

2.10.05 – Farmacologia/ Farmacologia Bioquímica e Molecular

A INIBIÇÃO DE ANKHD1 REDUZ A CLONOGENICIDADE E VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Bruna Oliveira de Almeida (Estudante)^{1,2}, Larissa Costa de Almeida (Doutoranda)², Leticia Veras Costa-Lotufo (Profa. Dra.)², João Agostinho Machado-Neto (Prof. Dr./Orientador)²

1. Aluna de graduação, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (IB-USP)
2. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP (ICB-USP)

Resumo

A proteína ANKHD1 tem sido identificada como reguladora de vias de sinalização e processos celulares de relevância na oncologia. Visando compreender o papel de ANKHD1 no câncer de mama, objetivamos caracterizar a expressão de ANKHD1 e de proteínas a ela relacionadas em linhagens celulares de câncer de mama e investigar a sua contribuição para a viabilidade celular, clonogenicidade e expressão de genes codificadores para proteínas relacionadas, nesses tipos celulares. A partir da caracterização gênica e proteica dessas linhagens, identificamos que a ANKHD1 é expressa em linhagens tumorais e não tumorais de mama, apresentando localização celular diferente entre os subtipos dessa neoplasia. Ainda, a partir da transfecção com siRNA, demonstramos que a inibição de ANKHD1 é capaz de reduzir a viabilidade e clonogenicidade da linhagem correspondente ao subtipo mais agressivo de câncer de mama, além de modular a expressão de genes alvo de YAP1, nas linhagens de câncer de mama analisadas.

Palavras-chave: *Ankyrin Repeat and KH Domain-containing 1*; interação proteica; YAP1.

Apoio financeiro: CNPq e FAPESP

Trabalho selecionado para a JNIC: USP

Introdução

A proteína *Ankyrin Repeat and KH Domain-containing 1*, ANKHD1, tem sido identificada como reguladora de importantes vias de sinalização e processos celulares de relevância na oncologia [1]. Sua estrutura, constituída por 25 repetições de anquirina e um domínio homólogo a K (KH), sugere que a ANKHD1 seja capaz de estabelecer interações proteína-proteína, indicado pela presença de repetições de anquirina [2], e interações proteína-ácidos nucleicos, devido ao domínio KH [3]. Desse modo, os papéis biológicos desempenhados pela ANKHD1 estão em grande parte relacionados com a diversidade de proteínas com as quais ela interage.

Nesse sentido, as interações proteicas mediadas pela ANKHD1, tais como com a YAP1 (reguladora de transcrição da via Hippo) [4, 5, 6], SIVA (reguladora do processo de apoptose e da dinâmica do citoesqueleto) [7], SHP2 (tirosina fosfatase) [8] e p21 (reguladora do ciclo celular) [9], assim como também sua participação na regulação da via JAK/STAT [10], têm sido identificadas e descritas funcionalmente em diversos tipos celulares de câncer, evidenciando seu envolvimento com a proliferação, migração e invasão de células neoplásicas [1].

Ainda, destacando as implicações da ANKHD1 no câncer, Sansores-Garcia *et al.* [11] demonstraram que, em duas coortes independentes de pacientes com câncer de mama, altos níveis de expressão de ANKHD1 associavam-se a piores desfechos clínicos. No entanto, o padrão de expressão e o papel funcional desempenhado por ANKHD1 no câncer de mama, assim como quais as interações proteicas estabelecidas por ela nessa neoplasia, ainda são desconhecidos.

Assim, considerando-se as evidências na literatura quanto à contribuição da ANKHD1 para o fenótipo celular neoplásico e visto a relevância de se obter novas informações que auxiliem na identificação de marcadores moleculares e vias de sinalização que sejam úteis para o manejo clínico e tratamento de pacientes com câncer de mama, nós objetivamos caracterizar a expressão de ANKHD1 e de proteínas a ela relacionadas (YAP1, SIVA, SHP2, p21 e STAT3) em linhagens celulares de câncer de mama e investigar a sua contribuição para a viabilidade celular, clonogenicidade e expressão de genes que codificam para proteínas a ela relacionadas, nesses tipos celulares.

