

Projeto de pesquisa para o ciclo avançado do Curso de Ciências Moleculares

Aluno: Vitor Heidrich

## **Identificação de RNAs não codificadores longos regulados por KRAS em câncer de pâncreas**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Sanchez Bassères

*Instituto de Química - USP*

### **1 Resumo**

Mutações pontuais que ativam o oncogene *KRAS* são muito frequentes em diversas neoplasias humanas, principalmente no carcinoma pancreático. Apesar destas mutações estarem ligadas à oncogênese, diferentes abordagens para inibir as proteínas Ras diretamente fracassaram na clínica. Portanto, para que melhores alvos terapêuticos para as neoplasias induzidas pela *KRAS* oncogênica se tornem disponíveis, será necessário identificar as moléculas efetoras da proteína *KRAS*, que são críticas para a oncogênese. Os RNAs não codificadores (ncRNAs) podem atuar como importantes mediadores do processo de surgimento e evolução do câncer, atuando como oncogenes ou genes supressores de tumor, através de indução de alterações epigenéticas ou regulação da expressão gênica de forma pós-transcricional. Entretanto, os ncRNAs envolvidos na transformação maligna induzida pela *KRAS* permanecem desconhecidos. O objetivo deste projeto é identificar ncRNAs longos (lncRNAs) que desempenham um papel importante no fenótipo maligno induzido pelo oncogene *KRAS*. Postula-se que a transformação celular por *KRAS* altera o padrão de expressão de lncRNAs, alterando assim, suas funções. Para testar esta hipótese, utilizaremos os dados já obtidos de hibridização de microarranjos de DNA para comparar o perfil de expressão de lncRNAs em linhagens primárias de pâncreas na presença ou ausência de *KRAS*. Após a validação da expressão diferencial por qRT-PCR nas linhagens pancreáticas primárias, nós confirmaremos a expressão diferencial também em linhagens tumorais de pâncreas, com ou sem inibição de *KRAS* por interferência de RNA (RNAi). Espera-se que este projeto contribua para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares acionados pela oncoproteína *KRAS*, enquanto, concomitantemente, espera-se que ele forneça o conhecimento necessário para o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais.

### **2 Introdução e justificativa**

O câncer de pâncreas encontra-se na quarta posição em mortes nos Estados Unidos da América (EUA) devido sua difícil detecção e alta mortalidade (Parker et al., 1996). Para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o câncer de pâncreas, é necessário que os mecanismos moleculares que desencadeiam o câncer pancreático sejam desvendados. As alterações moleculares melhor conhecidas do câncer de pâncreas são mutações oncogênicas no gene da GTPase *KRAS*, que estão presentes em mais de 90% dos pacientes (Morris et al., 2010; Karamitopoulou, 2013; Guerra et al., 2013; Furukawa, 2009; Mohelnikova-Duchonova et al., 2013) e estão causalmente relacionadas à transformação oncogênica (Chang, 1983; Der, 1982; Braun, 2004; Jackson, 2001; Fisher, 2001; Arvanitakis, 2004; Puig, 2000).

O proto-oncogene *KRAS* representa um fator-chave na etiologia e evolução do câncer, uma vez que seu produto frequentemente apresenta mutações em pacientes portadores de câncer. Devido à alta prevalência das mutações em *KRAS* dentro de um amplo espectro de neoplasias (Arvanitakis, 2004; Puig, 2000), usar a proteína *KRAS* como um alvo terapêutico é uma estratégia racional que deveria trazer benefícios clínicos. Contudo, diversas abordagens terapêuticas foram utilizadas com o intuito de inibir a atividade biológica das proteínas Ras, mas falharam em ensaios clínicos devido à inibição incompleta da atividade desta proteína ou devido à alta toxicidade (Cunningham e col., 2001; Friday e col., 2005).

Portanto, para que seja possível selecionar novas abordagens terapêuticas para o tratamento de câncer pancreático e outras neoplasias induzidas pela *KRAS* oncogênica, será preciso identificar os alvos

moleculares da KRAS que contribuem para o fenótipo maligno.

