

Avaliação do domínio C-terminal da Agrina e seus parceiros de interação como alvos terapêuticos em câncer de boca.

Evaluation of Agrin C-terminal and interacting partners as therapeutic targets in oral cancer.

Instituição Sede: Laboratório Nacional de Biociências (LN Bio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

Orientador (a) (Investigador principal): Adriana Franco Paes Leme

Coorientador (a): Daniela Campos Granato

Campinas, Abril 2022

1. Introdução

A etiologia do CEC oral é multifatorial e não há uma causa única, mas um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam em sinergia e levam ao desenvolvimento da doença¹. Em relação aos fatores extrínsecos podemos citar como principais o tabagismo e o alcoolismo, especialmente se estiverem associados, além das infecções por HPV ou sífilis e a exposição à radiação ultravioleta^{1,2}. Os fatores intrínsecos estão principalmente relacionados a fatores genéticos e epigenéticos que levam a alterações como modificação na expressão de genes relacionados a supressão e promoção tumoral (proto-oncogenes e supressores) e relacionadas ao metabolismo da glicose, absorção de ferro, e outros^{1,2}. O tratamento do CEC oral é realizado principalmente pela ressecção cirúrgica do tumor primário associada à quimioterapia e radioterapia². Atualmente, somente três terapias alvo são aprovadas pelo FDA para tratamento do CEC oral, incluindo o Cetuximab, um anticorpo humanizado que tem como alvo o EGFR³, e as drogas Pembrolizumab e Nivolumab, ambas imunoterápicos inibidores de PD-1⁴. No entanto, a sobrevida em 5 anos desses pacientes ainda permanece baixa, não excedendo 50% dos casos, e novas terapias alvo são necessárias para auxiliar no manejo do CEC oral.

O advento das novas tecnologias no campo da proteômica vem abrindo novas perspectivas para a compreensão de diversos tipos de câncer⁵. Dedicados não apenas à identificação do conjunto de proteínas de uma determinada célula, tecido ou fluido, os métodos de proteômica mais atuais buscam quantificar, compreender modificações estruturais, interações, distribuição espacial e compartimentalização das proteínas, entre outros aspectos⁵. A aplicação de métodos proteômicos pelo nosso grupo vem contribuindo significativamente na compreensão de mecanismos envolvidos no desenvolvimento de câncer oral *in vitro*⁶⁻¹¹, *in vivo*^{12,13} em modelos animais, e utilizando amostras de tecido^{6,13,14} ou saliva^{9,15} de pacientes com CEC oral. Todas essas informações podem eventualmente auxiliar na proposição de alvos terapêuticos e marcadores de diagnóstico e prognóstico, que possam aprimorar a decisão clínica para as modalidades de tratamento e, com isso, melhorar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

Estudos realizados em nosso grupo, tem apontado para a Agrina como alvo relevante para a progressão de câncer oral⁸. A Agrina é um proteoglicano de heparan sulfato de alto peso molecular (>200 KDa), o qual é expresso na forma secretada ou transmembrana por vários tipos celulares, como as células do sistema nervoso, endotelial, pulmonar, renal, tecido hepático, em alguns tipos de tumores^{8, 9, 11-14, 15-19}. Resultados do grupo mostraram uma alta taxa de expressão de Agrina em células de CEC oral, sendo ainda que a diminuição da expressão dessa proteína (*knockdown*) levou à diminuição da migração e adesão celular, e aumentou a resistência celular à cisplatina, um quimioterápico utilizado no tratamento de tumores sólidos. Além disso, também foi observado que a diminuição da expressão deste proteoglicano interfere negativamente em processos relacionados à progressão tumoral, como proliferação celular, invasão e migração, dentre outros. Utilizando modelo animal ortotópico em camundongos, demonstrou-se que o silenciamento da proteína reduziu a agressividade tumoral em relação à capacidade ulcerativa, padrão de crescimento e invasão vascular e neural. Em um estudo posterior²⁰, foi investigado em mais detalhes o papel

funcional da proteína no CEC oral, sendo que novamente foi encontrada uma forte expressão da mesma, tanto em carcinomas bem estabelecidos quanto em lesões potencialmente malignas, levando a conclusão de que a Agrina atua no processo de progressão tumoral. Todavia, o mecanismo de ação da Agrina ainda não foi bem caracterizado e suas funções patológicas permanecem pouco compreendidas.