Metodologia

Inicialmente, utilizou-se como modelo um painel de linhagens celulares incluindo linhagens de câncer de mama ER⁺/PR⁺ (MCF-7 e T47D) e triplo-negativas (MDA-MB-231 e Hs578T) e linhagens celulares de epitélio mamário não tumoral (MCF-10A e MCF-12A), essas cultivadas com ou sem a suplementação de EGF. Após caracterização gênica e proteica, células MCF-7 e MDA-MB-231 foram selecionadas para as investigações seguintes.

Para as análises de expressão proteica, total ou fracionada, realizou-se o ensaio de *Western blotting*. Submeteram-se quantidades iguais de proteína à eletroforese em SDS-PAGE seguida de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. Utilizaram-se anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse e anticorpos secundários conjugados à HRP. Utilizaram-se como controle: α -tubulina (carregamento), Op18 (citoplasma) e fibrilarina (núcleo). Obtiveram-se os resultados de três experimentos independentes.

Para as análises de expressão gênica, realizou-se o ensaio de RT-qPCR a partir de cDNA. A amplificação foi conduzida no ABI 7500 Sequence Detector System utilizando o reagente Power SYBR Green (Thermo Fisher Scientific). Para cada reação, utilizaram-se iniciadores específicos para o gene de interesse. Utilizou-se a média da expressão de *HPRT1* e *ACTB* como referência para as reações e a quantificação relativa foi calculada com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Conduziram-se três experimentos independentes em duplicata.

Para analisar a localização de ANKHD1 e YAP1 a partir de imunofluorescência, após fixação e permeabilização, incubaram-se as células com anticorpos primários específicos e, em seguida, com anticorpos secundários conjugados à Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific). As lâminas foram preparadas com meio de montagem ProLong™ Gold (Invitrogen) e analisadas sob o microscópio LionHeart FX (Biotek).

Para as investigações funcionais, inibiu-se a expressão de ANKHD1 a partir da transfecção com siRNA. Utilizou-se o ON-TARGETplus ANKHD1 siRNA para a inibição e o ON-TARGETplus Non-targeting como controle (Dharmacon). As células foram transfectadas com Lipofectamina 3000 (Invitrogen) e concentração final de siRNA de 25 nM. Coletaram-se amostras para análise de expressão gênica 72 h após a transfecção.

Analisou-se a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, revelado 72 h após a transfecção. Utilizou-se solução de MTT (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL, solução de HCl 0.1 N em isopropanol, para encerrar a reação, e a absorbância foi medida a 570 nm. Conduziram-se três experimentos independentes em triplicata.

Investigou-se a clonogenicidade celular pelo ensaio clonogênico, revelado 10 dias após a transfecção. As colônias foram fixadas e coradas com solução 0,5% cristal de violeta, 1:1 de etanol, e quantificadas com o *software* Image J (NIH). Conduziram-se três experimentos independentes em triplicata.

Análises estatísticas foram feitas com o *software* GraphPad Prism 8. Para comparações, utilizou-se o teste t de Student, com $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão

Destacando alguns pontos da caracterização da expressão de ANKHD1 e de proteínas a ela relacionadas, nossos resultados demonstraram que a ANKHD1 é amplamente expressa dentre as linhagens tumorais e não tumorais de mama analisadas, em ambos os níveis gênico e proteico (Figura 1A-B). Resultado similar foi encontrado em um estudo conduzido por Yao *et al.* [5], no qual foi identificado que a ANKHD1 é expressa tanto em tecidos colorretais tumorais como em não tumorais. Quando consideradas somente as linhagens de câncer de mama, células positivas para receptores hormonais (ER⁺/PR⁺) apresentaram os menores níveis de expressão de RNAm e proteico de YAP1, enquanto que, em células triplo-negativas, foram observados os maiores níveis totais de YAP1, essa correspondendo à sua forma ativa, a qual atua como co-reguladora de transcrição no núcleo (Figura 1A-B). Esses achados suportam dados descritos na literatura quanto à expressão de YAP1 em células ER⁺/PR⁺ de câncer de mama [12, 13].

