



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*LUCIANA DA TORRE CARNEIRO*

**Regulação de FOXK2 por AKT: papel na resistência às drogas no  
câncer de mama**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gabriela Nestal de Moraes

**RIO DE JANEIRO  
2021**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*LUCIANA DA TORRE CARNEIRO*

**Regulação de FOXK2 por AKT: papel na resistência às drogas no  
câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Oncologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Nestal de Moraes

**RIO DE JANEIRO  
2021**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*LUCIANA DA TORRE CARNEIRO*

**Regulação de FOXK2 por AKT: papel na resistência às drogas no  
câncer de mama**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Nestal de Moraes**

**Aprovada em: 27 de agosto de 2021**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Leonardo Karam Teixeira (INCA) - Presidente  
Prof. Dr. Renato Sampaio Carvalho (UFRJ)  
Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCAR)  
Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho (INCA) – Suplente I  
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro (UFRJ) – Suplente II

**RIO DE JANEIRO  
2021**

C289r Carneiro, Luciana da Torre  
Regulação de FOXK2 por AKT: papel na resistência às drogas no câncer de mama / Luciana da Torre Carneiro – Rio de Janeiro, 2021.  
131 f. il. Color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2021.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Nestal de Moraes

1. Neoplasias da Mama. 2. Regulação de FOXK2. 3. Resistência a Medicamentos. 4 Fatores de Transcrição. I. (Orient.). Gabriela Nestal de Moraes. II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99449061

Em meio a pandemia de Covid-19, não posso deixar de dedicar essa dissertação a todos os profissionais que se dedicaram a gerar conhecimento, cuidar do próximo e salvar vidas. Aqueles verdadeiros heróis, que lutam todos os dias para sobreviver, viver e construir um mundo mais justo. Em especial, dedico esse trabalho a todos os cientistas, que seguem firme nessa carreira tão enriquecedora e, ao mesmo tempo, muito desafiadora. Em tempos tão obscuros, fazer ciência tornou-se um ato de resistência.

## AGRADECIMENTOS

Muitas histórias, pessoas, encontros e desencontros me trouxeram até esse momento. Uma das etapas mais desafiadoras e engrandecedoras da minha vida. Sem sombra de dúvidas, esse trabalho não seria possível sem uma grande rede de apoio e de colaboração. Além dos conceitos e das experiências, o Mestrado me ensinou que não se constrói ciência sozinho. O conhecimento científico é fruto da coletividade, é uma corrida que se corre junto e, por isso, eu gostaria de agradecer imensamente a todos os momentos vividos e a todas as pessoas que estiveram direta ou indiretamente envolvidas nessa trajetória:

À minha família, minhas raízes, minha base. Aqueles que me fizeram ser quem eu sou hoje e me fizeram chegar até aqui, sabendo o real valor de uma vida honesta. À minha mãe, uma mulher guerreira e corajosa com quem eu aprendi a nunca desistir e sempre correr atrás dos meus sonhos. Ao meu pai, que sempre me mostrou o que é ser forte e permanecer lutando, mesmo com as dificuldades. À minha irmã, dona do maior coração que habita esse mundo, que me mostra que a vida até pode ser difícil, mas é possível e é bela. Agradeço infinitamente a vocês por todo apoio ao longo desses 26 anos, a todas as risadas no “quarto da Lucília”, ao cheirinho de café com bolo no domingo, aos meses que passamos realmente juntos na casa da Rua Getúlio Vargas, com tantas histórias e sempre cheia de bichinhos. Não posso deixar de agradecer à minha avó, por me mostrar a beleza de aprender desde quando eu era pequenininha, ao Rafa, pela presença leve e descontraída, e à Manu, esse serzinho iluminado que me mostra a todo momento que a vida acontece nos pequenos detalhes, nas brincadeiras, nas cartinhas para a “titia” e nos abraços apertados.

À minha orientadora, Gabriela Nestal, ou melhor, Gabi, por estar comigo desde o início dessa caminhada, lá em 2017. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata à você, a todo o seu companheirismo e à confiança em mim depositada para desenvolver esse projeto tão complexo e desafiador. Passamos por muitas mudanças ao longo de todo esse tempo, amadurecemos, crescemos, aprendemos e permanecemos juntas! Obrigada por todo o apoio ao longo desse trabalho: os conselhos, os incentivos, os finais de semana dedicados a essa dissertação e, claro, os dias de muito trabalho no Fundão, correndo gel e saindo às 23h, com direito a muitas aventuras no estacionamento do CCS. É muita história e é bom demais dividi-las contigo. Você é genial!

À Raquel Maia, por ter me recebido e acolhido em seu laboratório com muito carinho e por sempre me incentivar. Jamais vou esquecer o momento em que você me escolheu para representar o grupo no seminário da Pós-graduação, foi desafiador, ri de nervoso com você, mas ao mesmo tempo foi muito enriquecedor para minha trajetória.

Às meninas do grupo da mama, Bruninha, Carol, Mari Concentino, Mari Brandão e Lau, ex-integrante do laboratório, que sempre vai fazer parte do nosso grupo. Obrigada pelo apoio, pela ajuda com os experimentos, pelas conversas, sejam elas científicas ou não, pelas risadas e pela parceria. Cada uma de vocês tem um jeitinho único que contribuiu para tornar essa caminhada mais leve e alegre.

A todos do Laboratório de Hemato-oncologia Celular e Molecular, integrantes e ex-integrantes com quem eu convivi e convivo boa parte dos meus dias: Thais, Paula, Igor, Marcos Vinícius, Yara, Gustavo, Flavia, Claudete, Gisele, Marcela, Luciano, Paloma, Michelle, Fernanda, Gabriel, Lucas, Cris, Letícia, Nicolas e Mariana. Obrigada por todas as discussões científicas, contribuições para esse trabalho, conselhos, incentivos, risadas e, claro, os cafés em boa companhia. Vocês tornaram a rotina mais leve e cada um foi especial à sua maneira ao longo dessa jornada. Em especial, gostaria de reiterar meus agradecimentos à Thata e ao Igor, pessoinhas pra lá de especiais, de corações enormes, que me ajudaram muito na bancada e me encheram de alegria. Vocês são sensacionais!

Ao Léo e a Jo, que nos ajudaram e ajudam diariamente na organização e na rotina do laboratório e, mais do que isso, nos mostram todos os dias que ser feliz é mais simples do que a gente imagina. Obrigada pelos cafés, as risadas, ou melhor, gargalhadas, as dancinhas e a ótima companhia. Léozitcho, você se tornou um grande amigo, que me ajudou a manter a calma e a continuar sorrindo no meio da correria. Você é demais!

Ao grande amor da minha vida, Thomas Gamboa, ou melhor, Thom. Meu amigo, meu companheiro, meu namorado e agora meu “namorido”. Obrigada pelas inúmeras vezes em que segurou na minha mão e disse: “vai dar tudo certo, você vai conseguir”. Obrigada pelos abraços apertados, por enxugar as minhas lágrimas e por me proporcionar boas risadas. Você é um ponto de paz e carinho no meio dessa vida caótica, estar com você é me sentir em casa. Que sorte a minha ter você comigo todos os dias. Te amo!

Aos Martins Gamboa, que se tornaram uma segunda família. Muito obrigada por me acolherem, torcerem por mim e me incentivarem. Sou grata por cada detalhe, as viagens para Friburgo, os inúmeros cafés com leite e as rodadas de Uno. Vocês me mostraram que a graça e a riqueza da vida estão nas coisas mais simples, naquele passeio na orla da praia, naquele sorvete compartilhado e naquela vista de fim de tarde na janela da Rua Lafaiete. Obrigada!

Às minhas grandes amigas, Mari, Mey e Fe, que estão comigo desde 2009 lá no IFRJ, no auge dos nossos 14/15 anos. Seguimos caminhos muito diferentes, mas permanecemos juntas, nos apoiando, nos incentivando e nos cuidando! Vocês me inspiram e me ensinam até hoje o verdadeiro significado da amizade. Amo vocês.

A todos os amigos da Biologia-UFRJ que eu tive a oportunidade de conviver durante a graduação e dividiram comigo o início dessa jornada acadêmica e muitas experiências que vou levar pro resto da minha vida. Em especial, agradeço à Raquel Mattos, que se tornou uma grande amiga, para além dos limites do Fundão. Obrigada pelas conversas, pelo carinho, pelo seu abraço caloroso e por não soltar a minha mão. Você é incrível!

À Deus, da forma mais singular e pessoal que eu o enxergo: a força da natureza, o grande equilíbrio do universo e o amor, que permeiam a nossa existência.

Aos nossos colaboradores que contribuíram de forma direta para a realização desse projeto: Andrew Sharrocks (*Faculty of Life Sciences, University of Manchester*) e Eric Lam (*Department of Surgery and Cancer, Imperial College London*), por nos cederem os vetores plasmidiais utilizados ao longo desse estudo e pela troca de ideias e de sugestões; Wallace Araujo, do Programa de Oncobiologia Celular e Molecular do INCA, por ter nos ajudado na realização dos experimentos de inibição de GSK3 $\beta$ .

Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desse trabalho.

Aos membros da secretaria de Pós-graduação do INCA, que me auxiliaram em diferentes momentos do mestrado.

Às agências de fomento que permitiram que esse trabalho fosse desenvolvido, mesmo em um momento tão difícil para a ciência brasileira.

A todos, afirmo os meus mais sinceros agradecimentos. Muito obrigada por fazerem parte dessa história de alguma forma. Jamais conseguirei expressar em palavras o quanto esse processo significa para mim e o quanto tudo isso contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Sem dúvidas, ainda tenho muita coisa para aprender e aí está a graça da vida, mas tenho a certeza de que finalizo essa dissertação mais forte e resiliente do que a Luciana de quase três anos atrás. Que privilégio foi dividir isso com cada um de vocês!



*“Pare, não tenha pressa,  
não carece acelerar,  
a vida já é tão curta,  
é preciso aproveitar  
essa estranha corrida  
que a chegada é a partida  
e ninguém pode evitar!”*

*A corrida da vida - Bráulio Bessa*



## INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

### Regulação de FOXK2 por AKT: papel na resistência às drogas no câncer de mama

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana da Torre Carneiro

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre mulheres, com taxas de sucesso terapêutico ainda limitadas pela resistência aos quimioterápicos. Em um trabalho prévio, nosso grupo demonstrou que o fator de transcrição FOXK2 medeia a sensibilidade às drogas em células de câncer de mama. Por outro lado, células quimiorresistentes e pacientes com pior prognóstico possuem níveis proteicos de FOXK2 constitutivamente elevados, sugerindo que modificações pós-traducionais podem inativar suas funções. Uma análise *in silico* revelou a quinase oncogênica AKT como a principal possível reguladora de FOXK2 e, assim, estabelecemos a hipótese de que AKT fosforila e inativa FOXK2 em células de câncer de mama. Nossos dados prévios indicam que o maior conteúdo proteico de FOXK2 está associado com maiores níveis de AKT fosforilada e com um fenótipo de maior sobrevivência e resistência à doxorrubicina em células de câncer de mama. Com isso, o objetivo desse projeto foi avaliar o papel das modulações de AKT nos níveis proteicos e na localização subcelular de FOXK2, bem como o impacto do eixo AKT-FOXK2 na resistência aos quimioterápicos em células de câncer de mama. Após a inibição gênica e farmacológica de AKT, as células quimiorresistentes MDA-MB-231 mostraram uma redução dos níveis proteicos exógenos e endógenos de FOXK2, particularmente das bandas de menor mobilidade, um potencial indicativo de modificações pós-traducionais. O efeito da regulação de FOXK2 por AKT não depende de GSK3 $\beta$ , uma vez que a inibição de GSK3 $\beta$  não altera o perfil de bandas de FOXK2 em células MDA-MB-231. Por fracionamento subcelular, observamos que FOXK2 e AKT fosforilada encontram-se predominantemente no núcleo de células MDA-MB-231, diferente do observado nas células MCF-7, perfil esse que não é modulado mediante a inibição farmacológica de AKT. Adicionalmente, experimentos envolvendo o tratamento com a lambda-fosfatase e a corrida em gel Phos-tag sugerem que a mobilidade de FOXK2 é alterada em células MDA-MB-231. Reforçando nossos achados, uma análise *in silico* identificou sítios de fosforilação em FOXK2 mais expressos em amostras tumorais de câncer de mama. Por fim, ensaios funcionais revelaram que a inibição e superexpressão de AKT impactam na resposta à doxorrubicina e ao docetaxel, o que está associado à modulação dos níveis proteicos de FOXK2. Em suma, nossos dados sugerem que AKT pode regular os níveis proteicos de FOXK2, sem alterar a sua localização subcelular, em células de câncer de mama quimiorresistentes. A investigação molecular do eixo AKT-FOXK2 pode prover o racional para novas estratégias, visando melhorar a resposta ao tratamento quimioterápico em tumores exibindo o fenótipo de resistência às drogas.



Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação

## INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

### Regulation of FOXK2 by AKT: role in breast cancer drug resistance

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana da Torre Carneiro

Breast cancer is the leading cause of cancer death among women, with therapeutic success rates still limited by drug resistance. In a previous work, our group demonstrated that FOXK2 transcription factor modulates drug sensitivity in breast cancer cells. In contrast, drug-resistant breast cancer cell lines and poor outcome patients exhibit constitutively high FOXK2 protein levels, suggesting that post-translational modifications might impair its functions. Based on an *in silico* analysis which revealed AKT oncogenic kinase as the main putative regulator of FOXK2, we hypothesized that AKT phosphorylates and inactivates FOXK2 in breast cancer cells. Our previous data indicate that higher FOXK2 protein content is associated with higher levels of AKT phosphorylation, improved survival and resistance to doxorubicin in breast cancer cells. Thus, the aim of this project was to evaluate the role of AKT modulations in the regulation of FOXK2 protein levels and subcellular localization, as well as the impact of the AKT-FOXK2 axis on drug resistance in breast cancer cells. Following gene and pharmacological inhibition of AKT, MDA-MB-231 drug-resistant cells showed a reduction in exogenous and endogenous FOXK2 protein levels, particularly in the lower mobility bands, suggestive of post-translational modifications. The effect of FOXK2 regulation by AKT is not dependent upon GSK3 $\beta$ , as inhibition of GSK3 $\beta$  does not alter the protein bands of FOXK2 in MDA-MB-231 cells. By subcellular fractionation, we observed that FOXK2 and phosphorylated AKT are predominantly found in the nucleus of MDA-MB-231 cells, differently from the profile observed in MCF-7 cells. Also, pharmacological inhibition of AKT does not alter FOXK2 subcellular localization in our drug-resistant cells. Additionally, experiments involving lambda-phosphatase treatment and Phos-tag gels suggest that FOXK2 mobility is altered in MDA-MB-231 cells. Reinforcing our findings, an *in silico* analysis identified highly expressed FOXK2 phosphorylation sites in breast tumor samples, suggesting that FOXK2 can be regulated by phosphorylation in this neoplasm. Finally, functional assays revealed that inhibition and overexpression of AKT impact the response to doxorubicin and docetaxel, which is associated with modulation of FOXK2 protein levels. In summary, our results suggest that AKT can regulate FOXK2 protein levels, but not subcellular localization, in drug-resistant breast cancer cells. The molecular investigation of AKT-FOXK2 axis may provide the rationale for novel strategies, aiming to improve responses to chemotherapy in tumors exhibiting the drug-resistant phenotype.

## LISTA DE ABREVIACES

4-OHT: 4-hidroxitamoxifeno

ABC: *ATP-binding cassette*

Ack1: *activated Cdc42 kinase 1*

AGC: *cAMP-dependent protein kinase (PKA)/cGMP-dependent protein kinase (PKG)/protein kinase C (PKC)*

AKT: Quinase B

AP-1: Proteína ativadora-1

APS: Persulfato de amnio

ASXL1: *Additional sex combs-like 1*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATGs: Genes associados à autofagia

ATM: Ataxia-telangiectasia mutada

ATP: Adenosina trifosfato

Bad: *Bcl2-associated agonist of cell death*

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

BAP-1: Proteína-1 associada ao BRCA1

BARD1: Proteína 1 do domnio RING associada ao BRCA1

Bax: Proteína X ligada à Bcl-2

BCAS3: *Microtubule Associated Cell Migration Factor*

Bcl-2: Proteína de linfomas de células B-2

BIRC5: *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*

BRCA1: Gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1

BRCA2: Gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2

BSA: Albumina de soro bovino

CCND1: Ciclina D1

ccRCC: Carcinoma renal de células claras

CDH1: *Cadherin 1*

CDH2: *Cadherin 2*

CDK: Quinase dependente de ciclina

CDK4: Quinase dependente de ciclina 4

CHK2: *Checkpoint kinase 2*

CREBBP: Proteína de ligaoo ao elemento de resposta do AMP cíclico

CUL4B: *Cullin-4B*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOX: Doxorubicina

DTX: Docetaxel

DVL: *Dishevelled*

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT: Transição epitélio-mesênquima

ERBB2: *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*

ER $\alpha$ : Receptor de estrogênio  $\alpha$

EZH2: *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*

FDA: *U. S. Food and Drug Administration*

FHA: *Forkhead-associated domain*

FHRE: *Forkhead responsive elements*

FOX: *Forkhead box*

FOXC2: *Forkhead box C2*

FOXM1: *Forkhead box M1*

FOXO: *Forkhead box O*

FOXO3a: *Forkhead box O3a*

GAP: GTPase

GATA3: *GATA Binding Protein 3*

GDP: Difosfato de guanósina

GPCRs: Receptores acoplados à proteína G

GSH: Glutathiona

GSK3: Glicogênio sintase quinase 3

GST: Glutathiona-S-transferase

GTP: Trifosfato de guanósina

HBD: Domínio de ligação ao hormônio

HDAC: Complexo corepressor Sin3A desacetilase de histonas

HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HER2+: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo

HIF-1 $\alpha$ : Fator induzível por hipóxia 1-alfa

HIF-1 $\beta$ : Fator induzível por hipóxia 1-beta

HIFs: Fatores induzidos por hipóxia

HIG2: *Hypoxia-inducibile protein 2*

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HR+: Receptor hormonal positivo  
Hsp90: *Heat Shock Protein 90*  
HSP90AA1: *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1*  
IAPs: Proteínas inibidoras da apoptose  
IARC: *International Agency for Research on Cancer*  
IL-2: Interleucina-2  
INCA: Instituto Nacional de Câncer  
INSR: Receptor de insulina  
JAK: *Janus kinase*  
kDa: Quilodalton  
KRAS: *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*  
LTR: *Long terminal repeat*  
MBD6: *Methyl-CpG binding domain protein 6*  
Mcl-1: *Myeloid cell leukemia 1*  
MDR: Resistência a múltiplas drogas  
miR: MicroRNA  
mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
mTORC1: Complexo mTOR 1  
mTORC2: Complexo mTOR 2  
myrAKT: AKT contendo sequência sinal de miristoilação  
NCoR/SMRT: Correpresor do receptor nuclear / mediador silenciador do receptor retinóide e do hormônio da tireoide  
nGTBP: *G/T mismatch* no DNA  
NLS: Sinal de localização nuclear  
NuRD: Desacetilase de histona remodeladora de nucleossomos  
PALB2: *Partner and localizer of BRCA2*  
PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase  
pCR: Resposta patológica completa  
PDK1: Quinase dependente de fosfoinosítideo 1  
PD-L1: Ligante de morte celular programada 1  
PH: Domínio de homologia à plecstrina  
PHLPP: *PH domain leucine-rich repeat phosphatase*  
PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase  
PIK3CA: Subunidade catalítica p110 $\alpha$  da fosfatidilinositol-3-quinase  
PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
PP2A: Proteína fosfatase 2  
PR/ER: Receptores de progesterona/estrogênio  
PRAS40: Substrato de AKT rico em prolina  
PR-DUB: Polícomb repressivo deubiquitinase  
PTEN: Fosfatase homóloga à tensina  
PTMs: Modificações pós-traducionais  
RB1: Retinoblastoma 1  
REST/CoREST: *RE1-silencing transcription factor / REST corepressor 1*  
Rheb: *Ras homolog enriched in brain*  
RNA: Ácido ribonucleico  
ROS: Espécies reativas de oxigênio  
RTKs: Receptores tirosina quinase  
S100A4: Proteína A4 de ligação ao cálcio S100  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SFB: Soro fetal bovino  
siRNA: *Small interfering RNA*  
SNAI1: *Snail family transcriptional repressor 1*  
Sox9: *Sex-determining region Y box 9*  
STAT: *Signal transducers and activators of transcription*  
STR: *Short tandem repeats*  
SUS: Sistema Único de Saúde  
TBS: Solução salina tamponada com Tris  
Tcl1: *proto-oncogene T-cell leukemia-1*  
TEMED: Tetrametiletilenodiamina  
™: Marca registrada  
TNBC: Tumores de mama triplo negativos  
TOP2A: *DNA Topoisomerase II Alpha*  
Topo II $\alpha$ : Topoisomerase II $\alpha$   
TP53: *Tumor Protein p53*  
TSC2: *Tuberous Sclerosis Complex 2*  
Twist1: *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*  
VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular  
ZEB1: *Zinc finger e-box binding homeobox 1*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Mecanismos específicos que contribuem para a resistência a drogas no câncer de mama. ....	6
Figura 1.2 – Estrutura do fator de transcrição FOXK2. ....	8
Figura 1.3 – Função de FOXK2 como supressor de tumor ou oncogene, de forma dependente do tipo de câncer. ....	11
Figura 1.4 – Papel de FOXK2 na sensibilidade aos quimioterápicos em câncer de mama. ....	13
Figura 1.5 – Modificações pós-traducionais em FOXK2. ....	14
Figura 1.6 – Estrutura de AKT. ....	16
Figura 1.7 – Regulação de AKT dependente da PI3K. ....	17
Figura 1.8 – Exemplos de efetores da sinalização de AKT. ....	19
Figura 1.9 – Esquema ilustrativo da estrutura das isoformas de AKT. ....	21
Figura 1.10 – Diferentes funções das isoformas de AKT na iniciação e progressão do câncer de mama. ....	23
Figura 1.11 – Hipótese do estudo. ....	26
Figura 1.12 – Níveis proteicos de FOXK2 e AKT em linhagens celulares de câncer de mama com fenótipos distintos de quimiorresistência. ....	26
Figura 1.13 – AKT1 é requerida para a sobrevivência e promove resistência à DOX em células MDA-MB-231. ....	27
Figura 1.14 – O conteúdo proteico de FOXK2 é induzido após a superexpressão de AKT constitutivamente ativa (myrAKT). ....	27
Figura 3.1 – Esquema da estrutura e funcionamento da proteína myrAKT:ER. ....	30
Figura 3.2 – Esquema do mecanismo de ação do MK-2206. ....	31
Figura 3.3 – Desenho experimental de co-transfecção da linhagem MDA-MB-231 com siRNA controle negativo (Non-Silencing control) ou siRNA para AKT1 e os plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2) ....	33
Figura 3.4 – Desenho experimental de inibição farmacológica de AKT pelo MK2206 e transfecção dos plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2) na linhagem MDA-MB-231. ....	34
Figura 3.5 – Desenho experimental de co-transfecção da linhagem MCF-7 com siRNA controle negativo (Non-Silencing control) ou siRNA para FOXK2 e o plasmídeo pBABE-(myr)Akt:ER. ....	34



Figura 3.6 – Desenho experimental de co-transfecção de DNA da linhagem MCF-7 com os plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2) e o plasmídeo pBABE-(myr)Akt:ER.....	35
Figura 3.7 – Condições experimentais dos ensaios de inibição de AKT combinados ao tratamento com lambda-fosfatase.....	37
Figura 3.8 – Phos-tag <sup>TM</sup> SDS-PAGE.....	40
Figura 4.1 – O conteúdo proteico endógeno de FOXK2 é modificado após a inibição gênica de AKT1.....	43
Figura 4.2 – Os níveis proteicos exógenos de FOXK2 são modificados após a inibição gênica de AKT1.....	43
Figura 4.3 – O conteúdo proteico endógeno de FOXK2 é modulado mediante a inibição de AKT pelo LY294002.....	44
Figura 4.4 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 promove sensibilidade às células MDA-MB-231.....	45
Figura 4.5 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 altera os níveis proteicos endógenos de FOXK2.....	46
Figura 4.6 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 modula o conteúdo proteico endógeno de FOXK2.....	47
Figura 4.7 – Os níveis proteicos exógenos de FOXK2 são modificados após a inibição farmacológica de AKT com MK-2206.....	48
Figura 4.8 – O conteúdo proteico de FOXK2 não é modulado mediante a inibição gênica de GSK3 $\beta$ .....	49
Figura 4.9 – O perfil de localização subcelular de FOXK2 e AKT se apresenta diferencial em células MCF-7 e MDA-MB-231.....	50
Figura 4.10 – A localização subcelular de FOXK2 não é modulada após a inibição de AKT pelo LY294002 em células MDA-MB-231.....	51
Figura 4.11 – A localização subcelular de FOXK2 não é modulada após a inibição de AKT pelo MK-2206 em células MDA-MB-231.....	52
Figura 4.12 – Padronização do tratamento com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP).....	53
Figura 4.13 – O conteúdo proteico de FOXK2 é alterado mediante o tratamento com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP).....	54
Figura 4.14 – O tratamento com a lambda-fosfatase altera o perfil de mobilidade de FOXK2 em células inibidas para AKT.....	55
Figura 4.15 – A mobilidade das bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é alterada após a inibição farmacológica de AKT pelo LY294002 e pelo MK-2206.....	56

Figura 4.16 – O perfil de bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é modulado de forma global pela inibição gênica de AKT.....	57
Figura 4.17 – O perfil de bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é modulado após a superexpressão de AKT.....	58
Figura 4.18 – Níveis proteicos totais de FOXK2 em amostras de tecido normal e amostras de câncer de mama.....	59
Figura 4.19 – Níveis proteicos de FOXK2 fosforilada em amostras de tecido normal e amostras de câncer de mama.....	60
Figura 4.20 – A inibição de AKT pelo MK-2206 sensibiliza as células MDA-MB-231 à doxorrubicina e ao docetaxel.....	61
Figura 4.21 – O tratamento com docetaxel inibe de forma pronunciada a capacidade de formação de colônias das células MDA-MB-231, independentemente dos níveis de AKT e FOXK2.....	62
Figura 4.22 – A combinação do tratamento com o MK-2206 e a superexpressão de FOXK2 sensibilizam as células MDA-MB-231 à doxorrubicina.....	63
Figura 4.23 – A superexpressão de AKT modula o conteúdo proteico endógeno, porém não exógeno, de FOXK2.....	65
Figura 4.24 – A superexpressão de AKT confere resistência aos quimioterápicos, independentemente dos níveis proteicos de FOXK2.....	66
Figura 4.25 – A combinação da superexpressão de AKT com a inibição de FOXK2 não modula a sensibilidade aos quimioterápicos.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Assinaturas moleculares das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 .....	29
Tabela 3.2. Condições experimentais utilizadas na transfecção com RNAi .....	32
Tabela 3.3. Condições experimentais para transfecção plasmidial transiente.....	33
Tabela 3.4. Condições de padronização da reação com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP).....	36
Tabela 3.5. Anticorpos primários utilizados na técnica de Western blotting .....	39

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Câncer de mama.....	1
1.1.1. Tratamento do câncer de mama .....	2
1.1.2. Quimioterapia e mecanismos de resistência às drogas quimioterápicas no câncer de mama .....	3
1.2. Fator de transcrição FOXK2.....	7
1.2.1. Estrutura e funções biológicas de FOXK2.....	7
1.2.2. FOXK2 e câncer.....	9
1.2.3. FOXK2 no câncer de mama .....	11
1.2.4. Modificações pós-traducionais em FOXK2.....	13
1.3. AKT (Proteína quinase B) .....	15
1.3.1. Estrutura e ativação de AKT .....	15
1.3.2. Alvos de fosforilação por AKT .....	18
1.3.3. Isoformas de AKT: estrutura, expressão e função no câncer de mama .....	21
1.3.4. Estratégias terapêuticas para a via PI3K/AKT .....	24
1.3.5. Justificativa do estudo .....	25
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos .....	28
3. Materiais e métodos.....	28
3.1. Cultura de células.....	28
3.2. Tratamento com doxorrubicina (DOX) e docetaxel (DTX) .....	29
3.3. Vetores plasmidiais.....	29
3.4. Inibição farmacológica de AKT: LY294002 e MK-2206.....	30
3.5. Inibição gênica de AKT e GSK3 $\beta$ por RNA de interferência (RNAi) .....	32
3.6. Inibição gênica de AKT e superexpressão de FOXK2 .....	32
3.7. Inibição farmacológica de AKT e superexpressão de FOXK2.....	33
3.8. Inibição de FOXK2 e superexpressão de myrAKT .....	34
3.9. Superexpressão de FOXK2 e myrAKT .....	35
3.10. Tratamento com a lambda-fosfatase .....	35
3.11. Inibição de AKT e tratamento com a lambda-fosfatase .....	36
3.12. Ensaio de MTT .....	37
3.13. Ensaio clonogênico .....	38

3.14. Detecção da expressão de proteínas por Western blotting.....	38
3.15. Phos-tag <sup>TM</sup> SDS-PAGE .....	40
3.16. Fracionamento subcelular .....	41
3.17. Análise de banco de dados em câncer de mama.....	41
3.18. Análises estatísticas .....	42
4. Resultados.....	42
4.1. A inibição gênica de AKT modula o conteúdo proteico de FOXK2 em células quimiorresistentes .....	42
4.2. A inibição farmacológica de AKT modula o conteúdo proteico de FOXK2 em células quimiorresistentes .....	44
4.3. A inibição gênica de GSK3 $\beta$ , alvo clássico de fosforilação por AKT, não modula os níveis proteicos de FOXK2.....	48
4.4. A localização nuclear de AKT fosforilada está associada ao perfil de maior resistência aos quimioterápicos .....	49
4.5. A inibição farmacológica de AKT não modula a localização subcelular de FOXK2 em células quimiorresistentes .....	50
4.6. O tratamento com a lambda-fosfatase modula os níveis proteicos de FOXK2 nas células quimiorresistentes .....	52
4.7. O tratamento com a lambda-fosfatase altera o padrão de mobilidade de FOXK2 em células MDA-MB-231 expostas aos inibidores farmacológicos de AKT .....	54
4.8. O conteúdo proteico de FOXK2 em gel Phos-tag <sup>TM</sup> SDS-PAGE é modificado mediante inibição e superexpressão de AKT .....	55
4.9. Os níveis de fosforilação de FOXK2 são encontrados elevados em amostras de pacientes com câncer de mama.....	58
4.10. A inibição de AKT pelo MK-2206 sensibiliza as células MDA-MB-231 aos quimioterápicos.....	60
4.11. A superexpressão de myrAKT confere resistência ao tratamento quimioterápico, independentemente dos níveis proteicos de FOXK2.....	64
5. Discussão.....	67
6. Conclusões.....	73
7. Referências bibliográficas .....	74
8. Anexos.....	88
8.1. Tabela da análise <i>in silico</i> de sítios putativos de regulação por quinases na sequência proteica de FOXK2, utilizando o software de predição iGPS 1.0 .....	88

8.2. Tabela da análise <i>in silico</i> de potenciais sítios de fosforilação por AKT1 na sequência proteica de FOXK2, utilizando o software de predição iGPS 1.0 .....	89
8.3. Trabalho publicado relacionado à dissertação de mestrado.....	89

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente e com maior taxa de mortalidade entre as mulheres no mundo. De acordo com dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, na sigla em inglês), foram estimados mais de 2,2 milhões de novos casos e cerca de 680 mil mortes por câncer de mama entre as mulheres no mundo em 2020 (IARC, 2020). No Brasil, esse tipo tumoral é o mais incidente entre as mulheres, com exceção do câncer de pele não melanoma. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados 66.280 novos casos de câncer de mama para cada ano do triênio 2020-2022, correspondendo à 29,7 % de todos os cânceres (INCA, 2019).

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, compreendendo diferentes subgrupos com assinaturas moleculares distintas (CURTIS *et al.*, 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Essa neoplasia se desenvolve a partir de diversas alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor. Dentre os genes implicados na iniciação e progressão do câncer de mama, incluem-se: *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT1*, *TP53*, *GATA3*, *CDH1*, *RBI*, *ERBB2*, *PALB2*, *BRCA1* e *BRCA2* (NIK-ZAINAL *et al.*, 2016; HARBECK *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Notavelmente, a distribuição das anormalidades genéticas e epigenéticas é bastante variável entre os principais subtipos de câncer de mama, demonstrando a plasticidade e heterogeneidade desses tumores (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; VUONG *et al.*, 2014). Alguns fatores já foram relacionados com o maior risco de desenvolver câncer de mama, como idade, obesidade, consumo de álcool, fatores reprodutivos e hormonais, falta de atividade física, exposição à radiação, histórico pessoal de doença mamária benigna e histórico familiar de câncer de mama (BETTAIEB *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017).

Os carcinomas de mama são morfologicamente classificados de acordo com o seu padrão de crescimento e grau de diferenciação, estabelecendo subgrupos clinicamente relevantes (RAKHA *et al.*, 2010). A partir do padrão de crescimento, os tumores de mama podem ser classificados em diversos tipos histológicos com características únicas, categorizados, de forma simplificada, em *in situ* ou invasivo (MAKKI, 2015). A primeira categoria refere-se aos tumores limitados ao componente epitelial da mama, enquanto a segunda abrange os tumores que invadem o estroma. Esses dois subtipos englobam diferentes subgrupos histológicos, dentre os quais os mais comuns são os carcinomas lobular e ductal, que diferem pela origem das células tumorais nos lóbulos ou ductos mamários, respectivamente (MALHOTRA *et al.*, 2010; MAKKI, 2015). Além disso, na prática clínica, os tumores de mama

também são classificados quanto ao grau histológico, parâmetro definido com base nos níveis de pleomorfismo nuclear, formação glandular e índice mitótico do tumor, que reflete o quanto as células tumorais se diferenciam das células normais e indica graus de agressividade (MALHOTRA *et al.*, 2010; RAKHA *et al.*, 2010). O índice prognóstico das pacientes com câncer de mama também é composto pelo sistema de classificação TNM, que avalia o tamanho e localização do tumor (T), comprometimento dos linfonodos (N) e metástase (M) (TAHERIAN-FARD *et al.*, 2015).

Além das particularidades histopatológicas, parâmetros moleculares também vêm sendo utilizados na classificação dos tumores de mama, proporcionando uma melhor visualização da heterogeneidade tumoral, previsão do comportamento do tumor e definição de uma estratégia terapêutica mais precisa e eficaz (MAKKI, 2015). A partir da avaliação imunohistoquímica, o câncer de mama é categorizado em três subtipos básicos: receptor hormonal positivo (HR+), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2+) e triplo negativo. O subtipo HR+ representa cerca de 60 % de todos os casos de câncer de mama e é subdividido em luminal A e luminal B. Ambos expressam os receptores de progesterona (PR) e/ou estrogênio (ER), porém o subtipo luminal A não expressa HER2 e possui baixa marcação de Ki-67, um marcador de proliferação. Já o luminal B possui uma expressão variável de HER2 (positivo ou negativo) e apresenta maior marcação de Ki-67, associado com um pior prognóstico em relação ao luminal A. O subtipo HER2+ representa cerca de 20 % de todos os casos de câncer de mama e refere-se aos tumores HER2+ que não expressam os receptores hormonais. Já o subtipo triplo negativo abrange os tumores que não expressam ER, PR e HER2, compreendendo 15 % dos tumores de mama, associados ao pior prognóstico dentre todos os subtipos (MAKKI, 2015; TANG *et al.*, 2016; BETTAIEB *et al.*, 2017).