Apesar dos interessantes achados envolvendo processos tumorais e Agrina, devido à alta complexidade deste proteoglicano, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos que levam a este papel patológico. O processamento proteolítico de Agrina humana gera fragmentos funcionais de tamanhos distintos que podem atuar de forma independente no organismo, sendo que os mais bem caracterizados são os fragmentos neurotrípticos do C-terminal 110 kDa, 90 kDa e 22 kDa e o fragmento N-terminal 110 kDa (**Figura 1**). Dentre esses 4 fragmentos, o C-terminal 22 kDa, também conhecido como Agrina C22, se destaca pelo seu potencial papel em processos tumorigênicos¹⁶. Além dessa região C-terminal ter sido reportada com atividade tumoral, ela apresenta o domínio Laminina-G tipo 3 (LG3), região regulada por *splicing* alternativo, que tem sido experimentalmente descrita sua interação com o receptor LRP4, que apresenta papel central na sinalização do hepatocarcinoma celular.

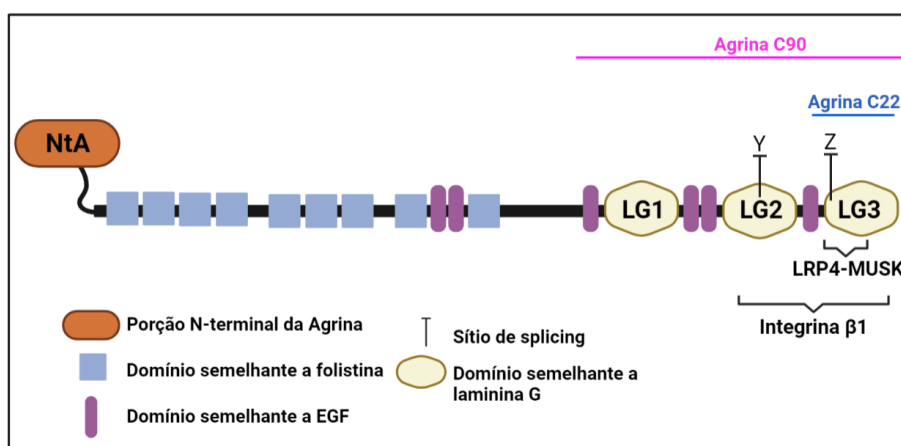


Fig. 1 – Representação esquemática da estrutura da Agrina humana modificada⁹. O esquema mostra os principais motivos estruturais presentes na estrutura da Agrina humana secretada, apontando também os sítios de splicing alternativo Y e Z e a extensão que compreende os fragmentos C-terminal da Agrina de 90 e 22 kDa (Agrina C90 e Agrina C22) gerados pela neurotripsina. Os colchetes mostram os domínios mais importantes para interação da Agrina com as proteínas LRP4 e MusK, bem como com a Integrina β1.

Em carcinoma hepatocelular, o desenvolvimento do tumor já revelou estar associado à interação da porção C-terminal de Agrina aos receptores MusK, LRP4, Integrina β1 e VEGFR2^{9,26-28}. Estes na presença da porção C-terminal da Agrina iniciam uma cascata de sinalização através da via Wnt/β-catenina pela ativação de proteínas quinases como FAK, ERK e AKT, entre outras, que culminam na intensificação de processos que favorecem a tumorigênese, como angiogênese, proliferação, migração, invasão e sobrevivência celular (**Figura 2**)^{9, 21-15, 26-28}.