Curiosamente, investigando a localização celular de ANKHD1, identificamos que ela difere entre a linhagem triplo-negativa MDA-MB-231, na qual se encontra majoritariamente na porção nuclear, e a linhagem positiva para receptores hormonais MCF-7, onde localiza-se principalmente na região citoplasmática perinuclear (Figura 1C). Visto que o compartimento celular no qual se encontra a ANKHD1 é essencial para determinar quais as interações proteicas por ela estabelecidas, a observação dessa diferença sugere que a ANKHD1 possa ter implicações diferentes a depender do subtipo de câncer de mama considerado.

Ainda, visto as crescentes evidências em relação a desregulação da via Hippo em diferentes tipos de câncer [14] e a interação bastante caracterizada de ANKHD1 com YAP1, a qual parece contribuir para o fenótipo de diferentes tipos celulares neoplásicos [4, 5, 6], nós investigamos a localização de YAP1 em células MDA-MB-231 e comparamos a expressão de seus genes alvo (*CCN1*, *CCN2*, *AXL* e *ITGB2*) entre células MDA-MB-231 e MCF-7. Corroborando nossos achados iniciais, demonstramos que a YAP1 se localiza majoritariamente no núcleo de células MDA-MB-231 (Figura 1E), células as quais expressam níveis significativamente mais elevados dos genes alvo de YAP1, em comparação às células MCF-7 (Figura 1D).

Investigando a função desempenhada pela ANKHD1 no câncer de mama, nossos resultados demonstraram que a inibição de ANKHD1 (Figura 2A) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e a capacidade clonogênica de células MDA-MB-231, mas não de células MCF-7 (Figura 2B). Resultados similares foram obtidos para células de câncer colorretal [5], de câncer de pulmão de células não pequenas [6] e leucêmicas [7].

Analisando se a inibição de ANKHD1 é capaz de modular a expressão de genes codificadores para proteínas a ela relacionadas (*YAP1*, *SIVA1/2*, *PTPN11* (SHP2) e *CDKN1A* (p21)), curiosamente, nós identificamos que células MCF-7 inibidas para ANKHD1 apresentaram uma redução significativa da expressão do RNAm de *YAP1*, em comparação às células controle (Figura 2C). Destaca-se que essa é a linhagem celular que expressa os menores níveis de YAP1 dentre as células analisadas (Figura 1A-B). Ainda, nossos resultados demonstraram que a inibição de ANKHD1 foi capaz de modular a expressão de genes alvo de YAP1. Em células MCF-7, células inibidas apresentaram uma redução significativa dos níveis de RNAm de *CCN2* enquanto que, em células MDA-MB-231, houve uma redução pequena, porém significativa, dos níveis de RNAm de *ITGB2* (Figura 2D).

Nesse contexto, apesar de *YAP1* ser crescentemente caracterizado como um oncogene em diferentes tipos de câncer [14], no câncer de mama o seu papel ainda é controverso [13, 15], havendo evidências de que no subtipo luminal A de câncer de mama, no qual se enquadra a linhagem MCF-7 [16], menor expressão de YAP1 associa-se a maior agressividade [15]. Assim, a ausência de diferença na viabilidade celular e capacidade clonogênica de células MCF-7 inibidas para ANKHD1 pode estar relacionada com a redução da expressão de *YAP1* nessa linhagem, quando ANKHD1 é inibida. Porém, ainda são necessárias maiores investigações.