### **1.1.1. Tratamento do câncer de mama**

As estratégias terapêuticas para o câncer de mama podem ser divididas de forma simplificada em tratamento local e sistêmico. O primeiro inclui a ressecção cirúrgica e a radioterapia, enquanto o segundo abrange a quimioterapia, terapia endócrina e terapia-alvo, podendo ser pré-operatório (neoadjuvante), pós-operatório (adjuvante) ou ambos (Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama – Ministério da Saúde, 2018; WAKS & WINER, 2019). Para o câncer de mama não metastático, o objetivo terapêutico é erradicar o tumor e evitar recidivas, enquanto para a doença metastática, o objetivo é estabelecer os cuidados paliativos e prolongar o tempo de vida, uma vez que esse estágio está associado a taxas muito baixas de sobrevida (WAKS & WINER, 2019).



A escolha da melhor conduta terapêutica é baseada em diversos fatores, incluindo as características histopatológicas do tumor, o grau de comprometimento dos linfonodos, a expressão dos receptores hormonais, a expressão de HER2, a idade da paciente e o estado menopausal (MORENO-ASPITIA & PEREZ, 2009; WAKS & WINER, 2019). As pacientes com tumores HR+ contam com a terapia endócrina baseada no uso do tamoxifeno e/ou inibidores de aromatase, moduladores negativos dos receptores de estrogênio e da síntese de estrogênio, respectivamente. Em adição, algumas pacientes também recebem quimioterapia (CHARGARI *et al.*, 2009; WAKS & WINER, 2019). Já as pacientes com tumores de mama HER2+ se beneficiam da terapia-alvo anti-HER2, que engloba diferentes estratégias, como o uso dos anticorpos monoclonais (trastuzumabe e pertuzumabe) e inibidores tirosina-quinase (lapatinibe, neratinibe e tucatinibe) (AHMED *et al.*, 2015; WAKS & WINER, 2019; MURTHY *et al.*, 2020). Na clínica, as pacientes desse subgrupo também recebem a quimioterapia e a terapia endócrina, essa última no caso de o tumor ser HR+ (WAKS & WINER, 2019). Atualmente, a terapia padrão para os tumores triplo negativos ainda é a quimioterapia (WAKS & WINER, 2019), entretanto a imunoterapia com atezolizumabe foi aprovada para tumores triplo negativos positivos para PD-L1 (ligante de morte celular programada 1) (SCHMID *et al.*, 2018). Há também a opção do olaparibe, inibidor de PARP (poli (ADP-ribose) polimerase), para as pacientes desse subgrupo com mutação em *BRCA* (gene de susceptibilidade ao câncer de mama) (ROBSON *et al.*, 2017), porém essas terapias ainda não foram incorporadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A quimioterapia inclui principalmente a administração de antraciclina (doxorubicina ou epirrubicina), taxanos (paclitaxel ou docetaxel), ciclofosfamida e fluorouracil (Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama – Ministério da Saúde, 2018; WAKS & WINER, 2019).

### **1.1.2. Quimioterapia e mecanismos de resistência às drogas quimioterápicas no câncer de mama**

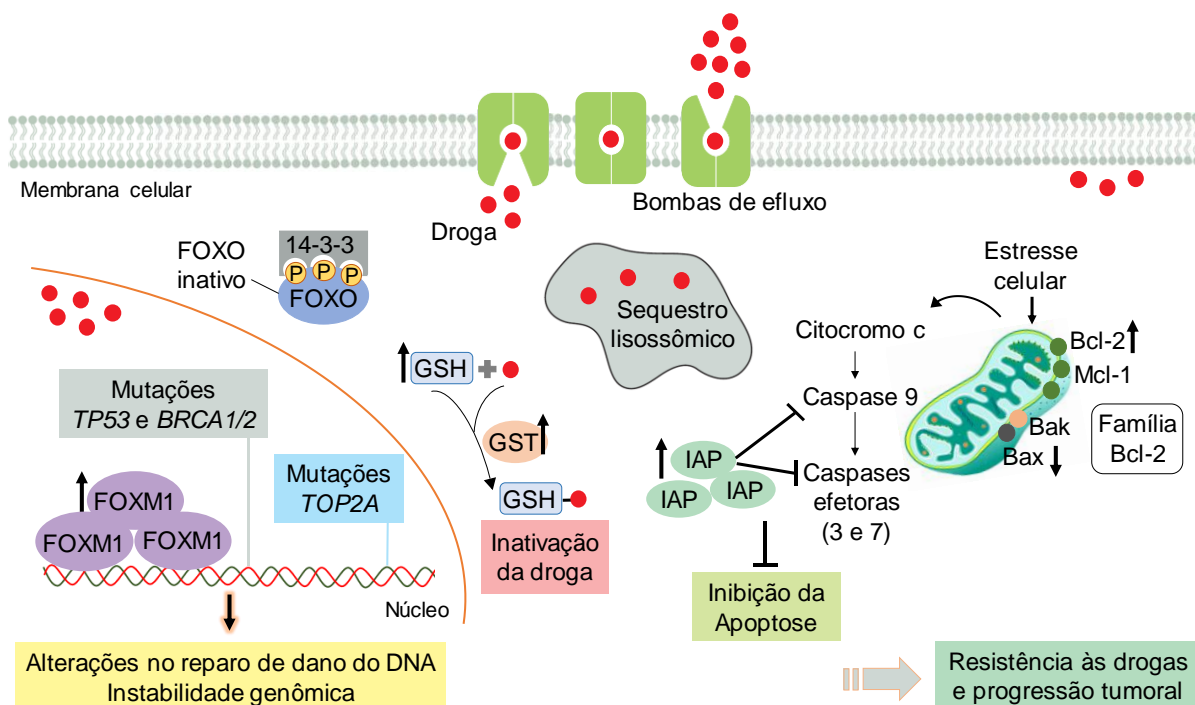
A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (CAGEL *et al.*, 2016). Esse fármaco pertence à classe dos antibióticos antracíclicos e foi inicialmente isolada da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (ARCAMONE *et al.*, 1969). O efeito citotóxico da DOX nas células tumorais ocorre através de três principais mecanismos de ação: intercalação no DNA, inibição da enzima topoisomerase II e geração de radicais livres (THORN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014; CAGEL *et al.*, 2016). A DOX intercala-se no DNA preferencialmente em regiões ricas em guanina e citosina, formando adutos DOX-DNA (YANG *et al.*, 2014; CAGEL

*et al.*, 2016), muito em parte devido à sua interação com a topoisomerase II $\alpha$  (topo II $\alpha$ ), enzima que regula a topologia do DNA (YANG *et al.*, 2014). Mecanicamente, a topo II $\alpha$  liga-se ao DNA superenovelado e quebra ambas as fitas da dupla hélice, relaxando o superenovelamento e restabelecendo a ligação do DNA. Entretanto, ao interagir com a topo II $\alpha$ , a DOX aprisiona a enzima nos sítios de quebra, formando um complexo ternário DOX-DNA-topo II $\alpha$ , que impede a reestruturação do DNA, levando ao acúmulo de quebras de dupla fita ao longo do genoma (YANG *et al.*, 2014; CAGEL *et al.*, 2016). Nesse contexto, a DOX compromete em grande extensão os processos de replicação, transcrição e reparo do DNA (CAGEL *et al.*, 2016). Além desses mecanismos, a DOX apresenta em sua estrutura molecular o radical quinona, que pode ser convertido à radical semiquinona, através de reações redox mediadas por diferentes enzimas celulares. Esses radicais semiquinona podem reagir rapidamente com o oxigênio, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxila (THORN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014). Esses, por sua vez, levam à peroxidação lipídica, estresse oxidativo e danos às membranas celulares e ao DNA (THORN *et al.*, 2011). Em conjunto, os efeitos mediados pela DOX culminam em arresto no crescimento e morte celular (THORN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014; CAGEL *et al.*, 2016). Apesar da ampla ação antineoplásica, o uso da DOX na clínica é limitado por sua elevada toxicidade, incluindo danos cardíacos e hematológicos (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR *et al.*, 2012).

Outros quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento do câncer de mama correspondem à classe dos taxanos, incluindo o docetaxel e o paclitaxel, que atuam como inibidores da função dos microtúbulos (WAKS & WINER, 2019). O docetaxel (DTX), utilizado nesse estudo, é um análogo semissintético do paclitaxel, derivado dos extratos do Teixo Europeu (*Taxus baccata*) (HERBST & KHURI, 2003; ŠKUBNÍK *et al.*, 2021). O efeito citotóxico do DTX envolve principalmente sua ligação à  $\beta$ -tubulina, promovendo a polimerização dos heterodímeros de tubulina e a estabilização das fibras de microtúbulos, o que impede a sua despolimerização (HERBST & KHURI, 2003; ŠKUBNÍK *et al.*, 2021). Como diferentes processos celulares dependem da organização dinâmica dos microtúbulos, o DTX bloqueia eventos críticos nas células, como a divisão celular mitótica, a captação endossomal e os processos de secreção e transporte (MORSE *et al.*, 2005). Durante a mitose, particularmente, o DTX é capaz de perturbar a dinâmica do fuso mitótico, bloqueando a progressão no ciclo celular na fase G2/M (ŠKUBNÍK *et al.*, 2021) e induzindo as células à morte (MORSE *et al.*, 2005; ŠKUBNÍK *et al.*, 2021). Apesar de o DTX ter um elevado efeito antitumoral, seu uso também está associado a efeitos adversos (WAKS & WINER, 2019), o que limita sua utilização na prática clínica.

Embora diferentes estratégias terapêuticas venham sendo desenvolvidas para o tratamento do câncer de mama, a resistência às drogas e a consequente recidiva do tumor ainda é um dos principais obstáculos para o sucesso do tratamento (NEDELJKOVIĆ & DAMJANOVIĆ, 2019). Mesmo após a terapia adequada, cerca de 30-40 % das pacientes diagnosticadas com câncer de mama em estágio II/III progridem para a doença metastática, para a qual as opções terapêuticas são limitadas e as taxas de resposta são geralmente baixas (DEAN-COLOMB & ESTEVA, 2008; RIVERA & GOMEZ, 2010; PLAVA *et al.*, 2019). Já em tumores metastáticos, a quimiorresistência é responsável por cerca de 90 % da falha terapêutica (COLEY, 2008; NEDELJKOVIĆ & DAMJANOVIĆ, 2019). A resistência à quimioterapia pode ser intrínseca das células tumorais ou adquirida ao longo da exposição às drogas, ou seja, o tumor inicialmente é sensível ao tratamento, porém torna-se não responsivo posteriormente, resultando em falha terapêutica. Em adição, a resistência pode ser limitada a uma droga específica ou a múltiplas drogas estruturalmente não relacionadas e com mecanismos de ação distintos, configurando o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN *et al.*, 2016).

Diversos mecanismos estão implicados na quimiorresistência do câncer de mama e, dentre eles, incluem-se: i) superexpressão e elevada atividade dos transportadores da superfamília ABC (*ATP-binding cassette transporters*), que promovem o efluxo das drogas (BALAJI *et al.*, 2016; MALONEY *et al.*, 2020); ii) compartimentalização da droga em organelas, como os lisossomos, diminuindo sua concentração em seus sítios-alvo (GUO *et al.*, 2016); iii) modulação de fatores e/ou enzimas envolvidos na inativação ou detoxificação da droga, como maiores níveis intracelulares de glutathiona (GSH) e glutathiona-S-transferase (GST) (RIVERA & GOMEZ, 2010); iv) alterações nas moléculas-alvo dos quimioterápicos, como mutações e/ou alterações no número de cópias do gene da topoisomerase II $\alpha$  (*TOP2A*) (JARVINEN *et al.*, 2000; COON *et al.*, 2002); v) mutações em *TP53* (gene que codifica p53), *BRCA1/2* e outros genes envolvidos em vias de resposta ao dano no DNA, fazendo com que as células tumorais respondam de forma alterada a estresses (COLEY, 2008; KNAPPSKOG & LONNING, 2012; MALONEY *et al.*, 2020); vi) superexpressão de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e o desequilíbrio entre os membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (proteína de linfomas de células B-2), cooperando para a evasão da apoptose induzida por agentes antitumorais (HU *et al.*, 2018a; WANG *et al.*, 2018a); vii) desregulação da expressão, localização subcelular e função de fatores de transcrição, como os da família *forkhead box* (FOX), incluindo a inibição das proteínas FOXO e/ou a superexpressão de FOXM1, que regulam diferencialmente genes envolvidos com proliferação e ciclo celular, reparo de dano ao DNA, quimiorresistência e morte celular (LAM *et al.*, 2013) (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1 – Mecanismos específicos que contribuem para a resistência a drogas no câncer de mama.** A superexpressão e/ou elevada atividade das bombas de efluxo levam à extrusão de drogas, diminuindo sua concentração intracelular. A concentração de quimioterápicos em seus sítios-alvo também pode ser reduzida pela compartimentalização em organelas, como o lisossomo, e pelo aumento da sua inativação, através de maiores níveis de glutatona (GSH) e glutatona-S-transferase (GST). Mutações em TOP2A (gene que codifica a topoisomerase 2  $\alpha$ ) podem causar alterações moleculares na Topoisomerase II $\alpha$ , contribuindo para a ineficiência de terapias que têm essa enzima como alvo, como a quimioterapia baseada em antracíclicos. A resposta ao estresse genotóxico pode ser alterada por mutações em TP53 (gene que codifica a proteína p53) e BRCA1/2 (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1 e 2), assim como a superexpressão de FOXM1 (*forkhead box M1*) e/ou inibição das proteínas FOXO (*forkhead box O*), como FOXO3a. A superexpressão de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e a desregulação de proteínas da família Bcl-2 (proteína de linfomas de células B-2) também podem cooperar para a evasão da apoptose. Bax e Bak: membros pró-apoptóticos da família Bcl-2; Bcl-2 e Mcl-1: membros anti-apoptóticos da família Bcl-2; 14-3-3: proteína citosólica ubiquamente expressa.

Os mecanismos específicos de resistência às drogas citados acima são facilitados por uma série de propriedades intrínsecas do tumor, como a alta taxa de alterações genéticas e epigenéticas, a heterogeneidade tumoral, a ativação de vias redundantes de sobrevivência e as mudanças dinâmicas ao longo do tempo e do espaço. Além disso, alterações no microambiente tumoral podem influenciar positivamente a sua malignidade e resistência às drogas, incluindo a hipóxia e as interações das células tumorais com a matriz extracelular e com outras células, como fibroblastos e células do sistema imune (GOTTESMAN *et al.*, 2016; BAR-ZEEV *et al.*, 2017). Em conjunto, esses aspectos favorecem a adaptabilidade das células tumorais às adversidades ambientais, como a exposição às drogas citotóxicas.

Diante dos diferentes mecanismos moleculares que contribuem para a resistência ao tratamento anticâncer, o nosso trabalho terá um enfoque na desregulação da expressão e função

de fatores de transcrição FOX/FOXK2 como um mecanismo que pode contribuir para a modulação do fenótipo de resistência a drogas no câncer de mama.

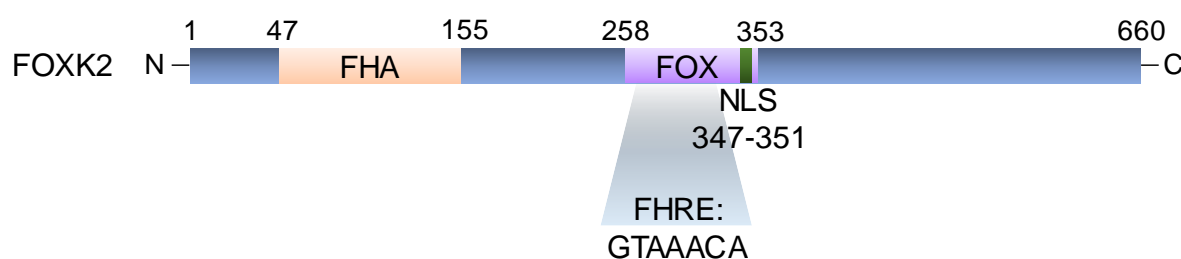
## 1.2. Fator de transcrição FOXK2

### 1.2.1. Estrutura e funções biológicas de FOXK2

A superfamília de proteínas FOX abrange diversos fatores de transcrição que compartilham um domínio de ligação ao DNA (domínio FOX) evolutivamente conservado (LAM *et al.*, 2013). Além de estarem classicamente implicados no desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase em tecidos adultos, os fatores FOX regulam uma série de redes gênicas envolvidas em diferentes processos, como ciclo celular, sobrevivência, proliferação, diferenciação, metabolismo, apoptose e resistência às drogas (LAM *et al.*, 2013; GOLSON & KAESTNER, 2016). As proteínas FOX estão intimamente relacionadas com as dinâmicas de decisões do destino celular, modulando a expressão gênica em resposta a diferentes sinais ambientais (LAM *et al.*, 2013). Dentre os subgrupos da família FOX, o nosso estudo abordará o pouco explorado fator de transcrição FOXK2. FOXK2 foi inicialmente descrito como um fator de ligação a sequências ricas em purina presentes no promotor da *interleucina-2 (IL-2)* e na LTR (do inglês: *long terminal repeat*) do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LI *et al.*, 1991). Esse fator pertence a subfamília FOXK em humanos, juntamente com FOXK1, com o qual compartilha cerca de 50 % da identidade total de aminoácidos (KATOH & KATOH, 2004). FOXK2 é estruturalmente caracterizado por um domínio FHA (*forkhead-associated domain*) na região N-terminal, o domínio FOX de ligação ao DNA e um sinal de localização nuclear (NLS) (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2019) (**Figura 1.2**). Os domínios FHA medeiam interações com proteínas fosforiladas, reconhecendo particularmente resíduos de fosfotreonina e fosfoserina, sendo geralmente encontrados em proteínas envolvidas com resposta ao dano no DNA, crescimento celular, transdução de sinal e regulação do ciclo celular (REINHARDT *et al.*, 2013; ALMAWI *et al.*, 2017).