Nas últimas décadas têm se descrito e estudado melhor os papéis dos RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) através de projetos de expressão gênica em larga escala e de alta cobertura (Rinn et al., 2003; Bertone et al., 2004; Johnson et al., 2005; Birney et al., 2007). Estes ncRNAs podem exercer muitas funções regulatórias essenciais e detêm uma alta complexidade de mecanismos (Mattick, 2007; Taft et al., 2007). Sua regulação tem demonstrado ser tecido específica, ocorrendo durante o desenvolvimento, regulando ciclo celular, e os ncRNAs estão associados com várias doenças humanas, tais como o câncer, a partir de associações a complexos proteicos remodeladores da cromatina ou ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Reis et al., 2004; Nakaya et al., 2007; Taft et al., 2007).

Os ncRNAs passaram a ser classificados de acordo com as purificações obtidas destes produtos e, foram divididos em ncRNAs longos (lncRNAs) com mais de 200 nucleotídeos e ncRNAs curtos, quando menores que 200 nucleotídeos. Na classe dos ncRNAs longos (lncRNAs), temos os ncRNAs longos intergênicos (lincRNA), que são transcritos de atuação em regiões a pelo menos 1kb de distância de genes codificadores de proteínas, podendo sofrer splicing; e os lncRNAs intrônicos antisense, que são transcritos expressos de maneira antisense a íntrons de genes conhecidos. Existem evidências de que o mecanismo de ação destes lncRNAs envolve interações entre o lncRNA e proteínas, principalmente componentes de complexos remodeladores ou modificadores da cromatina, resultando na ativação ou repressão da expressão gênica (Khalil et al., 2011). Além disso, os lncRNAs podem formar híbridos se ligando ao DNA (RNA/DNA), guiando estes complexos para sítios específicos para executar sua função (Chu et al., 2011; Mattick, 2012) e podem ainda ativar complexos proteicos por modificações alostéricas (Mattick, 2012).

Tanto os lncRNAs intrônicos antisense quanto os intergênicos (lincRNAs) podem estar envolvidos na aquisição e manutenção do fenótipo maligno. Em câncer de pâncreas, Tahira e cols (2011) identificaram um conjunto de lncRNAs intrônicos expressos em tecidos pancreáticos, cuja abundância é correlacionada com a transformação maligna e metástase, apesar de não terem conseguido determinar se os lncRNAs intrônicos identificados atuavam em cis ou trans, o que mostra ainda a necessidade de maiores estudos para melhores esclarecimentos sobre o papel dos lncRNAs no câncer de pâncreas.

Diversos miRNAs foram identificados como reguladores da expressão do oncogene *KRAS* (Johnson et al., 2005). Reciprocamente, estudos mostram uma maior abundância de alguns miRNAs (miR-146b-3p e miR-486-5p) em amostras de câncer de cólon positivas para mutações em *KRAS* (Ragusa et al., 2010; Mosakhani et al., 2012; Ota et al., 2012). Em contrapartida, não existem relatos de correlação entre lncRNAs diferencialmente expressos e *KRAS* oncogênica, embora exista evidência de correlação entre um lncRNA específico e um grupo de genes positivamente regulado por *KRAS* (Xue et al., 2015).

A identificação de lncRNAs regulados pela *KRAS* oncogênica é importante porquê ela permitirá a identificação de novos alvos terapêuticos e servirá de base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas anti-tumorais para neoplasias induzidas pela *KRAS*.

### 3 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral a identificação em células pancreáticas de lncRNAs regulados pelo oncogene *KRAS* que sejam importantes no desenvolvimento e/ou manutenção do fenótipo maligno.

#### 3.1 Objetivos específicos:

- Selecionar os lncRNAs diferencialmente expressos mais interessantes em linhagens primárias imortalizadas na presença ou ausência da oncoproteína *KRAS* através de experimentos com microarranjos de DNA (experimentos de microarranjo já realizados);
- Validar a expressão diferencial dos lncRNAs escolhidos nas linhagens primárias pancreáticas por qRT-PCR e confirmar a expressão diferencial dos lncRNAs validados em células neoplásticas oncogênicas portadoras da forma oncogênica da *KRAS* através de inibição da expressão de *KRAS* por interferência de RNA.

### 4 Plano de trabalho e cronograma de execução

- Objetivo específico 1: *Identificar e validar os lncRNAs diferencialmente expressos em linhagens primárias imortalizadas na presença ou ausência do oncogene KRAS.*

Para seleção dos lncRNAs diferencialmente expressos, utilizaremos os resultados do ensaio de microarranjo de DNA já realizado na linhagem epitelial pancreática humana imortalizada com os genes *E6/E7* do vírus HPV (HPDE) e a mesma linhagem transformada pela KRAS (HPDE-KRAS) (Ouyang et al., 2000). Escolherá-se os lncRNAs que apresentaram maior diferença de expressão nos experimentos de microarranjo. No caso dos lncRNAs antissense, selecionará-se também os lncRNAs cuja expressão diferencial seja inversa à expressão do gene codificador com os quais eles estão colocalizados (a lâmina de microarranjo de lncRNAs contém também sondas para genes codificadores, o que permite, em alguns casos, esta comparação).

