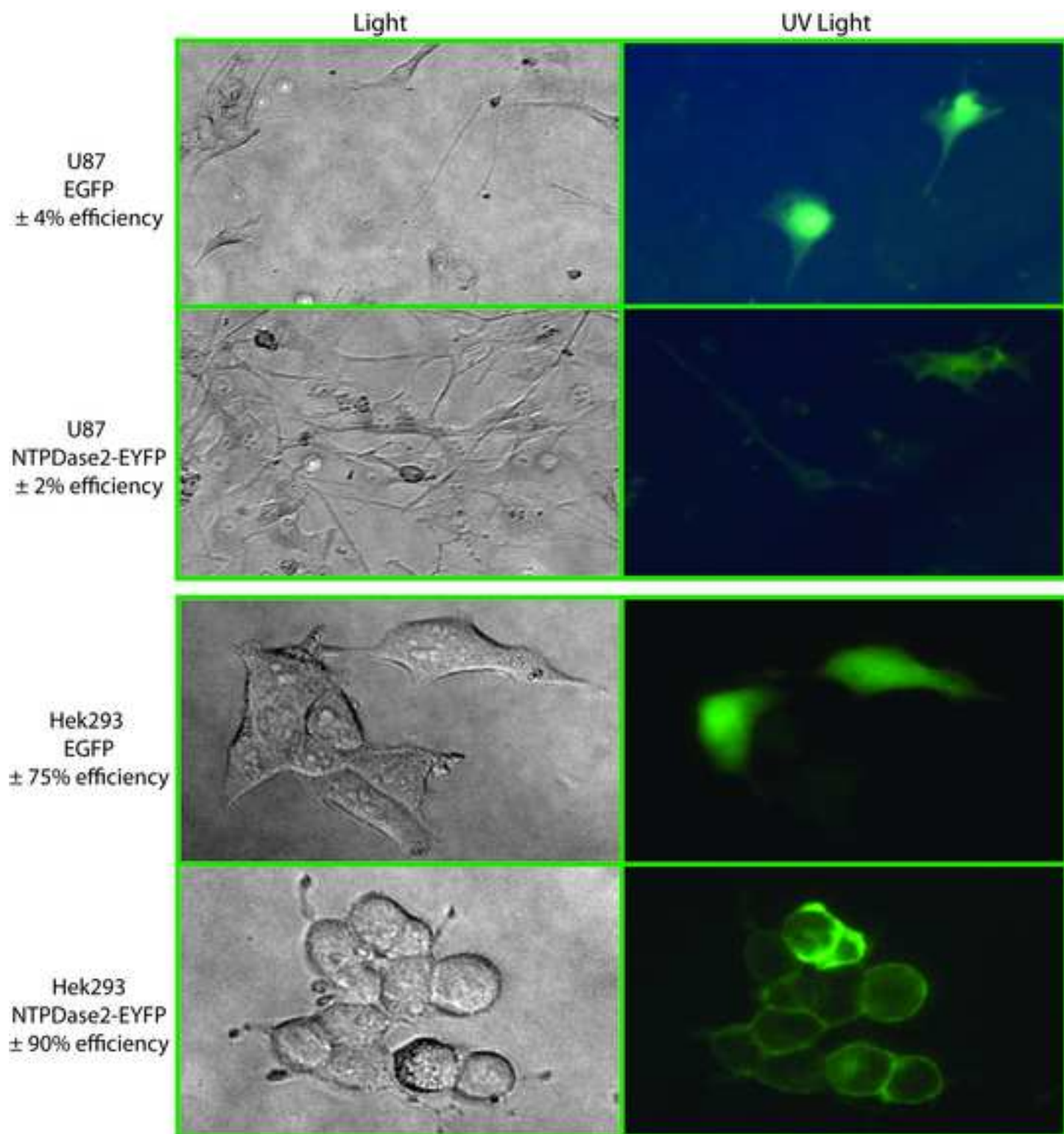