Com relação à atividade transcricional, Ji *et al.* (2012) demonstraram que FOXK2 interage com os componentes do complexo AP-1 (proteína ativadora-1), recrutando-os para regiões de cromatina aberta e regulando genes implicados em diferentes vias de sinalização, como contato célula-célula, adesão, motilidade, processos metabólicos, transcrição e apoptose (JI *et al.*, 2012). FOXK2 também interage com BAP-1 (proteína-1 associada ao BRCA1) (JI *et al.*, 2014), um supressor tumoral e membro do complexo PR-DUB (policomb repressivo deubiquitinase) (CARBONE, 2013; CHITTOCK *et al.*, 2017). Através de seu domínio FHA,

FOXK2 reconhece a fosfotreonina 493 em BAP-1 (OKINO *et al.*, 2015), facilitando seu recrutamento para a cromatina e promovendo uma deubiquitinação local de histonas, o que leva à ativação ou repressão gênica (JI *et al.*, 2014). Em adição aos eventos associados à cromatina, FOXK2 liga-se ao DNA metilado em células embrionárias de camundongos (IURLARO *et al.*, 2013; SPRUIJT *et al.*, 2013), bem como interage com a MBD6 (*methyl-CpG binding domain protein 6*) e o complexo PR-DUB (BAYMAZ *et al.*, 2014), sugerindo que FOXK2 pode estabelecer uma conexão entre o DNA metilado e o recrutamento de complexos transcricionais. Em conjunto, esses estudos indicam que FOXK2 pode estar envolvida no remodelamento da cromatina e modificação do DNA, atuando como ativador ou repressor transcricional.



**Figura 1.2 – Estrutura do fator de transcrição FOXK2.** FOXK2 possui o domínio FHA (*forkhead-associated domain*) na região amino-terminal e um domínio de ligação ao DNA (FOX – *forkhead box*) localizado na posição carboxi-terminal. O domínio FOX possui um sinal de localização nuclear (NLS) e medeia a ligação de FOXK2 a sequências consenso no DNA com o motivo central GTAAACA. FHRE: *forkhead responsive elements*. Adaptado de NESTAL DE MORAES *et al.*, 2019.

FOXK2 vem sendo implicada no controle de diferentes processos metabólicos. Bowman *et al.* (2014) demonstraram que os fatores FOXK interagem com o complexo corepressor Sin3A desacetilase de histonas (HDAC) em mioblastos e fibroblastos humanos, reprimindo genes envolvidos na iniciação da autofagia e nucleação dos autofagossomos sob condições ricas em nutrientes. Esse eixo de regulação é facilitado por mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), que fosforila FOXK1 e promove sua translocação para o núcleo (BOWMAN *et al.*, 2014). Mais recentemente, foi descrito que a inibição de FOXK1/2 reduz a expressão gênica de *HIF-1α* (*fator induzível por hipóxia 1-alfa*), diminui o consumo de glicose e suprime a proliferação de fibroblastos embrionários de camundongos. Nesse modelo, mTOR regula a fosforilação de FOXK1 indiretamente, através da inibição de GSK3 (glicogênio sintase quinase 3) (HE *et al.*, 2018). Embora ambos os estudos tenham focado em FOXK1, os sítios de fosforilação por mTOR são conservados entre os fatores FOXK, sugerindo que FOXK2 pode ser regulada de maneira similar (BOWMAN *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018). Também foi observado que FOXK2 induz a expressão de genes da via glicolítica e suprime a oxidação do piruvato nas mitocôndrias, favorecendo a glicólise aeróbica e a produção de lactato (SUKONINA *et al.*, 2019). Ressaltando o papel desse fator no metabolismo energético,

camundongos nocaute para *FOXK2* apresentam uma diminuição na captação de glicose em vários tecidos (SUKONINA *et al.*, 2019). Por fim, foi demonstrado que mediante o estímulo de insulina e ativação da via de AKT (proteína quinase B)-mTOR, FOXK2 regula genes implicados na oxidação de ácidos graxos, biogênese mitocondrial, sobrevivência e proliferação celular (SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Além das funções metabólicas, FOXK2 reconhece e se liga a regiões de *G/T mismatch* no DNA (nGTBP) com alta especificidade e afinidade, através do seu domínio FOX (FUJII & NAKAMURA, 2010). Embora FOXK2 não possua um domínio catalítico com função de reparo do DNA, esse fator pode atuar como um sensor de *mismatch*, disparando as vias de reparo (FUJII & NAKAMURA, 2010), o que pode contribuir para a manutenção da estabilidade genômica.

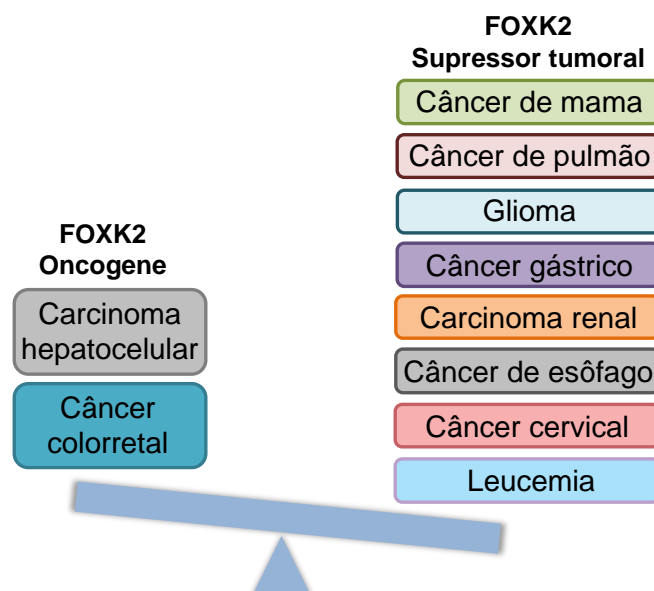
### 1.2.2. FOXK2 e câncer

A primeira descrição de que FOXK2 poderia modular a tumorigênese demonstrou que esse fator de transcrição reconhece resíduos treonina-serina fosforilados e interage com a proteína adenoviral E1A, através de seu domínio FHA, suprimindo a transformação oncogênica *in vitro* e *in vivo* (KOMOREK *et al.*, 2010). Embora os estudos sobre FOXK2 na biologia tumoral tenham se iniciado na última década, as pesquisas apontam que esse fator de transcrição pode atuar como oncogene ou supressor tumoral, dependendo do modelo celular (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2019). Sustentando seu papel como oncogene, FOXK2 promove a translocação da proteína DVL (*dishevelled*) para o núcleo em modelo de câncer colorretal, ativando a via de Wnt/ $\beta$ -catenina, um importante eixo para a proliferação, renovação e diferenciação celular (WANG *et al.*, 2015). Nesse contexto, a inibição de FOXK2 reduz o crescimento tumoral em camundongos, enquanto sua superexpressão é suficiente para ativar a via de Wnt e induzir hiperproliferação intestinal (WANG *et al.*, 2015). Corroborando esses achados, FOXK2 é ativada transcricionalmente pela oncoproteína Sox9 (*sex-determining region Y box 9*), promovendo a proliferação de células de câncer colorretal (QIAN *et al.*, 2017). Seguindo nesse modelo, foi descrito que FOXK2 ativa a transcrição de *ZEB1* (*zinc finger e-box binding homeobox 1*) e *EGFR* (*receptor do fator de crescimento epidérmico*), induzindo migração e invasão, e a maior expressão de FOXK2 em pacientes foi correlacionada com estágios tumorais avançados e metástases (DU *et al.*, 2019). A função oncogênica de FOXK2 também foi observada em carcinoma hepatocelular, no qual esse fator promove proliferação e migração, associado com um aumento nos níveis proteicos de membros da via PI3K/AKT, como AKT fosforilada, Survivina, p27, c-Myc e ciclina D1 (LIN *et al.*, 2017). Em pacientes

com essa neoplasia, a maior expressão de FOXK2 foi correlacionada com estágio TNM avançado e menor tempo de sobrevivência (LIN *et al.*, 2017).

A despeito das descrições de FOXK2 como oncogene, a maioria dos estudos aponta um papel supressor tumoral para esse fator de transcrição. Em carcinoma renal de células claras (ccRCC), a superexpressão de FOXK2 reduz o crescimento celular e induz características apoptóticas *in vitro* e *in vivo*, assim como diminui migração e invasão, o que foi associado à redução dos níveis de RNA mensageiro e proteína do gene *EGFR* (ZHANG *et al.*, 2018). Corroborando esses achados, foi descrito que FOXK2 é um alvo direto do miR-148a-3p, um oncomiR em ccRCC, e sua inibição é capaz de reverter os efeitos da inibição do miR-148a-3p na proliferação, migração e invasão celular (SUN *et al.*, 2020). Em células de glioma, a inibição de FOXK2 induz proliferação, migração e invasão, assim como leva ao aumento da expressão de N-caderina e Vimentina e à diminuição de E-caderina (WANG *et al.*, 2018b). Conclusões similares foram obtidas em câncer gástrico, no qual a superexpressão de FOXK2 induz apoptose e inibe proliferação, migração e invasão, sendo acompanhada por um aumento da expressão de E-caderina e redução de N-caderina (LIU *et al.*, 2018). Reforçando esses achados, a superexpressão de FOXK2 induz os níveis de E-caderina e  $\alpha$ -catenina, ao mesmo tempo que diminui os níveis de N-caderina e Vimentina em células de câncer de pulmão, nas quais FOXK2 também regula negativamente a expressão de *CDH2* (*N-caderina*), *SNAI1* (*snail family transcriptional repressor 1*), *CCND1* (*ciclina D1*) e *CDK4* (*quinase dependente de ciclina 4*), reprimindo proliferação, migração e invasão (CHEN *et al.*, 2017). Esses estudos indicam que FOXK2 pode modular, direta ou indiretamente, a expressão de marcadores envolvidos no processo de transição epitélio-mesênquima (EMT). Em adição, Liu e colaboradores observaram que FOXK2 é regulada negativamente pelo miR-602, um oncomiR em carcinoma de células escamosas do esôfago, e sua superexpressão é capaz de reverter os efeitos do mimético do miR-602 na migração e invasão celular (LIU *et al.*, 2019). Também foi descrito que FOXK2 é regulada de forma positiva pelo RNA circular circ-ITCH, um supressor tumoral em câncer cervical que funciona como uma esponja do miR-93-5p, um oncomiR (LI *et al.*, 2020). Por fim, Xia e colaboradores descreveram o eixo de regulação BAP1-ASXL1-FOXK1/2 em células de leucemia, no qual FOXK2 induz a expressão de diferentes genes supressores tumorais, particularmente aqueles que regulam de forma negativa o metabolismo de glicose e as vias de sinalização de HIF-1 $\alpha$  e JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) (XIA *et al.*, 2020). Em conjunto, esses achados sugerem, portanto, que FOXK2 possui um papel tumor-específico (**Figura 1.3**).





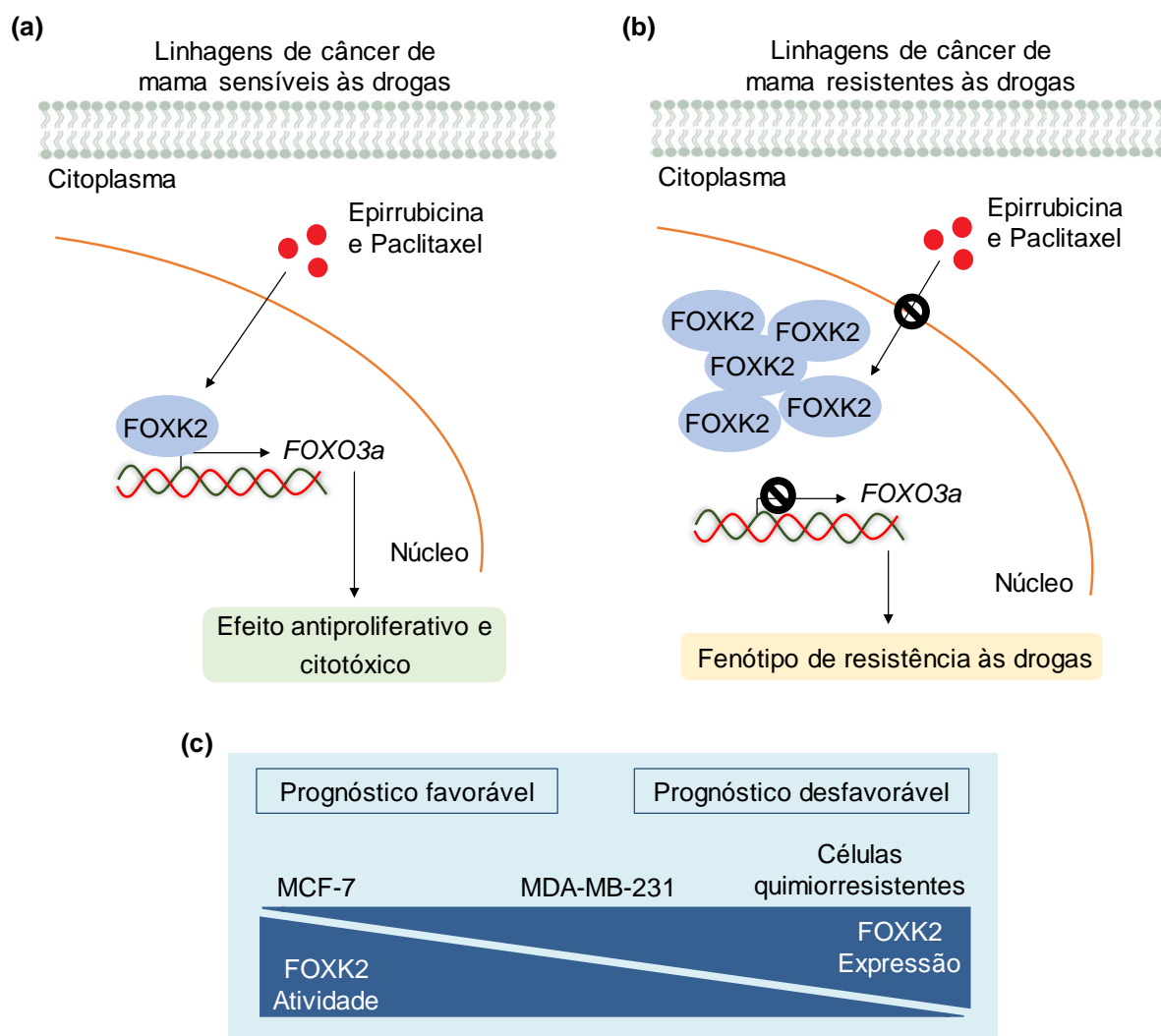
**Figura 1.3 – Função de FOXX2 como supressor de tumor ou oncogene, de forma dependente do tipo de câncer.**

### 1.2.3. FOXX2 no câncer de mama

Crescentes evidências sugerem um papel supressor tumoral para FOXX2 no contexto do câncer de mama. Inicialmente, foi demonstrado que FOXX2 suprime a proliferação de células de câncer de mama ao interagir com o ER $\alpha$  (receptor de estrogênio  $\alpha$ ), um importante regulador do desenvolvimento desses tumores (LIU *et al.*, 2015). FOXX2 atua como uma proteína adaptadora entre o ER $\alpha$  e o complexo ubiquitina E3 ligase BRCA1/BARD1 (proteína 1 do domínio RING associada ao BRCA1), reduzindo a estabilidade do ER $\alpha$  ao favorecer a sua degradação via proteassoma dependente de ubiquitina (LIU *et al.*, 2015). A interação FOXX2-ER $\alpha$  diminui a atividade transcricional do ER $\alpha$ , reduzindo a proliferação das células, através da inibição da progressão no ciclo celular (LIU *et al.*, 2015). Corroborando esses dados, foi demonstrado que a inibição de FOXX2 aumenta a proliferação celular e induz EMT, através do aumento de marcadores mesenquimais, como N-caderina e fibronectina, e diminuição de marcadores epiteliais, como  $\gamma$ -catenina e E-caderina, assim como aumenta o potencial migratório e invasivo de células de câncer de mama (SHAN *et al.*, 2016). O indício mais importante do papel supressor tumoral de FOXX2 no câncer de mama veio de experimentos *in vivo*, onde tumores estabelecidos a partir da inoculação de células triplo negativas MDA-MB-231 deletadas para *FOXX2* em camundongos imunodeficientes exibiram maior taxa de crescimento e metástases (SHAN *et al.*, 2016). Nesse estudo, foi demonstrado que FOXX2 interage, através de seu domínio FHA, com múltiplos complexos co-repressores com função de histona desacetilase, incluindo o correpressor do receptor nuclear/mediador silenciador do receptor retinóide e do hormônio da tireoide (NCoR)/SMRT, desacetilase de histona

remodeladora de nucleossomos (NuRD), Sin3A e fator de transcrição silenciador RE1 (REST)/CoREST. De acordo com o complexo com que interage, FOXK2 reprime a transcrição de diferentes genes-alvo, como *BIRC5*, *BCAS3*, *CULAB*, *EZH2*, *FOXC2*, *HIF1b*, *CD44*, *VEGF*, *CREBBP*, *HIG2* e *HSP90AA1* (SHAN *et al.*, 2016). Esses achados implicam FOXK2 na supressão da tumorigênese mamária e particularmente na supressão da hipóxia. Vale ressaltar que a via da hipóxia, inicialmente desencadeada em tumores sólidos pela atividade transcricional de fatores induzidos por hipóxia (HIFs), permite a reprogramação das células tumorais, através da regulação de genes envolvidos no metabolismo de glicose, sobrevivência, proliferação, angiogênese, invasão e metástase (GILKES *et al.*, 2014; SHAN *et al.*, 2016).

Ainda em células de câncer de mama, o nosso grupo demonstrou que FOXK2 pode mediar os efeitos antitumorais dos quimioterápicos (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018). Primeiramente, encontramos FOXK2 diferencialmente expressa, no nível proteico, em modelos celulares de câncer de mama com diferentes perfis de sensibilidade às drogas, sendo menos expressa na linhagem sensível (MCF-7) e mais expressa nas linhagens resistentes ao paclitaxel e à epirrubicina. Em contrapartida, nas células sensíveis, o tratamento com os quimioterápicos induz os níveis proteicos de FOXK2, enquanto nos modelos celulares quimiorresistentes, o conteúdo proteico desse fator de transcrição permanece inalterado. Na linhagem sensível, a inibição de FOXK2 promove resistência aos quimioterápicos, enquanto a indução da superexpressão dessa proteína aumenta a sensibilidade às drogas. Nesse contexto, FOXK2 modula a sensibilidade ao tratamento através da indução transcricional de *FOXO3a*, um fator de transcrição supressor tumoral (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015). Por outro lado, nas linhagens quimiorresistentes, o perfil de resposta ao tratamento não é alterado mediante inibição ou superexpressão de FOXK2 e, nesse cenário, FOXK2 falha em ser recrutada à região promotora de *FOXO3a* e induzir sua expressão (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015). Esses dados sugerem que a expressão e função de FOXK2 são desreguladas em células de câncer de mama resistentes aos quimioterápicos (**Figura 1.4a** e **Figura 1.4b**). Transpondo para amostras de pacientes e corroborando os dados *in vitro*, a maior expressão de FOXK2 foi associada com pior sobrevida global e específica da doença (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015), sugerindo que níveis constitutivamente elevados de FOXK2 estão associados com resistência aos quimioterápicos e pior prognóstico (**Figura 1.4c**). Em conjunto, essas evidências suportam um papel supressor tumoral para FOXK2 no câncer de mama e, de forma notável, FOXK1 também foi implicado na supressão da tumorigênese nesse modelo, inibindo angiogênese e metástase (SUN *et al.*, 2016), o que sugere que a função de supressão tumoral pode ser conservada na subfamília FOXK.