Considerando-se que experimentos de microarranjos de DNA estão sujeitos a resultados falso-positivos, será importante validar a expressão diferencial nas linhagens primárias por uma segunda abordagem. Nós utilizaremos, neste caso, qRT-PCR, que por ser quantitativa e analisar cada gene individualmente, permite a validação dos hits mais interessantes dos experimentos de microarranjo.

- Objetivo específico 2: *Validar a expressão diferencial nas linhagens primárias e confirmar os lncRNAs identificados em células neoplásticas humanas portadoras da forma oncogênica da KRAS.*

Apesar das células HPDE e HPDE-KRAS permitirem a identificação de ncRNAs regulados por KRAS, estas células primárias “engenheiradas” podem não representar um reflexo fiel do que ocorre em uma célula tumoral pancreática “real”. As células tumorais humanas apresentam múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que podem influenciar a expressão dos lncRNAs independentemente da KRAS. Por este motivo, é importante confirmar que os lncRNAs identificados no objetivo específico 1 e validados por qRT-PCR também apresentam expressão dependente de KRAS em células tumorais oriundas de pacientes portadores de mutações no gene *KRAS*. Portanto, os lncRNAs com expressão diferencial validada nas linhagens primárias serão confirmados nas linhagens tumorais MIAPaCa e Panc1 de carcinoma pancreático expressando a forma oncogênica da KRAS. Para tanto, a expressão de *KRAS* nestas linhagens será inibida através de interferência de RNA estavelmente e de forma induzível por doxíclicina através da transdução dessas células com duas cepas lentivirais expressando short hairpin RNAs (shRNAs) diferentes para o mRNA da KRAS. Como controle, utilizaremos, em paralelo, a transdução destas células com partículas virais expressando shRNAs para o mRNA da GAPDH e/ou expressando um shRNA sem homologia para genes humanos conhecidos (non-targeting shRNA). A confirmação da inibição da expressão de *KRAS* e de *GAPDH* será realizada por qRT-PCR e/ou Western Blot. A confirmação da expressão diferencial dos lncRNAs identificados no Objetivo 1 será realizada por qRT-PCR nas linhagens sem e com inibição da expressão de *KRAS* por RNAi.

Caso haja tempo hábil daremos início a avaliação funcional do ncRNA mais promissor validado nas etapas anteriores. Para tanto realizaremos ensaios de ganho e/ou perda de função do ncRNA selecionado e avaliaremos o impacto funcional sobre propriedades malignas através de ensaios clonogênicos na presença e ausência de ancoragem.

Table 1: Cronograma de execução

Atividade	Semestre			
	1	2	3	4
Validação da expressão diferencial dos lncRNAs nas células HPDE/HPDE-KRAS	■	■		
Geração de células MIAPaCa e Panc1 manipuladas para inibição induzível de <i>KRAS</i> por interferência de RNA	■	■		
Validação da expressão diferencial dos lncRNAs nas células MIAPaCa e Panc1 com inibição da expressão de <i>KRAS</i> por interferência de RNA			■	■
Análise de resultados				■ ■
Elaboração de manuscritos para publicação				■
Participação em congressos			■	

## 5 Materiais e métodos

Para a execução da estratégia experimental proposta serão utilizadas as seguintes técnicas e ensaios:

- Reação de transcrição reversa;
- Ensaios de qRT-PCR;
- Western blot;
- Infecção lentiviral e seleção de células estáveis.

Todos os experimentos serão realizados utilizando-se, preferencialmente, replicatas experimentais e biológicas em número maior ou igual a 3. Os resultados serão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 ou mais experimentos independentes.