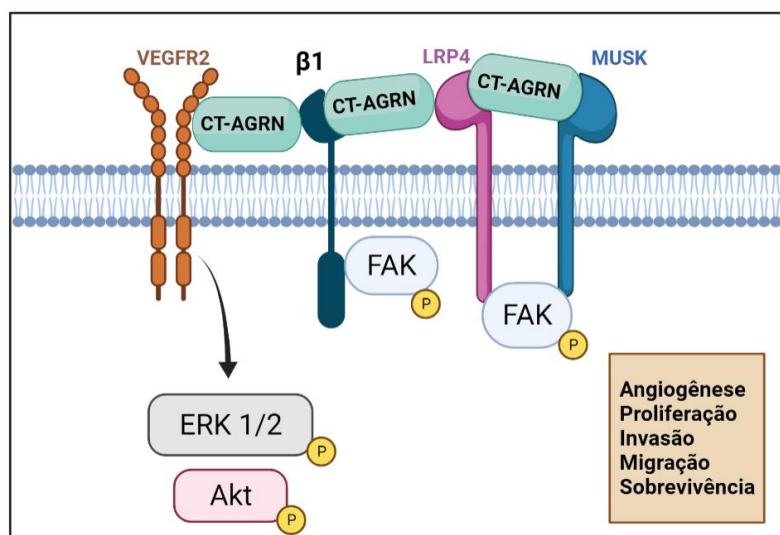


Fig. 2 – Representação esquemática dos mecanismos oncogênicos da Agrina no hepatocarcinoma. A porção C-terminal da Agrina se liga à Proteína de baixa densidade relacionada ao receptor de lipoproteínas 4 (LRP4) para ativar a Tirosina quinase específica do músculo (MuSK) e a Integrina β1, formando assim um complexo multiproteico capaz de ativar a Quinase de adesão focal (FAK), resultando em uma cascata de sinalização celular que culmina na expressão de genes que favorecem processos como proliferação, invasão, migração e sobrevivência celular. A porção C-terminal da Agrina também é capaz de estabilizar o dímero que forma o Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR2) formando um complexo proteico com este receptor e a Integrina β1. Esta estabilização por sua vez permite que o receptor VEGFR2 seja ativado gerando uma cascata de sinalização que culmina no favorecimento de processos angiogênicos.

Com isso, esse projeto visa caracterizar o papel funcional do domínio C-terminal ativo da Agrina (Agrina C22 KDa) através de uma caracterização detalhada de sua interação com parceiros previamente selecionados pelo grupo, bem como definir potenciais alvos terapêuticos que possam ser modulados no CEC oral. Tais parceiros foram identificados a partir de imunoprecipitação e *pull down* de Agrina em três linhagens celulares distintas, queratinócitos normais (HMK) e duas linhagens de queratinócitos de carcinoma oral de células escamosas de baixa e alta agressividade (SCC-9 e HSC3, respectivamente), seguido por análise proteômica baseada em espectrometria de massas. Apenas as 4 proteínas identificadas exclusivamente nas linhagens de carcinoma oral e cuja expressão gênica está associada com importantes características clínico-patológicas relacionadas ao prognóstico da doença (resultados de análises com dados públicos como TCGA), foram selecionadas para validação nesse trabalho por meio de ensaio de fase sólida modificado, *thermal shift* e ensaio de ligação covalente (*crosslink*), seguido por análise funcional e de verificação de fenótipo celular promovido por potenciais inibidores do complexo.

2. Justificativa e Estado da arte

Dada a limitação de alvos terapêuticos disponíveis e a inexistência de informações dos efeitos da via de sinalização oncogênica promovida pelo domínio C-terminal de Agrina e seus parceiros de interação em CEC de boca, este projeto visa validar a formação do complexo proteico e investigar as vias de sinalização oncogênica diferenciais promovidas pelo complexo de interação para identificar possíveis

vulnerabilidades em CEC de boca que possam ter relevância terapêutica. Para isso, serão empregadas abordagens baseadas em análise de interações proteína-proteína e espectrometria de massas, juntamente com intervenção de fenótipo pela modulação dos parceiros do domínio C-terminal de Agrina utilizando peptídeos sintéticos e/ou anticorpos. Trata-se de uma abordagem recente e inovadora, que poderá levar à descrição das funções de proteínas associadas ao CEC oral e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (**Figura 3**).

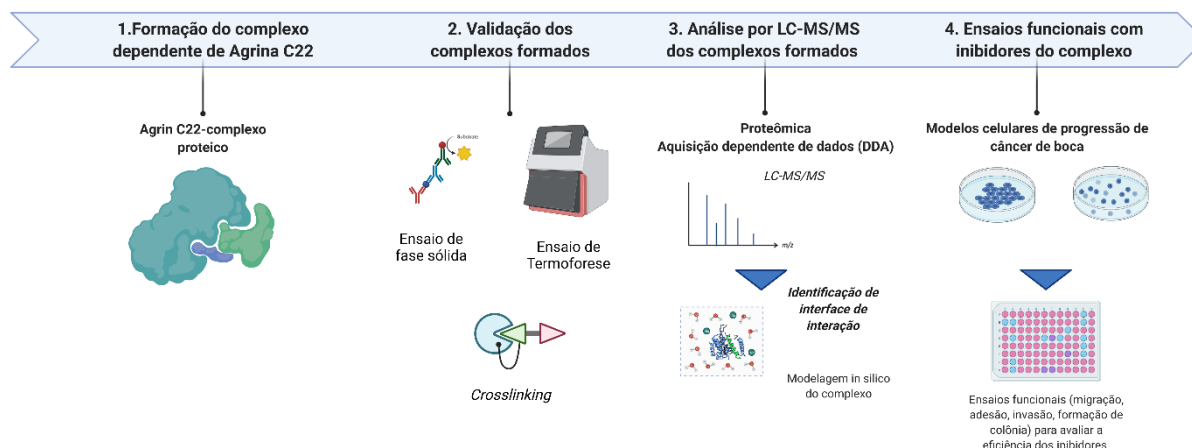


Fig. 3 – Desenho experimental proposto para avaliação funcional de inibidores da formação do complexo com o domínio C-terminal de Agrina (C22).