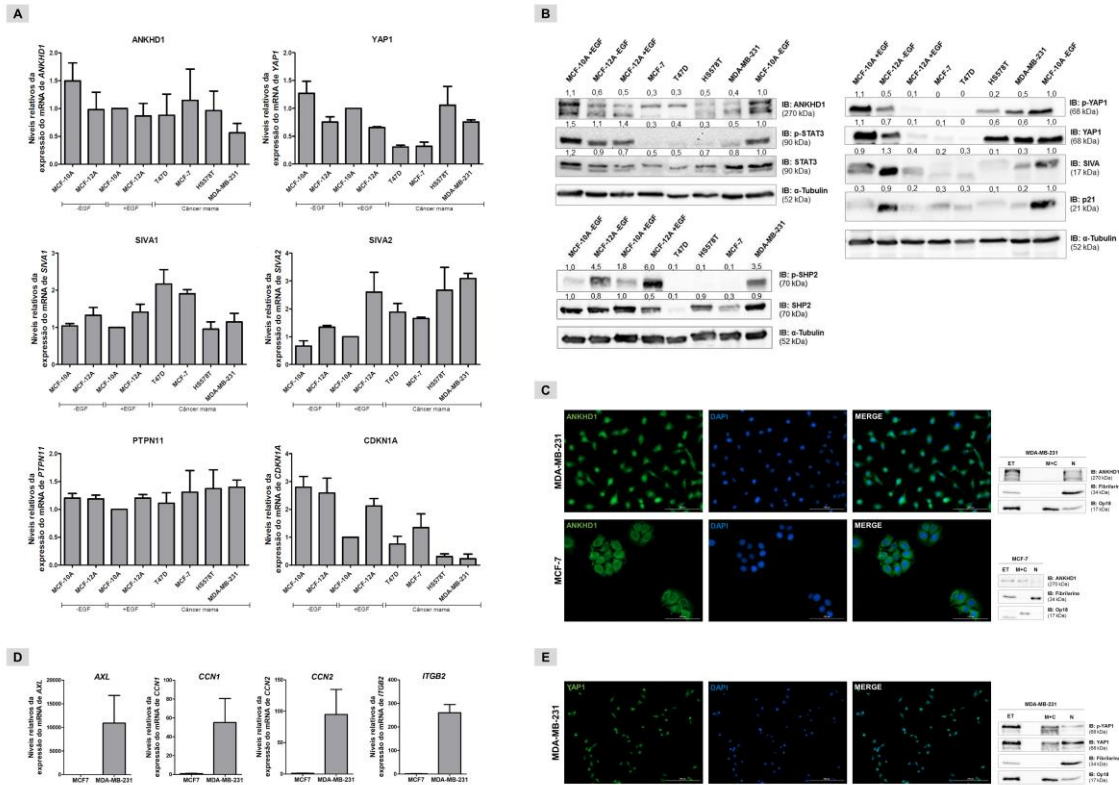


Figura 1. Caracterização da expressão de ANKHD1 e de proteínas a ela relacionadas em linhagens celulares tumorais e não tumorais de mama. Análise da expressão gênica (A) e proteica (B) de ANKHD1, YAP1, SIVA, SHP2 (*PTPN11*), p21 (*CDKN1A*) e STAT3, em linhagens tumorais e não tumorais de mama. (C) Localização celular de ANKHD1, a partir de análises de imunofluorescência e de extração proteica fracionada, em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. (D) Avaliação da expressão dos genes alvos de YAP1 (*AXL*, *CCN1*, *CCN2* e *ITGB2*) entre células MDA-MB-231 e MCF-7. (E) Localização celular de YAP1, a partir de análises de imunofluorescência e de extração proteica fracionada, em células MDA-MB-231.