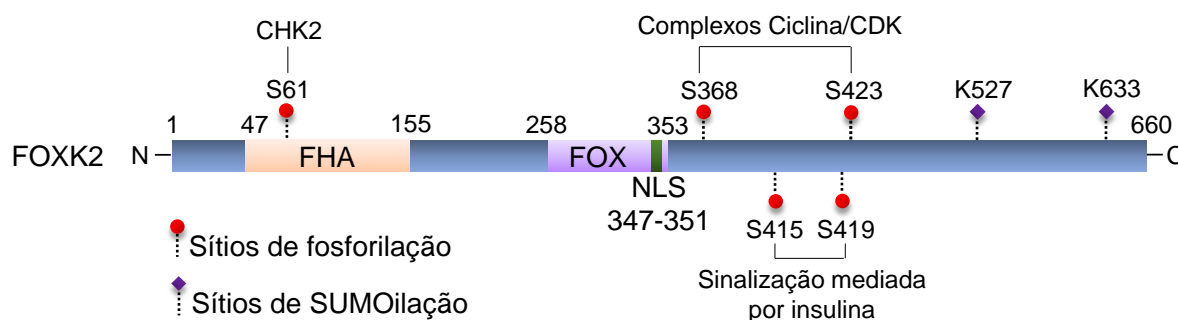


**Figura 1.4 – Papel de FOXK2 na sensibilidade aos quimioterápicos em câncer de mama.** (a) Em linhagens de câncer de mama sensíveis às drogas, a exposição aos quimioterápicos induz os níveis proteicos de FOXK2, que modula a sensibilidade ao tratamento através da indução transcricional do supressor tumoral *FOXO3a*. (b) Já nas linhagens quimiorresistentes, o conteúdo proteico de FOXK2 não é modulado mediante o tratamento e esse fator de transcrição falha em ser recrutado à região promotora de *FOXO3a*, acumulando-se em altos níveis no núcleo dessas células. (c) A linhagem sensível às drogas (MCF-7) possui menores níveis proteicos de FOXK2, porém esse fator de transcrição se encontra ativo transcionalmente. Os baixos níveis de FOXK2 também estão associados com um prognóstico favorável em pacientes com câncer de mama. Por outro lado, as linhagens resistentes ao paclitaxel e à epirrubicina possuem níveis proteicos constitutivamente elevados de FOXK2, contribuindo para o fenótipo de quimiorresistência. Níveis elevados de FOXK2 também foram encontrados em pacientes com câncer de mama com pior prognóstico. A linhagem triplo negativa MDA-MB-231 apresenta um fenótipo intermediário com relação aos níveis proteicos e à atividade de FOXK2, assim como um perfil moderado a alto de resistência aos quimioterápicos. FOXK2 e FOXO3a: membros da família *forkhead box*.

#### 1.2.4. Modificações pós-traducionais em FOXK2

A dinâmica de expressão e função de FOXK2 é influenciada por modificações pós-traducionais (PTMs) enquanto importante mecanismo de regulação (Figura 1.5). Uma das primeiras descrições de PTMs em FOXK2 foi a descoberta de que esse fator de transcrição é

fosforilado por complexos ciclina-CDK (quinase dependente de ciclina) em células de osteosarcoma (MARAIS *et al.*, 2010). Nesse estudo, foi demonstrado que FOXK2 é fosforilada em dois sítios principais, as serinas 368 e 423, principalmente, através do complexo CDK1-ciclina B. FOXK2 é hiperfosforilada durante a mitose, tornando-se menos estável e menos ativa transcricionalmente (MARAIS *et al.*, 2010).



**Figura 1.5 – Modificações pós-traducionais em FOXK2.** FOXK2 é alvo de SUMOilação e fosforilações mediadas por complexos Ciclina/CDKs (quinases dependentes de ciclinas), CHK2 (*checkpoint kinase 2*) e sinalização de insulina. Os sítios alvo de modificações pós-traducionais estão indicados acima do esquema. FHA: *Forkhead-associated domain*; FOX: *Forkhead box*; NLS: sinal de localização nuclear. Adaptado de NESTAL DE MORAES *et al.*, 2019.

Contrariamente à regulação negativa mediada por fosforilação, nosso grupo demonstrou que a atividade transcricional de FOXK2 é regulada de maneira positiva por SUMOilação em células de câncer de mama (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018). Nesse modelo, FOXK2 pode ser SUMOilada em dois motivos consenso em sua região C-terminal, as lisinas 527 e 633. Notavelmente, a forma mutante de FOXK2 para os sítios de conjugação de SUMO é ineficiente em se ligar ao promotor de *FOXO3a* e sensibilizar as células de câncer de mama aos quimioterápicos (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018), sugerindo que essa PTM é crucial para a atividade de FOXK2 na quimiossensibilização. Por outro lado, a superexpressão de FOXK2 mutante para os sítios de SUMOilação não afeta a resposta ao tratamento nas células quimiorresistentes, onde as formas selvagem e mutante de FOXK2 não são recrutadas ao promotor de *FOXO3a* (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018), indicando que a SUMOilação pode não regular a atividade de FOXK2 nessas células. Mais recentemente, foi descrito que FOXK2 é fosforilada na serina 61 por CHK2 (*checkpoint kinase 2*) em células humanas, incluindo células de câncer de pulmão e fígado (CHEN *et al.*, 2020). Em resposta ao dano no DNA, a via ATM (ataxia-telangiectasia mutada)-CHK2 é ativada e a fosforilação de FOXK2 induz a sua translocação para o citoplasma e promove a sua interação com a proteína 14-3-3, liberando a transcrição de genes associados à autofagia (ATGs) e desencadeando o processo autofágico (CHEN *et al.*, 2020). De forma importante, a desregulação do eixo CHK2-FOXK

potencializa a autofagia e contribui para a quimiorresistência (CHEN *et al.*, 2020). Já em uma análise fosfoproteômica global, foram identificados sítios de fosforilação em FOXK1/2 modulados mediante a sinalização de insulina (SAKAGUCHI *et al.*, 2019). As serinas 415 e 419 em FOXK2 mostraram-se hipofosforiladas após o estímulo com insulina e, nesses sítios, foram identificados motivos consenso para GSK3, quinase que fosforila e retém os fatores FOXK no citoplasma em condições basais (SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Dessa forma, após o estímulo de insulina, a via de AKT-mTOR é ativada e a atividade de GSK3 diminui, reduzindo a fosforilação de FOXK1/2 e promovendo a translocação desses fatores para o núcleo, embora esse efeito tenha sido mais pronunciado para FOXK1 (SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Apesar de alguns estudos terem identificado sítios de fosforilação em FOXK1, regulados por mTOR (serinas 225, 229, 427 e 431; treonina 231) e GSK3 (serinas 402, 406, 427 e 431) (BOWMAN *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018), faltam experimentos para comprovar que FOXK2 pode ser regulada de maneira similar. Em suma, esses achados demonstram que FOXK2 pode ser regulada por PTMs, tanto de forma positiva como negativa, tendo sua função, estabilidade e localização subcelular finamente controladas através desses mecanismos.

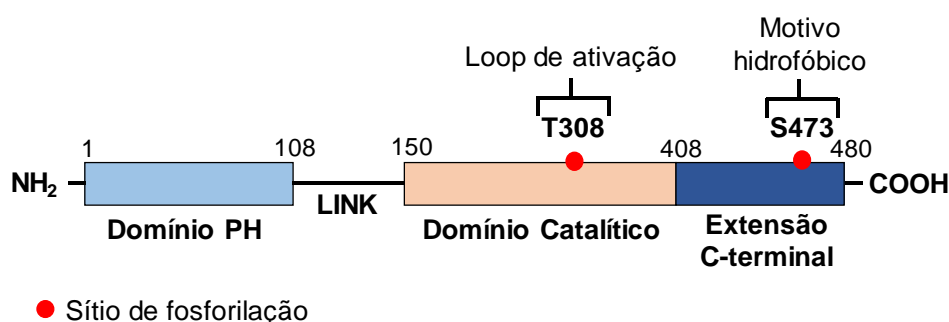
Diante do exposto, questionamos se FOXK2 estaria sofrendo alguma PTM que a tornasse inativa em células quimiorresistentes e nos tumores mais agressivos de câncer de mama. Assim, buscamos possíveis sítios de regulação por quinases na sequência proteica de FOXK2, utilizando o software de predição iGPS (SONG *et al.*, 2012). Através dessa análise *in silico*, encontramos a serina-treonina quinase AKT (isoforma 1) como a principal possível reguladora de FOXK2 (**Anexo 8.1**). Esse ensaio de predição identificou a treonina 55 (T55) de FOXK2 como provável resíduo de fosforilação por AKT1, com o maior *score* em relação às outras quinases encontradas na análise. Além da T55, vários outros resíduos de fosforilação mediada por AKT1 foram identificados na sequência de FOXK2, incluindo os sítios: serina 373, treonina 142, serina 248, treonina 634 e serina 398 (**Anexo 8.2**).

### 1.3. AKT (Proteína quinase B)

#### 1.3.1. Estrutura e ativação de AKT

AKT ou proteína quinase B (PKB) é uma serina-treonina quinase, membro do grupo de proteínas quinases AGC, composta por três domínios (**Figura 1.6**): i) o domínio de homologia à plectrina (PH) N-terminal, essencial para a interação com resíduos lipídicos, como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3); ii) o domínio catalítico, que contém um loop de ativação por fosforilação na treonina 308 (T308); iii) o domínio regulatório C-terminal,

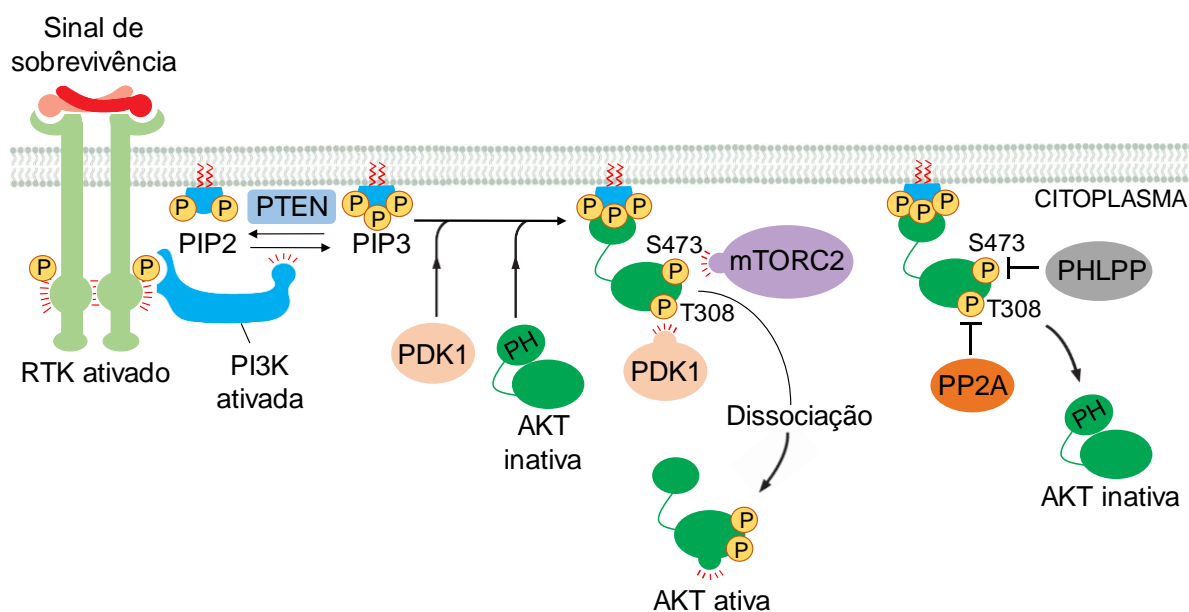
contendo um motivo hidrofóbico que inclui o resíduo de serina 473 (S473), cuja fosforilação também está implicada na sua ativação (KUMAR & MADISON, 2005; CALLEJA *et al.*, 2009; PÉREZ-TENORIO *et al.*, 2014).



**Figura 1.6 – Estrutura de AKT.** AKT é uma serina-treonina quinase que possui três domínios: (i) o domínio de homologia à plestrina (PH) N-terminal, que medeia a interação com resíduos lipídicos, como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3); (ii) o domínio catalítico, separado do domínio PH pela região de conexão LINK, que contém um loop de ativação por fosforilação na treonina 308 (T308), importante para a atividade de AKT; (iii) o domínio regulatório C-terminal, contendo um motivo hidrofóbico que inclui o resíduo de serina 473 (S473), cuja fosforilação permite máxima atividade de AKT. Adaptado de KUMAR & MADISON, 2005.

AKT é um dos principais alvos ativados pela fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e seu processo de ativação envolve sua translocação para a membrana plasmática e fosforilação. As PI3Ks constituem uma família de enzimas lipídicas que, quando ativadas, catalisam a fosforilação na posição 3 do anel inositol em um lipídio denominado fosfatidilinositol, gerando uma variedade de fosfoinosítídeos na membrana plasmática (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010). Esses resíduos são importantes para a sinalização intracelular, pois coordenam a localização e função de diferentes proteínas efetoras, que são recrutadas para a membrana e interagem com esses fosfoinosítídeos através de domínios específicos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; BOURNE *et al.*, 2015). Em adição, a PI3K engloba diferentes isoformas que podem ser divididas em três classes, de acordo com suas características estruturais e preferências de substrato lipídico. A classe I é a mais amplamente estudada e pode ser ativada por receptores tirosina quinase (RTKs) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010). Para simplificar, focaremos na ativação da PI3K através dos RTKs, que podem ser ativados por diferentes fatores de crescimento, citocinas e hormônios. De forma geral, após a interação com os ligantes, através de seus domínios extracelulares, os RTKs sofrem dimerização, aproximando os domínios quinase citosólicos, e se trans-autofosforilam, o que promove a completa ativação dos domínios quinase e gera sítios de ancoragem para proteínas intracelulares, estabelecendo uma complexa rede de sinalização (BOURNE *et al.*, 2015). Uma das proteínas que se liga aos resíduos de fosfotirosina no domínio

intracelular dos RTKs ou em moléculas adaptadoras *downstream* é a PI3K, através do domínio SH2 em sua subunidade regulatória (p85). Essa interação libera a subunidade catalítica (p110) e, com isso, a PI3K fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que atua como sítio de ancoragem para AKT (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; BOURNE *et al.*, 2015). Normalmente, AKT encontra-se em um estado inativo nas células, através da interação intramolecular entre o domínio PH e o domínio quinase. Entretanto, ao ser recrutada para a membrana e interagir com os resíduos PIP3, através do seu domínio PH, AKT muda de conformação e expõe seus sítios de fosforilação (MANNING & TOKER, 2017). A proteína quinase dependente de fosfoinosítideo-1 (PDK1), co-recrutada para a membrana pelos resíduos fosforilados de PIP3, acessa o loop de ativação de AKT e fosforila a treonina 308 (T308). O complexo mTOR 2 (mTORC2), por sua vez, fosforila a serina 473 (S473), tornando AKT completamente ativa (MANNING & TOKER, 2017) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7 – Regulação de AKT dependente da PI3K.** Os receptores tirosina quinase (RTKs) são ativados pela ligação de sinais de sobrevivência aos seus domínios extracelulares. A fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) se liga aos receptores ativados e fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). AKT, que normalmente encontra-se em um estado inativo, através da interação entre o domínio de homologia (PH) e o domínio quinase, é recrutada para a membrana e interage com PIP3, por meio do seu domínio PH. Assim, AKT muda de conformação e é fosforilada na treonina 308 (T308) pela quinase dependente de fosfoinosítideo 1 (PDK1), co-recrutada para a membrana pelos resíduos de PIP3, e na serina 473 (S473) pelo complexo mTOR 2 (mTORC2). AKT ativa dissocia-se da membrana e fosforila diversos substratos. A fosfatase homóloga à tensina (PTEN) desfosforila PIP3 em PIP2 e a proteína fosfatase 2 (PP2A) e a fosfatase PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) desfosforilam AKT na T308 e na S473, respectivamente, regulando de forma negativa a via PI3K/AKT. Adaptado de BOURNE *et al.*, 2015; MANNING & TOKER, 2017.

Uma vez ativada, AKT pode fosforilar diversas proteínas-alvo na membrana celular, no citoplasma e no núcleo (BOURNE *et al.*, 2015). Notavelmente, estudos também descrevem

mecanismos de ativação de AKT independentes da PI3K, envolvendo PTMs, como fosforilação, acetilação, SUMOilação e glicosilação por diferentes enzimas (CHAN *et al.*, 2014; RISSO *et al.*, 2015). No que diz respeito aos mecanismos de inativação, a via da PI3K/AKT é diretamente antagonizada pela fosfatase homóloga à tensina (PTEN), que desfosforila a posição 3 do anel inositol, convertendo PIP3 em PIP2 (AOKI & FUJISHITA, 2017). Além disso, a proteína fosfatase 2 (PP2A) e a fosfatase *PH domain leucine-rich repeat phosphatase* (PHLPP) desfosforilam AKT na T308 e S473, respectivamente, resultando também em uma regulação negativa de AKT (MANNING & TOKER, 2017) (**Figura 1.7**).