1. Objetivos

Objetivo geral: Validar a formação do complexo do domínio C-terminal de Agrina e seus parceiros de interação previamente identificados e modular sua atividade com intuito de desenvolver estratégias terapêuticas para inibição da progressão de CEC oral.

Objetivos específicos:

- Validar a formação do complexo do domínio C-terminal de Agrina pela avaliação da interação proteína-proteína utilizando proteínas recombinantes em ensaio de fase sólida modificado, *thermal shift*, entre outros.
- Identificar interfaces de interação de complexos proteicos e modelar os complexos.
- Analisar os efeitos de inibidores das vias de sinalização por tratamento de linhagens celulares de CEC oral com menor ou maior agressividade (SCC-9 e HSC-3, respectivamente) com peptídeos sintéticos e anticorpos.

2. Metodologia

Caracterização da formação do complexo- A validação da formação do complexo e a interdependência de cada ligante na formação do mesmo será feita por metodologias como ensaios de fase sólida e *thermal shift*.

Identificação das Interfaces de Interação Proteína-proteína- A identificação das interfaces de interação com Agrina e proteínas alvo será realizada através de *cross-linking* químico. Para essa reação serão necessárias soluções de 50mM DSS (DSS, spacer arm length: 11.4 Å, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A) em DMSO e amostras proteicas em solução salina de fosfato de sódio 25mM, pH 7.4. As soluções serão misturadas na razão de 20:1 (Crosslinker:Protein) e incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após o período de incubação será realizado o *quenching* da reação com solução de Tris 200mM, pH 7.4, a temperatura ambiente, por 15 minutos. Ao fim da etapa de *quenching* a amostra será resolvida por SDS-PAGE 12% e as frações de gel correspondentes serão submetidas a digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS.

Screening de potenciais alvos de droga no complexo de interação do domínio C-terminal da Agrina- Alvos de droga aprovados pelo FDA ou em ensaios clínicos serão recuperados de bases de dados *Drugbank* (<http://www.drugbank.ca/>). Somente os parceiros da Agrina que são potenciais alvos de drogas serão selecionados para as fases seguintes.

Desenho racional de peptídeos sintéticos e seleção dos anticorpos- A partir de dados obtidos da modelagem *in silico* do complexo, feito em colaboração com o Departamento de Biologia Computacional do LNBio, e da análise de potenciais alvos de drogas, serão propostos peptídeos sintéticos não lineares. Dependendo dos alvos selecionados, será também avaliada a utilização de anticorpos específicos para bloqueio.

Ensaio Funcionais e Efeitos nas vias de Sinalização de Agrina e seus parceiros- Com base nos dados de interação proteína-proteína associados à MS, peptídeos sintéticos e anticorpos serão aplicados para realizar o bloqueio seletivo das interações identificadas em vias de sinalização de Agrina e seus parceiros e verificar seus efeitos em processos associados ao câncer, como proliferação e migração, para então desenvolver possíveis estratégias terapêuticas. Os resultados destas perturbações serão avaliados por abordagens associadas à MS, como proteômica e ensaios de interação proteína-proteína e de avaliação de fenótipo, delineados de acordo com os alvos envolvidos. Essas análises serão realizadas *in vitro* utilizando linhagem de CEC oral com menor (SCC-9) ou maior (HSC-3) agressividade.

Resultados esperados

Ao final do projeto esperamos validar o complexo formado entre o domínio C-terminal da Agrina e seus parceiros pela combinação de diferentes metodologias e assim determinar a interface de interação desse complexo. Em seguida, será realizado o desenho racional de peptídeos ou anticorpos que possam contribuir para interferir na formação desse complexo e que possam posteriormente ser utilizados para desenvolvimento de novas estratégias de intervenção terapêutica na doença.