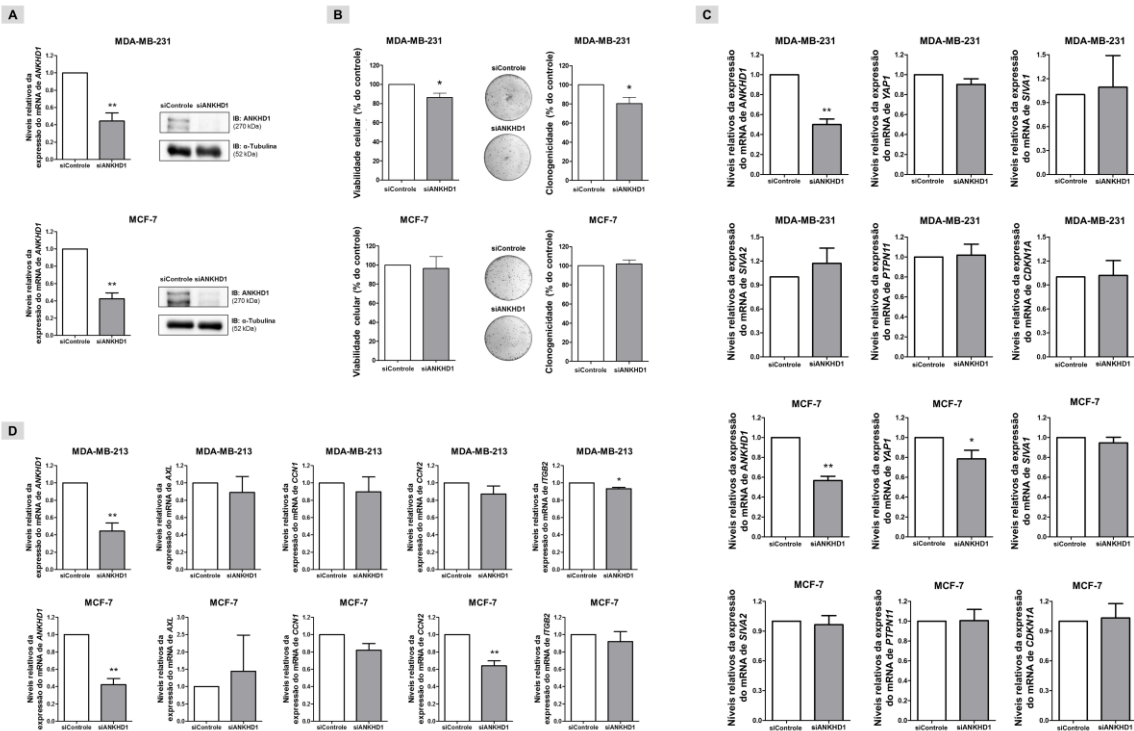


Figura 2. Avaliação do impacto da inibição de ANKHD1 em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. (A) Eficiência da inibição de ANKHD1 a partir da transfecção com siRNA. (B) Impacto da inibição de ANKHD1 sobre a viabilidade celular e capacidade clonogênica de células MDA-MB-231 e MCF-7. (C) Análise da expressão dos genes codificadores para proteínas relacionadas a ANKHD1 (*YAP1*, *SIVA1/2*, *PTPN11* e *CDKN1A*), em células inibidas e controles. (D) Análise da expressão dos genes alvos de YAP1 (*AXL*, *CCN1*, *CCN2* e *ITGB2*), em células inibidas e controles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Conclusões

Tendo em vista os resultados anteriormente apresentados, nós pudemos demonstrar que a ANKHD1 é expressa tanto em linhagens de epitélio mamário não tumoral como em linhagens celulares de câncer de mama. Ainda, foi visto que a localização celular de ANKHD1 difere entre as linhagens triplo-negativa, na qual se localiza majoritariamente no núcleo, e positiva para receptores hormonais, na qual se encontra principalmente na região citoplasmática. Demonstrou-se também que as linhagens triplo-negativas apresentam maiores níveis de expressão gênica e proteica de YAP1 e de seus genes alvo (*CCN1*, *CCN2*, *AXL* e *ITGB2*), quando em comparação às linhagens positivas para receptores hormonais.

Ressaltando a importância e as implicações de ANKHD1 no câncer de mama, pudemos demonstrar que a inibição de ANKHD1 é capaz de reduzir a viabilidade celular e a capacidade clonogênica de células MDA-MB-231, sendo ambas características importantes para o fenótipo celular neoplásico. Destaca-se que a linhagem MDA-MB-231 é derivada de adenocarcinoma mamário triplo negativo (TNBC), correspondendo ao subtipo mais agressivo dentre as linhagens imortalizadas de câncer de mama [16]. Assim, sendo ainda o câncer de mama triplo-negativo um desafio para o manejo clínico de pacientes e havendo poucas opções terapêuticas para o seu tratamento [17], nossos resultados apresentam o início de importantes achados quanto à participação de ANKHD1 nesse subtipo de câncer de mama.