## 6 Referências

- [1] Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. 1996. *Cancer statistics*. CA Cancer J Clin. Jan-Feb;46(1):5-27.
- [2] Morris JPt, Wang SC, Hebrok M. 2010. *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Rev Cancer 10: 683–695.
- [3] Karamitopoulou E. 2013. *Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer*. Front Oncol. Jan 4;2:209 .
- [4] Guerra C. and Barbacid M. 2013. *Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma*. Mol. Oncol. 7, 232-247.
- [5] Furukawa T. 2013. *Molecular pathology of pancreatic cancer: implications for molecular targeting therapy*. Clin Gastroenterol H: Clin Prac J Am Gastroen Assoc. 7:S35–S39.
- [6] Mohelnikova-Duchonova B., Brynychova V., Hlavac V., Kocik M., Oliverius M., Hlavsa J., et al. 2013. *The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer*. Cancer Chemother. Pharmacol. 72 669–682 10.1007/s00280-013-2246-2
- [7] Chang BK. 1983. *Comparison of in vitro methods for assessing cytotoxic activity against two pancreatic adenocarcinoma cell lines*. Cancer Res. 43:73147–9.
- [8] Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. 1982. *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 79:3637–3640.
- [9] Braun S, Marth C. 2004. *Circulating tumor cells in metastatic breast cancer — toward individualized treatment?* N Engl J Med. 351:824–6.
- [10] Jackson AL, Loeb LA. 2001. *The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer*. Mutat Res. 477:7–21
- [11] Fisher GH et al. 2001. *Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes*. Genes & development 15, 3249–3262.
- [12] Arvanitakis M, Van Laethem JL, Parma J, De Maertelaer V, Delhaye M, Devière J. 2004. *Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation*. Endoscopy. 36:535–542
- [13] Puig P, Urgell E, Capellá G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, Farré A, Luis F, González-Sastre F, Mora J. 2000. *A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer*. Int J Cancer. 85:73–77
- [14] Cunningham CC, Holmlund JT, Geary RS, Kwok TJ, Dorr A, et al. 2001. *A Phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma*. Cancer 5: 1265–1271

- [15] Friday BB, Adjei AA. 2005. *K-ras as a target for cancer therapy*. Biochim Biophys Acta. Nov 25; 1756(2):127–144
- [16] Rinn JL, Euskirchen G, Bertone P, Martone R, Luscombe NM, Hartman S, et al. 2003. *The transcriptional activity of human chromosome 22*. Genes Dev. 17:529–40.
- [17] Bertone P et al. 2004. *Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays*. Science 306, 2242–2246.
- [18] Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. 2005. *DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic Escherichia coli transmissible R plasmid*. Antimicrob Agents Chemother. 49:4681–4688.
- [19] Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, et al. 2007. *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. Nature. 447(7146):799–816.
- [20] Mattick JS. 2007. *A new paradigm for developmental biology*. J Exp Biol. 210:1526–1547.
- [21] Taft R. J., Pheasant M. & Mattick J. S. 2007. *The relationship between nonprotein coding DNA and eukaryotic complexity*. Bioessays 29, 288–299.
- [22] Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, et al. 2004. *Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer*. Oncogene. 23:6684–92.
- [23] Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, et al. 2007. *Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription*. Genome Biol. 8:43.
- [24] Khalil AM, Rinn JL. 2011. *RNA-protein interactions in human health and disease*. Semin Cell Dev Biol. 22:359–365
- [25] Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. 2011. *Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions*. Mol. Cell 44, 667–678.
- [26] Mattick JS. 2012. *RNA driving the epigenetic bus*. EMBO J 31: 515–516
- [27] Tahira AC, Kubrusly MS, Faria MF, Dazzani B, Fonseca RS, Maracaja-Coutinho V, Verjovski-Almeida S, Machado MC, Reis EM. 2011. *Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer*. Mol Cancer. 10:141.
- [28] Ragusa M, Statello L, Maugeri M, Majorana A, Barbagallo D, Salito L, Sammito M, Santonocito M, Angelica R, Cavallaro A, et al. 2012. *Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors*. J Mol Med (Berl) 90:1421–1438.
- [29] Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I. et al. 2012. *MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status*. Genes Chromosomes Cancer. 51:1–9.
- [30] Ota T, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S, Tsunoda T. 2012. *KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells*. Anticancer Res. 32:2271–2275.
- [31] Xue Y, et al. 2015. *Genome-wide analysis of long noncoding RNA signature in human colorectal cancer*. Gene 556, 227–234.
- [32] Ouyang H, Mou L, Luk C, Liu N, Karaskova J, Squire J, et al. 2000. *Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype*. Am J Pathol. 157:1623–1631

.....  
Daniela Sanchez Bassères

.....  
Vitor Heidrich