3. Cronograma de execução da pesquisa

Atividades	01 – 03 meses	04 – 06 meses	07 – 09 meses	10 – 12 meses
Clonagem e expressão recombinante dos parceiros de interação do domínio C-terminal de Agrina (C22)	X	X		
Avaliação da formação do complexo <i>in vitro</i> por ensaio de fase sólida e <i>thermal shift</i> .	X	X	X	
Identificação da interface de interação do complexo por <i>crosslink</i> seguido por espectrometria de massas.		X	X	
Desenho racional de peptídeos não lineares e anticorpos para interferir na formação do complexo.			X	
Avaliação do papel da interação do complexo em vias de sinalização associadas a CEC oral.			X	
Escrita do relatório final e artigos científicos				X

4. Referências bibliográficas

- Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, (2020).
- Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Jan 2;382(1):60-72. doi: 10.1056/NEJMra1715715. PMID: 31893516.
- Taberna M, Oliva M, Mesía R. Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2019 May 20;9:383. doi: 10.3389/fonc.2019.00383. PMID: 31165040; PMCID: PMC6536039.
- Moskovitz J, Moy J, Ferris RL. Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2018 Mar 3;20(2):22. doi: 10.1007/s11912-018-0654-5. PMID: 29502288; PMCID: PMC5835060.
- BLATT S; KRÜGER M; ZIEBART T; *et al.* Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.* **45**: 722-730, 2017.
- GASCHE JA; GOEL A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol.* **8**(11): 1407–1425, 2012.
- GRIMM M; CETINDIS M; LEHMANN M; *et al.* Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis – indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *J. Transl. Med.* **12**(208): 1-21, 2014.
- KAWAHARA R; GRANATO DC; CARNIELLI CM; *et al.* Agrin and perlecan mediate tumorigenic processes in oral squamous cell carcinoma. *pLos One.* **9**(12): e115004, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0115004.
- CHAKRABORTY S; LAKSHMANAN M; SWA HLF; *et al.* An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **6**(6184): 1-16, 2015.
- BATMUNKH E; LÓDI C; HOLCZBAUER Á; *et al.* High expression of agrin in hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Z Gastroenterol.*: 43 – 6, 2005, DOI: 10.1055/s-2005-869653.
- GROFFEN AJA; BUSKENS CAF; VAN KUPPEVELT TH; *et al.* Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *Eur. J. Biochem.* **254**: 123-128, 1998.
- KUMAR P; FERNS MJ; MEIZEL S. Identification of agrinSN isoform and muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) [corrected] in sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* **342**(2): 522-28, 2006.
- CHEN R; JIANG X; SUN D; *et al.* Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res.* **8**(2): 651-661, 2009.
- DIDANGELOS A; YIN X; MANDAL K; *et al.* Proteomics Characterization of Extracellular Space Components in the Human Aorta. *Mol Cell Proteomics.* **9**(9): 2048-2062, 2010.
- DANIELS MP. The role of agrin in synaptic development, plasticity and signaling in the central nervous system. *Neuroch. Inter.* **61**: 848–853, 2012.

16. BEZAKOVA G; RUEGG MA. New insights into the roles of agrin. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 4: 295-308, 2003.
17. KHAN AA; BOSE C; YAM LS; *et al.* Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. **Science.** 292(5522): 1681-1686, 2001.
18. MAZZON, C; ANSELMO, A; CIBELLA, J; *et al.* The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche. **Blood.** 118(10): 2733-2742, 2011.
19. MAZZON, C; ANSELMO, A; SOLDANI, C; *et al.* Agrin is required for survival and function of monocytic cells. **Blood.** 119(23): 5502-5511, 2012.
20. RIVERA C; ZANDONADI FS; SÁNCHEZ-ROMERO C; *et al.* Agrin has a pathological role in the progression of oral cancer. **Br. J. Cancer.** 118: 628–1638, 2018.
21. PATEL TR; BUTLER G; McFARLANE A; *et al.* Site specific cleavage mediated by MMPs regulates function of agrin. **PLoS One.** 7: e43669, 2012.
22. McCARTHY KJ. The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, **Something New.** **Curr Top Membr.** 76: 255-303, 2015.
23. STEPHAN A; MATEOS JM; KOZLOV SV; *et al.* Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. **FASEB J.** 22:1861–1873, 2008.
24. SOLÉ S; PETEGNIEF V; GORINA R. *et al.* Activation of Matrix Metalloproteinase-3 and Agrin Cleavage in Cerebral Ischemia/Reperfusion. **J Neuropathol Exp Neurol.** 63(4): 338-349, 2004.
25. REIF R, SALES S, HETTWER S; *et al.* Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. **FASEB J.** 21:3468–3478, 2007.
26. MAN S, FAN W, LIU Z, *et al.* Antitumor pathway of Rhizoma Paridis Saponins based on the metabolic regulatory network alterations in H22 hepatocarcinoma mice. **Steroids.** 84: 17-21, 2014
27. ZHOU W, LIOTTA LA, PETRICOIN MF. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. **Cancer Lett.** 356(2): 176-183, 2015.
28. OHMURA M, HISHIKI T, YAMAMOTO T, *et al.* Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. **Nitric Oxide.** 46: 102-113, 2015.