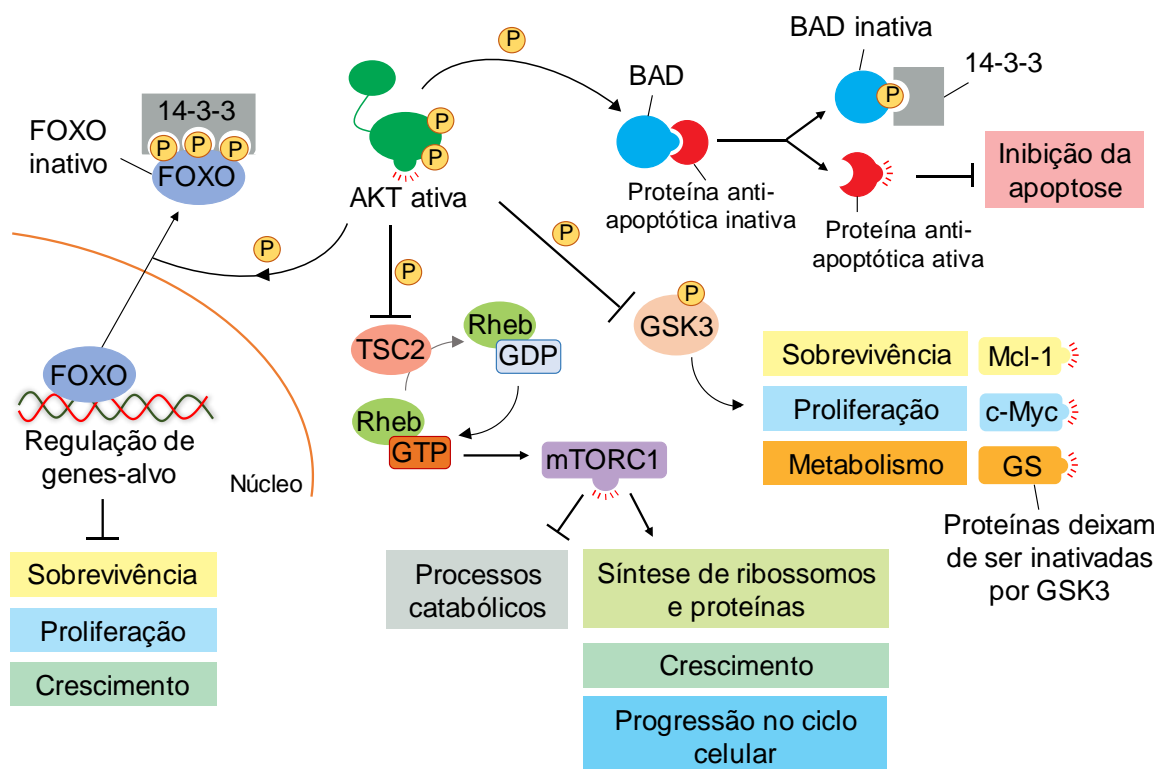
### 1.3.2. Alvos de fosforilação por AKT

Uma vez ativada, AKT pode fosforilar inúmeros alvos celulares, o que inclui mais de cem substratos. AKT fosforila seus alvos em resíduos de serina/treonina incluídos em um motivo consenso de R-X-R-X-X-S/T- $\phi$ , no qual X é qualquer aminoácido e  $\phi$  representa uma preferência por grandes resíduos hidrofóbicos (MANNING & TOKER, 2017). De acordo com o contexto celular, AKT pode fosforilar substratos pertencentes a diversas classes funcionais, como fatores de transcrição, proteínas e lipídio quinases, enzimas metabólicas, reguladores do ciclo celular, entre outros (MANNING & TOKER, 2017), demonstrando o seu amplo espectro de atuação. Diante dessa diversidade de substratos, fica claro que AKT é responsável pela regulação de diversas vias celulares e a sua ativação está predominantemente associada com a indução de proliferação, crescimento, sobrevivência e alterações metabólicas (HERS *et al.*, 2011; MANNING & TOKER, 2017). Vale ressaltar que a fosforilação por AKT pode ativar ou inibir a atividade dos substratos, alterar suas localizações subcelulares, regular a interação deles com outras proteínas, assim como protegê-los da degradação ou enviá-los para degradação (HERS *et al.*, 2011).

Estabelecido o complexo panorama da sinalização de AKT, podemos destacar algumas proteínas-alvo bem estabelecidas, que são moléculas-chave em diferentes vias de regulação. AKT exerce uma fosforilação inibitória na região N-terminal da GSK3 $\alpha$ /GSK3 $\beta$  (glicogênio sintase quinase 3  $\alpha$  e  $\beta$ ). GSK3 regula uma ampla gama de substratos envolvidos em diferentes vias de sinalização, incluindo proteínas implicadas na sobrevivência e proliferação celular (MANNING & TOKER, 2017). Por exemplo, GSK3 fosforila e envia para degradação a proteína anti-apoptótica Mcl-1 (MOREL *et al.*, 2009) e o fator de transcrição c-Myc (GREGORY *et al.*, 2003). Com isso, a inibição de GSK3 mediada por AKT pode estabilizar esses alvos, favorecendo a sobrevivência, o crescimento e a proliferação das células (HOXHAJ & MANNING, 2020). GSK3 também está implicada no metabolismo de glicose, como, por



exemplo, através da regulação negativa da proteína glicogênio sintase, levando à redução da síntese de glicogênio. Dessa forma, a ativação de AKT impacta o metabolismo celular, estabilizando a glicogênio sintase e favorecendo a glicogênese (MANNING & TOKER, 2017) (Figura 1.8).



**Figura 1.8 – Exemplos de efetores da sinalização de AKT.** AKT fosforila e inibe a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), que regula diferentes substratos, como a proteína anti-apoptótica Mcl-1, o fator de transcrição c-Myc e a glicogênio sintase (GS). AKT inibe os fatores de transcrição FOXO, criando sítios de interação com proteínas 14-3-3, o que facilita a exportação nuclear e a retenção desses fatores no citosol. AKT também inibe proteínas pró-apoptóticas, como a proteína Bad, que quando fosforilada se liga à 14-3-3, liberando as proteínas anti-apoptóticas. AKT regula de forma positiva o complexo mTOR 1 (mTORC1), por meio da fosforilação e inibição da proteína TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), que atua como ativadora de GTPase (GAP) em uma GTPase chamada Rheb. A inativação de TSC2 permite que a Rheb se acumule em sua forma ativa (Rheb-GTP) e ative mTORC1. Os efeitos biológicos de cada um desses eixos de regulação estão ilustrados na figura. Adaptado de BOURNE *et al.*, 2015; MANNING & TOKER, 2017.

Além disso, AKT fosforila e inibe os fatores de transcrição da família FOXO (MANNING & TOKER, 2017), que compreende os fatores FOXO1, 3, 4 e 6, envolvidos na indução de apoptose e arresto no ciclo celular, regulando negativamente o crescimento, a sobrevivência e a proliferação das células (LAM *et al.*, 2013; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2016). Mecanicamente, AKT fosforila três resíduos conservados nos fatores FOXO, criando sítios de reconhecimento por proteínas 14-3-3, que facilitam a exportação nuclear (FARHAN *et al.*, 2017; MANNING & TOKER, 2017) e a identificação por ubiquitina E3 ligases e degradação via proteassoma (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2016). Notavelmente, AKT

também pode promover a sobrevivência celular através da fosforilação e inibição de proteínas pró-apoptóticas, como a proteína Bad. Quando não está fosforilada, a proteína Bad se associa a uma ou mais proteínas inibidoras da apoptose, mantendo-as em um estado inativo. Entretanto, uma vez fosforilada por AKT, a Bad se liga à proteína citosólica 14-3-3 e libera as proteínas anti-apoptóticas, que atuam a favor da sobrevivência celular (BOURNE *et al.*, 2015). Por fim, é notório que AKT também promove o crescimento celular através da regulação positiva do complexo mTOR 1 (mTORC1), indiretamente por meio da fosforilação e inibição da proteína TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), que atua como ativadora de GTPase (GAP) em uma GTPase denominada Rheb. A inativação de TSC2 permite que a Rheb se acumule em sua forma ativa (Rheb-GTP) e ative mTORC1 (BOURNE *et al.*, 2015; HOXHAI & MANNING, 2020). Embora alguns estudos indiquem que a inibição de TSC2 tem efeito predominante na ativação de mTOR (MANNING & TOKER, 2017), AKT também fosforila e inibe a proteína chamada substrato de AKT rico em prolina (PRAS40), atenuando sua ação inibitória sobre mTORC1 (HERS *et al.*, 2011; AOKI & FUJISHITA, 2017). Logo, a sinalização de AKT pode aliviar a inibição mediada por TSC2 e PRAS40, levando à ativação de mTORC1, que, por sua vez, favorece a biogênese de ribossomos e progressão no ciclo celular, assim como promove uma variedade de processos anabólicos, como síntese de proteínas e lipídios, enquanto inibe programas catabólicos (MANNING & TOKER, 2017; HOXHAI & MANNING, 2020).

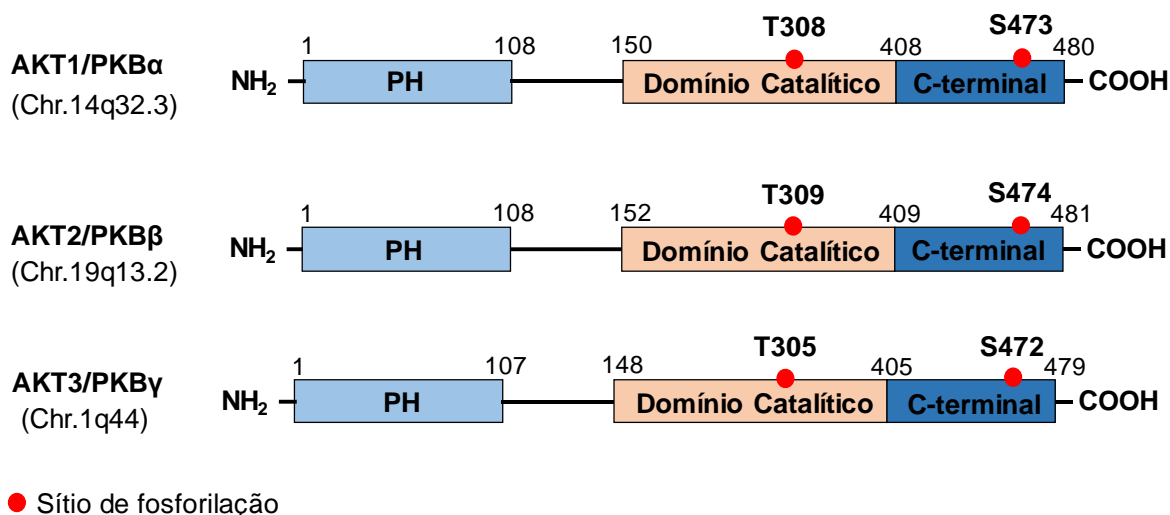
Tendo em vista o envolvimento de AKT com diversos eixos de sinalização celular, a desregulação dessa proteína está implicada em uma variedade de doenças humanas, incluindo distúrbios cardiovasculares, diabetes, doenças degenerativas e câncer (HERS *et al.*, 2011; ABEYRATHNA & SU, 2015), sendo a hiperativação da via PI3K/AKT uma das alterações mais comuns em diversos cânceres humanos (NOOROLYAI *et al.*, 2019). No câncer de mama, alterações que levam à hiperativação da via PI3K/AKT são frequentes e diferentes mecanismos podem contribuir para a desregulação desse eixo de sinalização. Dentre eles, destaca-se: (i) amplificação e/ou mutações ativadoras em RTKs, como o INSR (receptor de insulina), e, nesse sentido, ressalta-se também a amplificação ou superexpressão de HER2, que está presente em cerca de 20 % dos tumores de mama, estabelecendo um subtipo clinicamente relevante (MILLER *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2016); (ii) mutações ativadoras no gene que codifica a subunidade catalítica p110 $\alpha$  da PI3K (*PIK3CA*), que embora sejam mais comuns nos tumores luminais A, estão presentes em cerca de 8 a 45 % das amostras de câncer de mama, dependendo do subtipo molecular (MILLER *et al.*, 2011; GUERRERO-ZOTANO *et al.*, 2016; ARAKI & MIYOSHI, 2018); (iii) redução da expressão ou mutações que levem à perda de função em PTEN, o que ocorre em 67 % dos tumores de mama triplo negativos (MILLER *et al.*, 2011). Essas alterações contribuem para a ativação de AKT, presente em 20-55 % dos tumores de

mama (NOOROLYAI *et al.*, 2019), mesmo que ampliações e/ou mutações ativadoras diretamente em *AKT* sejam menos frequentes (MILLER *et al.*, 2011; GUERRERO-ZOTANO *et al.*, 2016; NOOROLYAI *et al.*, 2019).

Independente do mecanismo, a desregulação da via PI3K/AKT está implicada na transformação de células mamárias, promovendo alterações biológicas clássicas de células tumorais, como sobrevivência e proliferação independentes de ancoragem e de fator de crescimento (ISAKOFF *et al.*, 2005). Também foi descrito que a ativação constitutiva da PI3K favorece a formação de lesões pré-neoplásicas nas glândulas mamárias em modelo animal (RENNER *et al.*, 2008), demonstrando que a desregulação da via PI3K/AKT pode estar associada com a iniciação do câncer de mama. Em adição, a hiperativação de AKT confere resistência aos quimioterápicos e a outras terapias utilizadas no tratamento do câncer de mama (MILLER *et al.*, 2011; MIAO *et al.*, 2017; ARAKI & MIYOSHI, 2018; FUJIMOTO *et al.*, 2020). Logo, a via PI3K/AKT é um importante alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

### 1.3.3. Isoformas de AKT: estrutura, expressão e função no câncer de mama

AKT compreende três isoformas, AKT1, AKT2 e AKT3, codificadas por genes distintos e localizados em diferentes cromossomos (**Figura 1.9**).



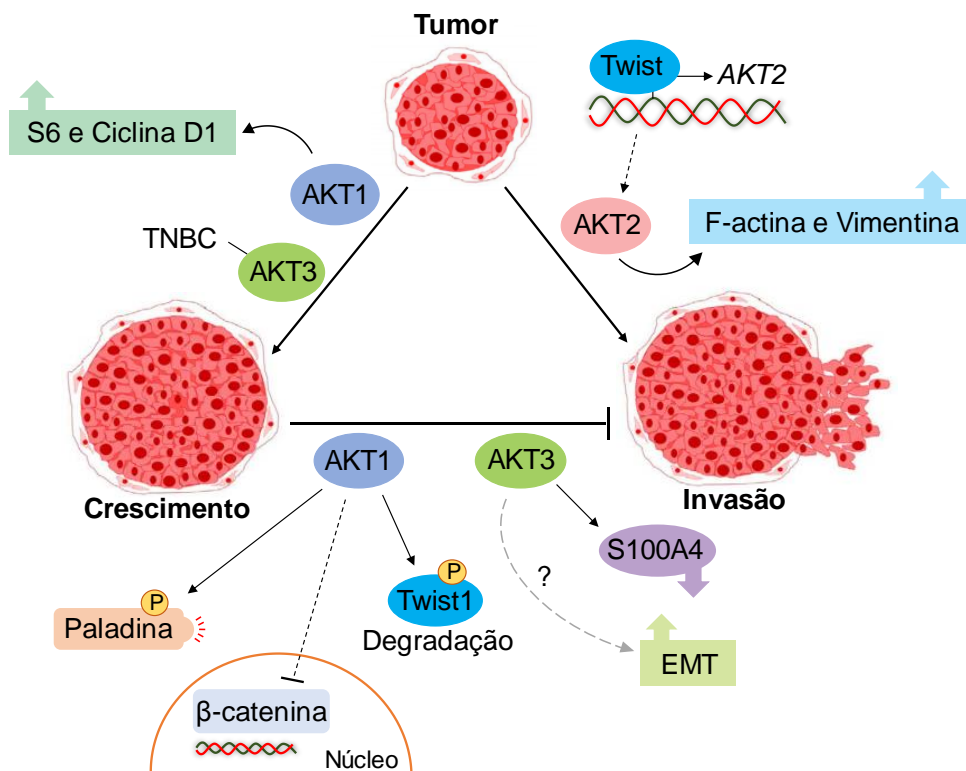
**Figura 1.9 – Esquema ilustrativo da estrutura das isoformas de AKT.** AKT1/2/3 possuem três domínios estruturais: o domínio de homologia à plecstrina (PH) N-terminal; o domínio catalítico com um loop de ativação por fosforilação na treonina 308 (T308) para AKT1, treonina 309 (T309) para AKT2 e treonina 305 (T305) para AKT3; o domínio C-terminal, que contém o segundo sítio de ativação por fosforilação na serina 473 (S473) para AKT1, serina 474 (S474) para AKT2 e serina 472 (S472) para AKT3. Tais isoformas são codificadas por genes distintos e localizados em diferentes cromossomos (indicados na figura). Adaptado de PÉREZ-TENORIO *et al.*, 2014; HINZ & JUCKER, 2019.

Essas isoformas possuem características estruturais comuns, contendo os três domínios citados acima e compartilhando cerca de 80 % de similaridade na sequência de aminoácidos (PÉREZ-TENORIO *et al.*, 2014; HINZ & JUCKER, 2019). Os domínios PH e catalítico são os mais conservados entre as isoformas com cerca de 76 a 80 % e 87 a 90 % de similaridade, respectivamente, enquanto a região de conexão LINK é a mais fracamente conservada entre elas com 17 a 46 % de similaridade (KUMAR & MADISON, 2005). Embora essas isoformas apresentem particularidades estruturais, os sítios de fosforilação são similares (**Figura 1.9**) (HINZ & JUCKER, 2019). Em contextos fisiológicos, AKT1 e AKT2 são amplamente expressas, embora AKT2 seja predominante em células responsivas à insulina, enquanto a expressão de AKT3 é mais restrita, sendo encontrada principalmente nos testículos e no cérebro (HERS *et al.*, 2011; HINZ & JUCKER, 2019). As isoformas de AKT possuem funções célula-ou tecido-específicas e desempenham papéis distintos e até mesmo opostos no contexto fisiológico e no câncer (HINZ & JUCKER, 2019).