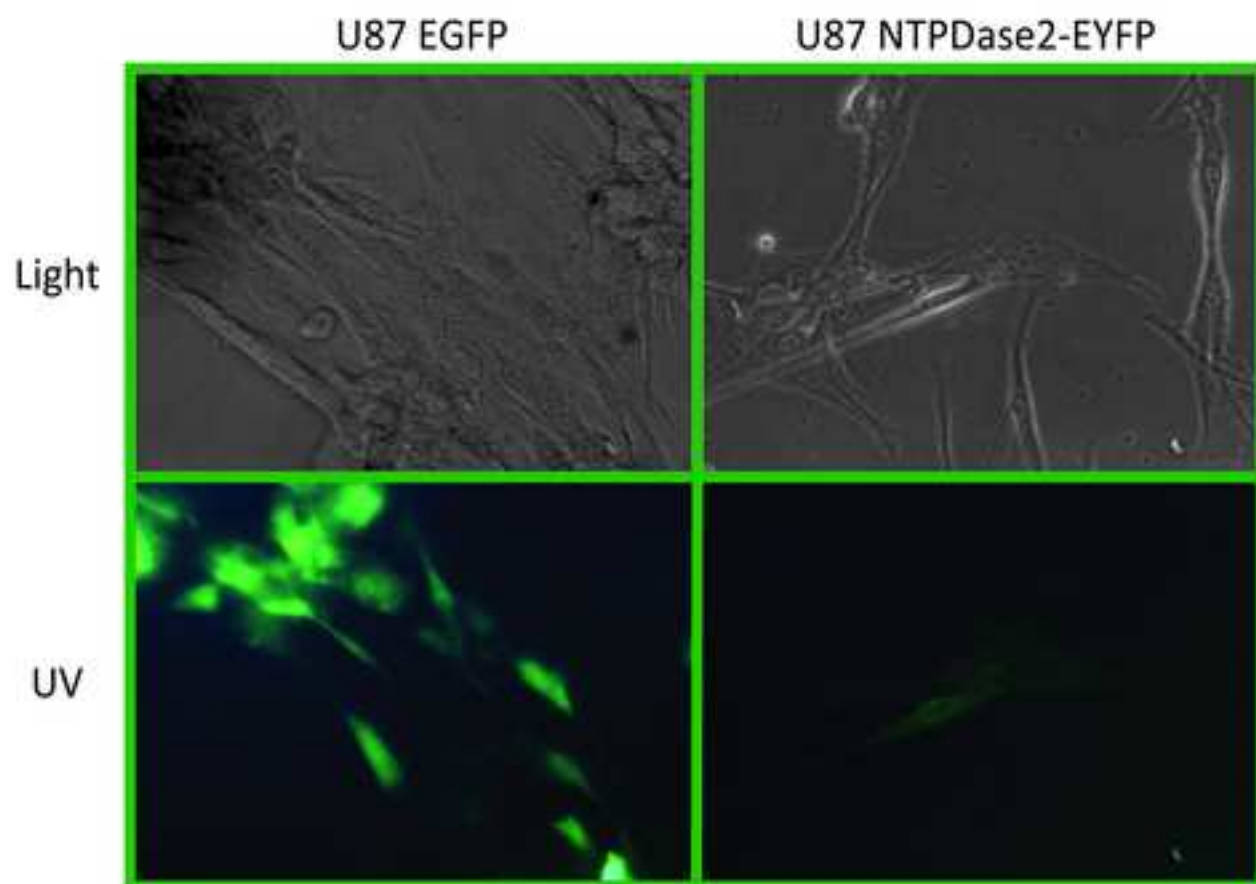