Ainda, pudemos mostrar que a inibição de ANKHD1 é capaz de reduzir a expressão do RNAm de *YAP1* em células MCF-7 e também de modular a expressão de seus genes alvo, sendo que, em células MCF-7 inibidas, houve uma redução dos níveis de *CCN2* e, em células MDA-MB-231, a redução de *ITGB2*.

Assim, este trabalho traz a nossa contribuição para a compreensão do papel de ANKHD1 nos subtipos positivo para receptores hormonais e triplo-negativo de câncer mama, sugerindo a importância de ANKHD1 para este último. Ademais, nossos resultados também auxiliam no entendimento da relação de ANKHD1 com YAP1 nos diferentes subtipos dessa neoplasia.

Referências bibliográficas

- [1] Almeida BO, Machado-Neto JA. Emerging functions for ANKHD1 in cancer-related signaling pathways and cellular processes. *BMB Rep.* 2020;53(8):413-418.
- [2] Li J, Mahajan A, Tsai MD. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry.* 2006;45(51):15168-15178.
- [3] Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 2008;275(11):2712-2726.
- [4] Machado-Neto JA, Lazarini M, Favaro P, et al. ANKHD1, a novel component of the Hippo signaling pathway, promotes YAP1 activation and cell cycle progression in prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2014;324(2):137-145.
- [5] Yao P, Li Y, Shen W, et al. ANKHD1 silencing suppresses the proliferation, migration and invasion of CRC cells by inhibiting YAP1-induced activation of EMT. *Am J Cancer Res.* 2018;8(11):2311-2324.
- [6] Liu XF, Han Q, Rong XZ, et al. ANKHD1 promotes proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer cells via regulating YAP oncoprotein expression and inactivating the Hippo pathway. *Int J Oncol.* 2020;56(5):1175-1185.
- [7] Machado-Neto JA, Lazarini M, Favaro P, et al. ANKHD1 silencing inhibits Stathmin 1 activity, cell proliferation and migration of leukemia cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(3):583-593.
- [8] Traina F, Favaro PM, Medina Sde S, et al. ANKHD1, ankyrin repeat and KH domain containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(9):828-834.
- [9] Dhyani A, Machado-Neto JA, Favaro P, Saad ST. ANKHD1 represses p21 (WAF1/CIP1) promoter and promotes multiple myeloma cell growth. *Eur J Cancer.* 2015 Jan;51(2):252-9.
- [10] Fisher KH, Fragiadaki M, Pugazhendhi D, et al. A genome-wide RNAi screen identifies MASK as a positive regulator of cytokine receptor stability. *J Cell Sci.* 2018;131(13):jcs209551.
- [11] Sansores-Garcia L, Atkins M, Moya IM, et al. Mask is required for the activity of the Hippo pathway effector Yki/YAP. *Curr Biol.* 2013;23(3):229-235.
- [12] Wei C, Wang Y, Li X. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. *Onco Targets Ther.* 2018;11:2185-2193.
- [13] Andrade D, Mehta M, Griffith J, et al. YAP1 inhibition radiosensitizes triple negative breast cancer cells by targeting the DNA damage response and cell survival pathways. *Oncotarget.* 2017;8(58):98495-98508.
- [14] Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, Dey A. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities. *Trends Cancer.* 2019;5(5):297-307.
- [15] Lehn S, Tobin NP, Sims AH, et al. Decreased expression of Yes-associated protein is associated with outcome in the luminal A breast cancer subgroup and with an impaired tamoxifen response. *BMC Cancer.* 2014;14:119.
- [16] Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer.* 2017;8(16):3131-3141.
- [17] Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist.* 2010;15 Suppl 5:39-48.