Embora o papel oncogênico da hiperativação de AKT esteja bem estabelecido na literatura, suas isoformas podem desempenhar funções distintas na iniciação e progressão do câncer de mama (**Figura 1.10**). Riggio e colaboradores demonstraram que AKT1 promove proliferação celular possivelmente através da regulação positiva de S6 e Ciclina D1 (RIGGIO *et al.*, 2017). Corroborando esses dados, estudos apontaram que AKT1 acelera a formação e induz o crescimento de tumores de mama em modelos *in vivo* (MAROULAKOU *et al.*, 2007; DILLON *et al.*, 2009; RIGGIO *et al.*, 2017; TOULANY *et al.*, 2017). Em tumores inibidos para AKT1, foi descrita uma redução da proliferação, acompanhada por menores níveis de Ciclina D1, e maiores taxas de apoptose (MAROULAKOU *et al.*, 2007), sugerindo que AKT1 promove o crescimento tumoral ao favorecer a sobrevivência e proliferação celular. Em contrapartida, AKT1 inibe migração, invasão e metástases (DILLON *et al.*, 2009; CHIN *et al.*, 2014; RIGGIO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018), através de diferentes eixos de regulação, incluindo: (i) redução do acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina ao diminuir a sinalização de EGFR (LI *et al.*, 2018); (ii) fosforilação e degradação de Twist1, um repressor transcricional que contribui para a metástase no câncer de mama (LI *et al.*, 2016); (iii) fosforilação e ativação da Paladina, substrato específico de AKT1 que organiza os filamentos de actina, reduzindo a capacidade migratória das células (CHIN & TOKER, 2010). Logo, AKT1 está associada com o crescimento local do tumor e diminuição do potencial metastático no câncer de mama (**Figura 1.10**).

Ao contrário de AKT1, a inibição de AKT2 acelera o desenvolvimento tumoral em modelos murinos de tumorigênese mamária, assim como aumenta a taxa de crescimento desses tumores, associada com um maior número de células positivas para Ciclina D1 (MAROULAKOU *et al.*, 2007), o que sugere que AKT2 pode prevenir o crescimento local do

tumor. Embora Riggio e colaboradores não tenham observado um efeito claro de AKT2 na proliferação celular, os autores demonstraram que essa isoforma induz migração e invasão, associada com um aumento dos níveis de F-actina e Vimentina, e promove metástases (RIGGIO *et al.*, 2017) (**Figura 1.10**). Outros estudos confirmaram esse papel pró-migratório de AKT2 em ensaios *in vitro* e *in vivo* (DILLON *et al.*, 2009; LEAL-ORTA *et al.*, 2019; MARCIAL-MEDINA *et al.*, 2019). De forma interessante, enquanto Twist é inibido por AKT1, esse fator ativa a transcrição de AKT2, induzindo migração, invasão e resistência ao paclitaxel em células de câncer de mama (CHENG *et al.*, 2007). Além de promover a disseminação tumoral, AKT2 pode favorecer a ativação de AKT total e a sobrevivência celular sob condições de hipóxia ao induzir a expressão do miR-21, que suprime os níveis de PTEN (POLYTARCHOU *et al.*, 2011), sugerindo uma função de AKT2 na adaptação à hipóxia em tumores de mama.



**Figura 1.10 – Diferentes funções das isoformas de AKT na iniciação e progressão do câncer de mama.** AKT1 promove o crescimento tumoral, associada com uma regulação positiva de S6 e Ciclina D1, enquanto inibe o potencial invasivo, através da regulação de diferentes proteínas-alvo: (i) redução do acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina ao diminuir a sinalização de EGFR; (ii) fosforilação e degradação de Twist1, um fator transcricional pró-metastático no câncer de mama; (iii) fosforilação e ativação da Paladina, que organiza os filamentos de actina, reduzindo a capacidade celular migratória. Enquanto Twist é inibido por AKT1, esse fator ativa a transcrição de AKT2, que promove migração e invasão, associada com um aumento dos níveis de F-actina e Vimentina. AKT3, comumente amplificada e superexpressa em tumores de mama triplo negativos (TNBC), estimula o crescimento tumoral, mas reduz o potencial invasivo, através da regulação negativa da proteína pró-migratória S100A4. AKT3 também foi associada a um fenótipo de transição epitélio-mesênquima (EMT), destacando que essa isoforma deve ser mais explorada.

Embora as funções biológicas de AKT3 sejam menos exploradas na literatura, essa isoforma é preferencialmente amplificada e superexpressa em tumores de mama triplo negativos (CHIN *et al.*, 2014). Nesse cenário, AKT3 promove proliferação celular, capacidade clonogênica e crescimento tumoral (CHIN *et al.*, 2014; TOULANY *et al.*, 2017), envolvendo a regulação negativa de p27 (CHIN *et al.*, 2014). Corroborando esses achados, AKT3 é um alvo direto de microRNAs que reduzem a viabilidade celular (HU *et al.*, 2018b) ou suprimem o crescimento tumoral e a angiogênese (LI *et al.*, 2017). Por outro lado, a inibição de AKT3 aumenta a migração celular (CHUNG *et al.*, 2013; GROTTKE *et al.*, 2016) e o potencial metastático, através da regulação positiva da proteína pró-migratória S100A4 (GROTTKE *et al.*, 2016), sugerindo um papel anti-migratório de AKT3. De forma oposta, Stottrup e colaboradores demonstraram que a regulação positiva de AKT3 está associada com resistência ao inibidor de AKT, MK2206, e um fenótipo de EMT (STOTTRUP *et al.*, 2016) (**Figura 1.10**). Nesse contexto, é razoável destacar que AKT3 possui duas variantes de splicing (BRODBECK *et al.*, 2001) que, embora ainda sejam muito pouco exploradas, podem desempenhar funções distintas em células de câncer de mama (SUYAMA *et al.*, 2018) e, portanto, podem estar contribuindo para esses achados conflitantes. Por fim, AKT3 também foi implicada na resistência ao inibidor de AKT GSK690693 (CHIN *et al.*, 2014), assim como, em conjunto com AKT1, na resistência à radiação ionizante (TOULANY *et al.*, 2017).

#### **1.3.4. Estratégias terapêuticas para a via PI3K/AKT**

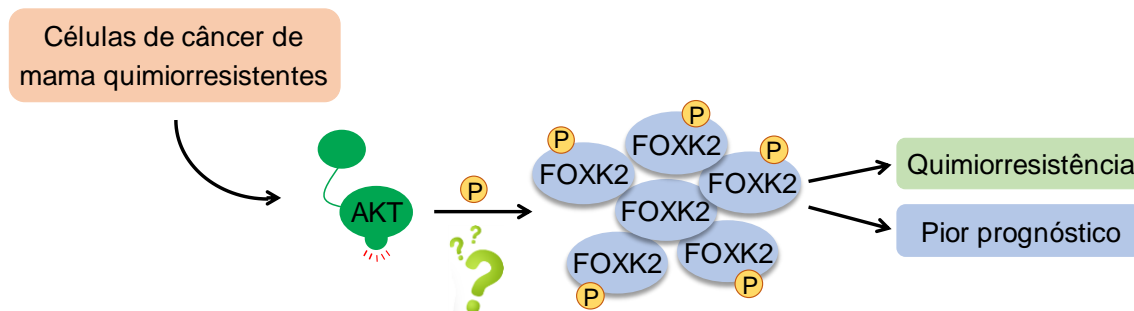
Tendo em vista o papel da via PI3K/AKT na patogênese e na resistência a drogas no câncer de mama, diversas estratégias terapêuticas vêm sendo desenhadas para bloquear a cascata de ativação da PI3K, incluindo inibidores pan-PI3K, inibidores de PI3K isoforma-específicos, inibidores de AKT (alostéricos e competitivos pelo sítio de ligação de ATP), inibidores de mTOR, assim como inibidores duais de PI3K/mTOR (ELLIS & MA, 2019; PASCUAL & TURNER, 2019). Considerando os achados pré-clínicos promissores, esses compostos vêm sendo testados em ensaios clínicos de fase I, II e III, geralmente em combinação com outras terapias, envolvendo pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama (ClinicalTrials.gov; ELLIS & MA, 2019; NOOROLYAI *et al.*, 2019; PASCUAL & TURNER, 2019). Embora os efeitos adversos limitem o uso de tais agentes, essas abordagens terapêuticas têm proporcionado benefícios clínicos, especialmente em coortes de pacientes com câncer de mama em estágio avançado ou metastático e com alterações na via PI3K/AKT (ELLIS & MA, 2019; PASCUAL & TURNER, 2019; VERRET *et al.*, 2019). Dentre os compostos sob investigação está o MK-2206 (ClinicalTrials.gov; NOOROLYAI *et al.*, 2019), inibidor

alostérico de AKT, que foi utilizado nesse estudo. Os dados do ensaio clínico I-SPY 2 mostraram que o MK-2206, em combinação com a terapia neoadjuvante padrão, aumenta as taxas de resposta patológica completa (pCR) em pacientes com câncer de mama HR-/HER2+ em estágio II/III (CHIEN *et al.*, 2020). Outros trabalhos vêm explorando moduladores de mTOR e os achados do ensaio BOLERO-2 resultaram na aprovação pelo FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) da combinação de Everolimus, inibidor alostérico de mTOR, e exemestano (inibidor de aromatase) em pacientes com câncer de mama metastático HR+/HER2- resistentes à terapia prévia, visto que o tratamento combinado melhorou de forma significativa a sobrevida livre de progressão (BASELGA *et al.*, 2012). Notavelmente, o Alpelisibe, inibidor seletivo da isoforma  $\alpha$  da subunidade catalítica da PI3K (classe I), foi o primeiro inibidor da PI3K aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático HR+/HER2- com mutação em *PI3KCA*, baseado nos resultados do ensaio clínico SOLAR-1 (ANDRÉ *et al.*, 2019). Os moduladores da via PI3K também estão sendo testados em tumores triplo negativos, nos quais inibidores de AKT, como Ipatasertibe e Capivasertibe, combinados ao paclitaxel, prolongam a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global, particularmente em pacientes com tumores alterados para *PIK3CA/AKT1/PTEN* (KIM *et al.*, 2017; SCHMID *et al.*, 2020). Esses dados indicam o potencial benefício clínico dos moduladores da via de AKT em um subtipo tumoral que está associado a um fenótipo mais agressivo e que carece de tratamento específico e eficaz. Em conjunto, esses achados suportam o desenho de estratégias terapêuticas direcionadas à via de AKT, embasando o racional desse estudo.

### 1.3.5. Justificativa do estudo

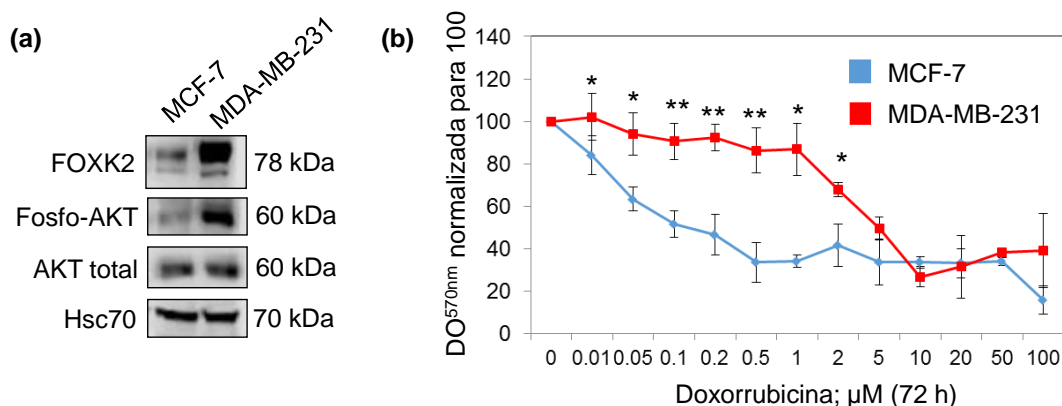
Apesar dos significativos avanços no diagnóstico e no tratamento, o câncer de mama continua sendo o tumor mais incidente e mortal entre as mulheres no mundo (IARC, 2020), com taxas de sucesso terapêutico ainda limitadas pela resistência aos quimioterápicos (NEDELJKOVIĆ & DAMJANOVIĆ, 2019). Diante desse panorama, torna-se fundamental investigar os mecanismos moleculares que contribuem para a quimiorresistência, visando sobrepujar esse fenótipo na prática clínica. Considerando que FOXK2 atua como supressor tumoral em câncer de mama (LIU *et al.*, 2015; SHAN *et al.*, 2016) e está implicada em vias de sensibilidade às drogas nessa neoplasia (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018), estudar suas funções biológicas e seus mecanismos de regulação pode contribuir para o desenho de intervenções terapêuticas mais eficazes, que potencializem os efeitos antitumorais das terapias convencionais. Considerando os dados da nossa abordagem *in*

*silico*, brevemente descritos no **Tópico 1.3.4**, AKT é a principal quinase que pode atuar na regulação direta de FOXK2 por fosforilação. Diante disso, estabelecemos a hipótese de que AKT fosforila FOXK2 em células de câncer de mama, inativando-a e contribuindo para um fenótipo de resistência às drogas (**Figura 1.11**).



**Figura 1.11 – Hipótese do estudo.** O presente estudo se baseia na hipótese de que AKT promove a fosforilação de FOXK2 em células de câncer de mama, inativando sua função como supressor tumoral e contribuindo para o fenótipo de resistência às drogas e pior prognóstico em pacientes.

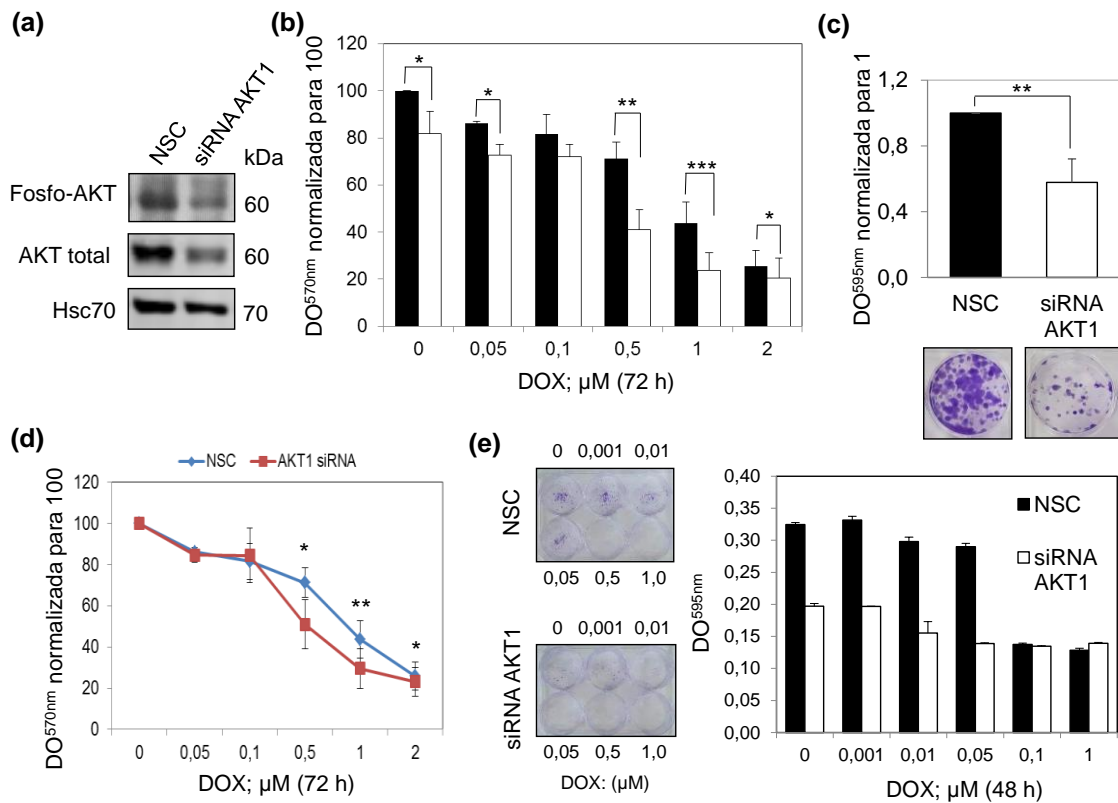
A investigação dessa hipótese foi iniciada durante o meu trabalho de iniciação científica, quando observamos que as células MDA-MB-231 apresentam níveis proteicos mais elevados de FOXK2 e de fosforilação de AKT quando comparada à MCF-7, o que está associado à maior resistência à doxorrubicina (**Figura 1.12**).



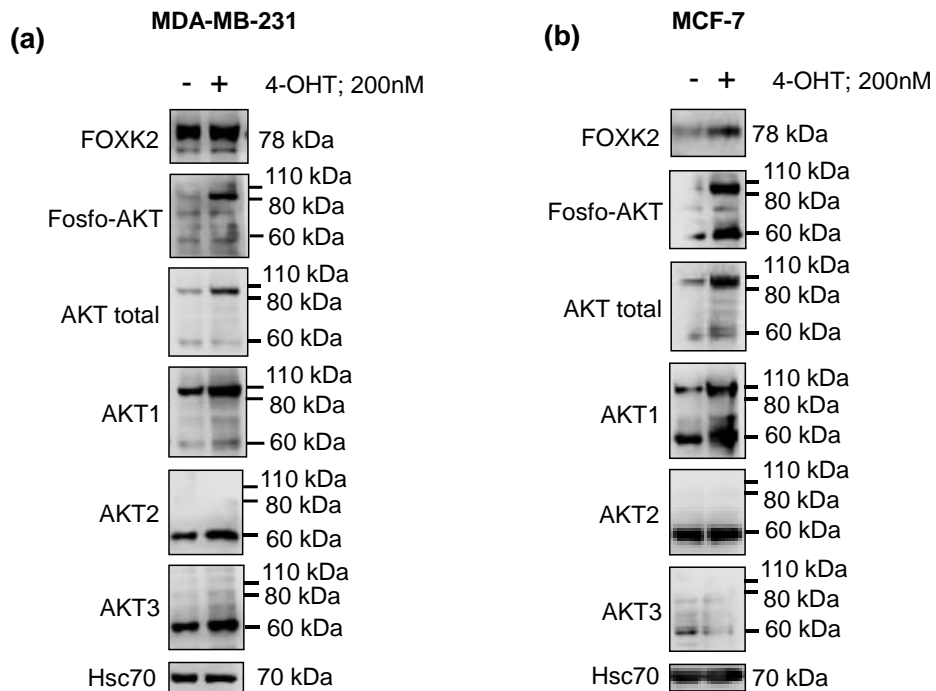
**Figura 1.12 – Níveis proteicos de FOXK2 e AKT em linhagens celulares de câncer de mama com fenótipos distintos de quimiorresistência.** As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram coletadas para análise por Western blotting (a) e sensibilidade à DOX por MTT (b). As barras representam média  $\pm$  s.d. de três experimentos independentes (teste t de Student; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ , significativo).