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

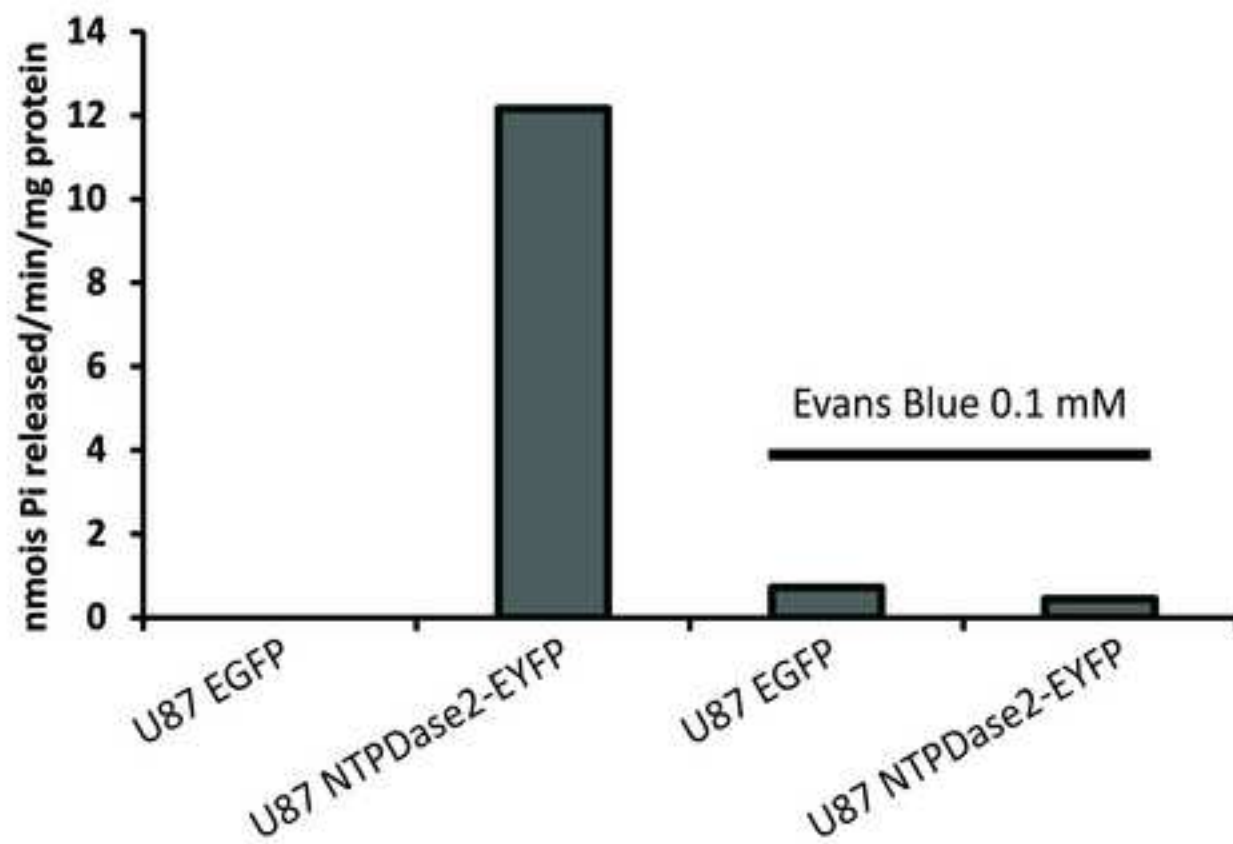




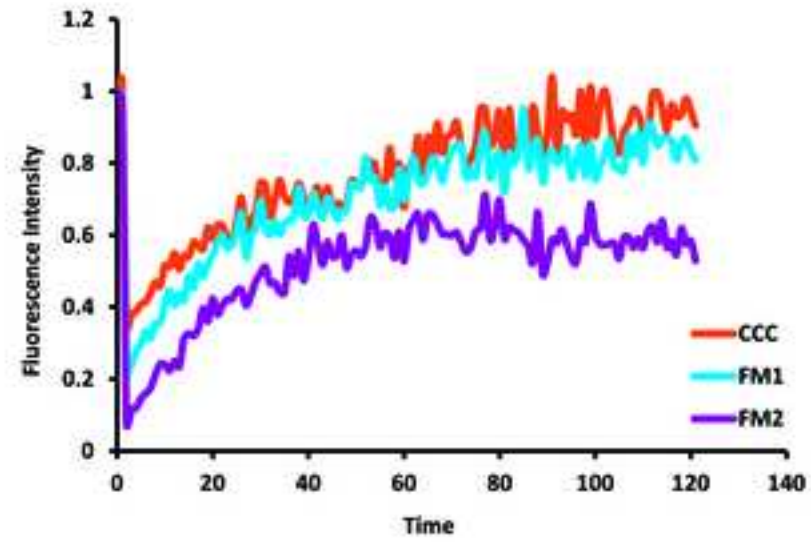
A)



B)



A) Fluorescence Recovery After Photobleach Time



B) Photobleached Areas