Também demonstramos que células MDA-MB-231 inibidas para AKT por siRNA apresentam menor clonogenicidade e se mostram mais sensíveis à DOX (**Figura 1.13**). Após a validação do papel de AKT no nosso modelo experimental, dados preliminares sugeriram que a superexpressão de AKT modula os níveis proteicos de FOXK2 (**Figura 1.14**), embasando a continuidade do estudo e o desenvolvimento do presente projeto de mestrado.





**Figura 1.13 – AKT1 é requerida para a sobrevivência e promove resistência à DOX em células MDA-MB-231.** As células foram transfectadas com siRNA *non-silencing* (NSC) e siRNA AKT1 por 72 h e coletadas para análise por Western Blotting (a) e sensibilidade à DOX por MTT (b,d) e ensaio clonogênico (c,e). As barras representam média ± s.d. de três experimentos independentes (teste t de Student; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , significativo).



**Figura 1.14 – O conteúdo proteico de FOXK2 é induzido após a superexpressão de AKT constitutivamente ativa (myrAKT).** As células (a) MDA-MB-231 e (b) MCF-7 foram transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER por 24 h e tratadas com 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) ou etanol (veículo) por 24 h. Os níveis proteicos foram avaliados por Western Blotting.

A melhor compreensão do eixo de regulação AKT-FOXK2 pode fornecer um novo racional para aprimorar a resposta terapêutica aos inibidores da via de AKT, aos quais mecanismos de resistência vêm sendo reportados em ensaios pré-clínicos e clínicos e considerados como limitantes do seu potencial terapêutico (HUW *et al.*, 2013; JURIC *et al.*, 2015; STOTTRUP *et al.*, 2016; HENRY *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018c). Além disso, foi descrito que a desregulação no metabolismo de glicose induzida por inibidores de PI3K reduz a eficácia desse tratamento na clínica (HOPKINS *et al.*, 2018), sugerindo que estratégias terapêuticas combinadas podem otimizar a resposta tumoral à terapia.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o papel das modulações de AKT nos níveis proteicos e na localização subcelular de FOXK2, assim como o impacto do eixo de regulação AKT-FOXK2 na resistência aos quimioterápicos em células de câncer de mama.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Investigar o impacto da inibição de AKT no conteúdo proteico de FOXK2 em células resistentes à doxorrubicina.
- Investigar o efeito da inibição de AKT na localização subcelular de FOXK2 em células resistentes à doxorrubicina.
- Avaliar o impacto da fosforilação no perfil de bandas de FOXK2.
- Verificar o efeito da modulação do eixo AKT-FOXK2 no perfil de resposta ao tratamento quimioterápico em células de câncer de mama.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Cultura de células**

As linhagens celulares derivadas de câncer de mama MCF7 (ATCC®, HTB-22TM) e MDA-MB-231 (ATCC®, HTB-26TM) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco), L-glutamina (2mM) e penicilina e estreptomicina (10 µL/mL). As células foram mantidas em estufa (Thermo

Scientific) com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C e foram tripsinizadas (Tripsina 0,125 %) para realização dos experimentos e repiques.

Esses modelos celulares apresentam distintas alterações genéticas associadas à via PI3K/AKT (**Tabela 3.1**) e foram escolhidos para esse estudo por apresentarem perfis distintos de níveis proteicos de FOXK2 e pertencerem a subtipos imunohistoquímicos diferentes. A MCF7 é uma linhagem luminal A e não invasiva, enquanto a MDA-MB-231 é uma linhagem triplo negativa, altamente invasiva e metastática (TAI *et al.*, 2003; NAGARAJA *et al.*, 2006). As linhagens foram previamente genotipadas quanto aos seus perfis STR (*Short tandem repeats*) e periodicamente monitoradas quanto à contaminação por micoplasma.

**Tabela 3.1 – Assinaturas moleculares das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231**

Linhagens celulares	Genes				
	<i>PTEN</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>AKT</i>
MDA-MB-231	Selvagem	Mutada	Mutada	Selvagem	Selvagem
MCF-7	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Mutada	Selvagem

Fonte: *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*

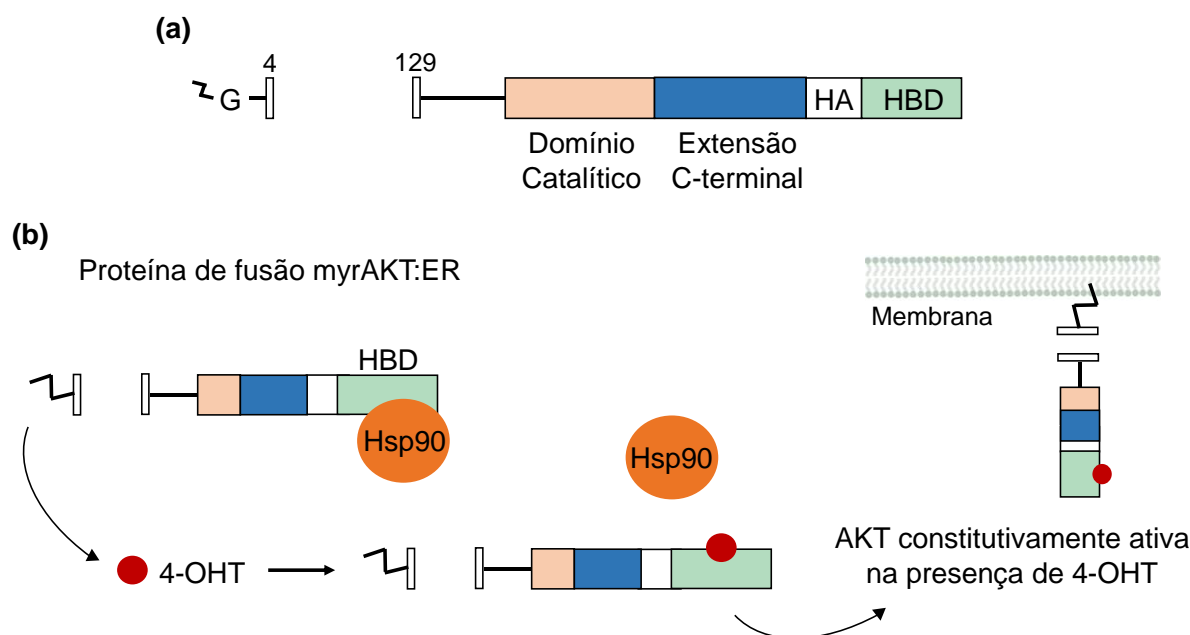
### 3.2. Tratamento com doxorrubicina (DOX) e docetaxel (DTX)

As células foram tratadas com diferentes concentrações dos quimioterápicos DOX (Fauldoxo®, Libbs) e DTX (Medicamento Genérico, Glenmark) e as diluições seriadas das soluções estoques dos quimioterápicos (DOX: 1,72 mM em solução de NaCl 0,1 %; DTX: 1 mM em meio de cultura) foram realizadas no meio de cultura das linhagens celulares, previamente à realização dos experimentos. As concentrações clínicas da DOX (1 µM) e do DTX (100 nM) foram abrangidas nos ensaios.

### 3.3. Vetores plasmidiais

Os vetores pCMV5 e pCMV5-FOXK2 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Andrew Sharrocks (University of Manchester, Manchester, UK.) e previamente descritos (MARAIS *et al.*, 2010). O vetor de expressão condicional pBABE-(myr)Akt:ER induzida por 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT; Sigma, H6278), foi cedido pelo Dr. Eric W. Lam. O plasmídeo pBABE-(myr)Akt:ER codifica uma versão de AKT constitutivamente ativa de forma condicional. Nesse construto, AKT contém uma sequência sinal de miristoilação para

direcionamento constitutivo à membrana plasmática e não possui a região de homologia à plecstrina, que normalmente direciona AKT à membrana em resposta ao aumento de PIP3 (**Figura 3.1a**). Além disso, nesse caso, a AKT miristoilada (myrAKT) é expressa fusionada ao domínio de ligação ao hormônio (HBD) do receptor de estrogênio (ER) modificado para ser responsivo ao 4-OHT (**Figura 3.1a**). Logo, quando myrAkt:ER se liga ao indutor 4-OHT administrado exogenamente, essa proteína transloca-se para a membrana plasmática e torna-se constitutivamente ativa (**Figura 3.1b**).



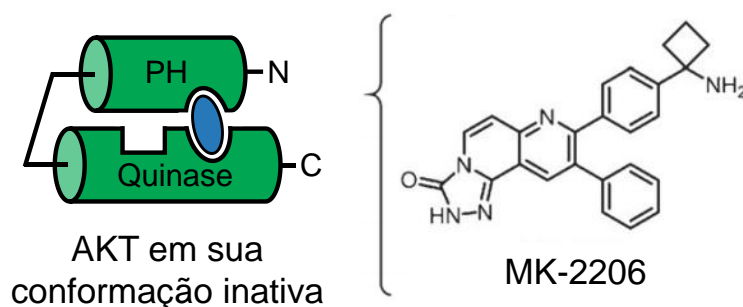
**Figura 3.1 – Esquema da estrutura e funcionamento da proteína myrAKT:ER.** (a) O construto que codifica AKT constitutivamente ativa de forma condicional (myrAKT:ER) não apresenta a região de homologia à plecstrina ( $\Delta 4-129$ ) e possui uma sequência sinal de miristoilação na região N-terminal, pela qual AKT é miristoilada (myrAKT) no resíduo de glicina (G). Possui também um epítipo HA e o domínio de ligação ao hormônio (HBD) do receptor de estrogênio (ER) fusionados em sua região C-terminal, sendo o HBD modificado para ser responsivo ao 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). Adaptado de Kohn et al., 1998. (b) Normalmente, o HBD está associado a proteínas inibitórias, como a Hsp90 (*heat shock protein 90*), impedindo que a proteína de fusão myrAKT:ER se encaminhe para a membrana. Quando myrAkt:ER se liga ao indutor 4-OHT administrado exogenamente, Hsp90 é deslocada e a proteína myrAKT:ER transloca-se para a membrana plasmática e torna-se constitutivamente ativa.

### 3.4. Inibição farmacológica de AKT: LY294002 e MK-2206

A inibição farmacológica da fosforilação de AKT foi feita através do LY294002 (Uniscience, 9901S), um inibidor competitivo pelo sítio de ligação de ATP da PI3K, reguladora *upstream* de AKT. Para esse fim, foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células MDA-MB-231 em poços de  $10 \text{ cm}^2$ , ou  $5,5 \times 10^6$  células em garrafas de  $150 \text{ cm}^2$ , a fim de obter 90-95 % de confluência 24 h após adesão. Então, as células foram tratadas por 1 h com DMSO (veículo) ou  $30 \mu\text{M}$  de LY294002, tratamento estabelecido a partir de dados prévios da minha iniciação científica, com

base em protocolos da literatura para esse modelo (JIN *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2012). Ao final, os níveis de FOXK2, fosfo-AKT e AKT total foram analisados por Western blotting nos extratos proteicos totais e fracionados.

Para inibir diretamente a atividade de AKT, foi utilizado o MK-2206, um inibidor alostérico dependente do domínio de homologia à plecstrina, que estabiliza AKT em sua conformação inativa (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2 – Esquema do mecanismo de ação do MK-2206.** O MK-2206 é um inibidor alostérico de AKT dependente do domínio de homologia à plecstrina (PH), que se liga de forma reversível a interface formada entre o domínio quinase e o domínio PH de AKT, estabilizando-a em sua conformação inativa. Adaptado de Weisner *et al.*, 2015.

Inicialmente, foi estabelecida a curva de toxicidade desse composto para as células MDA-MB-231. Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de  $10^5$ /mL. Após 24 h de adesão, as células foram expostas às seguintes condições: controle (não tratadas), DMSO (veículo) e 5, 10, 25 e 50  $\mu$ M de MK-2206. Em seguida, foram mantidas em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 8, 16, 24 e 48 h e, então, foi realizado o ensaio de MTT.

A fim de avaliar os níveis proteicos, foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células MDA-MB-231 em poços de 10 cm<sup>2</sup>, a fim de obter 90-95 % de confluência 24 h após adesão. Então, as células foram tratadas com 25  $\mu$ M de MK-2206 por 0, 4, 8, 16 e 24 h, estabelecendo uma cinética de tempo, onde o ponto de 0 h foi tratado com DMSO. As células também foram tratadas em uma cinética de concentração pelo período de 24 h, onde utilizou-se as seguintes condições experimentais: controle, DMSO e 5, 10 e 25  $\mu$ M de MK-2206. Para avaliar o impacto da inibição de AKT pelo MK-2206 na localização subcelular (ver tópico 3.16) de FOXK2,  $4,7 \times 10^6$  células MDA-MB-231 foram plaqueadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> e, após 24 h de adesão, foram expostas ao DMSO (veículo) ou à 25  $\mu$ M do composto por 24 h. Por fim, os níveis de FOXK2, fosfo-AKT e AKT total foram avaliados por Western blotting nos extratos proteicos totais e fracionados.

### 3.5. Inibição gênica de AKT e GSK3 $\beta$ por RNA de interferência (RNAi)

A fim de avaliar o impacto da inibição gênica de AKT1 nos níveis proteicos endógenos de FOXK2 das células MDA-MB-231, a expressão de AKT1 foi inibida por siRNA, utilizando um modelo de transfecção. Primeiramente, as células foram plaqueadas de forma a obter 30-50 % de confluência 24 h após adesão (**Tabela 3.2**). Em seguida, as células foram transfectadas com siRNA controle negativo (*Non-Silencing control* – NSC) ou siRNA para AKT1, utilizando a Lipofectamina RNAimax (Life Technologies) em presença de OPTI-MEM (OPTI-MEM® I Reduced Serum Media, Invitrogen) (**Tabela 3.2**), resultando em uma concentração final de 10 nM de siRNA por poço/placa. Após 72 h de transfecção, as células foram tripsinizadas e coletadas para análise da inibição de AKT por Western blotting.

**Tabela 3.2 – Condições experimentais utilizadas na transfecção com RNAi**

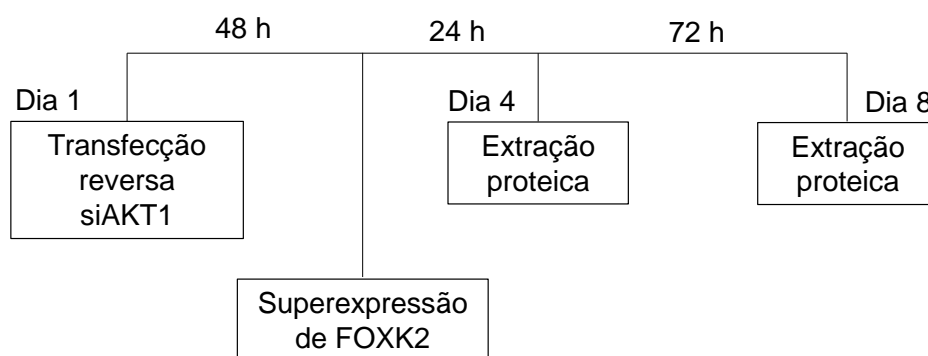
Placa	Área (cm <sup>2</sup> )	Nº de células	DMEM + SFB	Lipo <sup>1</sup> (µL)	OPTI-MEM	siRNA (µL)
6 poços	10	2,5 x 10 <sup>5</sup>	2,5 mL	5	500 µL	3
Petri 10 cm	60	1,5 x 10 <sup>6</sup>	10 mL	20	2 mL	12

<sup>1</sup>LipofectaminaRNAimax

A fim de avaliar se a regulação de FOXK2 por AKT pode ser influenciada por GSK3 $\beta$  nas células MDA-MB-231, a expressão de GSK3 $\beta$  também foi inibida por siRNA, conforme a **Tabela 3.2**. Após o plaqueamento, as células foram expostas às seguintes condições: Mock (todos os reagentes de transfecção, exceto os RNAs) e siRNA para GSK3 $\beta$  (QIAGEN). Após 24 e 48 h de transfecção, as células foram coletadas para análise dos níveis proteicos por Western blotting.

### 3.6. Inibição gênica de AKT e superexpressão de FOXK2

Com a finalidade de avaliar o efeito da inibição de AKT nos níveis proteicos exógenos de FOXK2 em células MDA-MB-231, o experimento de co-transfecção de RNA e DNA foi realizado (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3 – Desenho experimental de co-transfecção da linhagem MDA-MB-231 com siRNA controle negativo (Non-Silencing control) ou siRNA para AKT1 e os plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2).**

Nesse ensaio, FOXK2 é superexpressa por transfecção plasmidial transiente na presença e na ausência de AKT1. Para inibir a expressão de AKT1, foi utilizada a metodologia de transfecção descrita no Tópico 3.5. Após 48 h, as células foram transfectadas com os plasmídeos pCMV5 ou pCMV5-FOXK2 em presença de OPTI-MEM, mediante uma razão de 1:1 de DNA para Lipofectamina2000 (Life Technologies) (**Tabela 3.3**). Após 24 e 96 h de transfecção, a inibição de AKT1 e seu efeito nos níveis proteicos de FOXK2, AKT2 e AKT3, foi analisada pela técnica de Western blotting.

**Tabela 3.3 – Condições experimentais para transfecção plasmidial transiente**

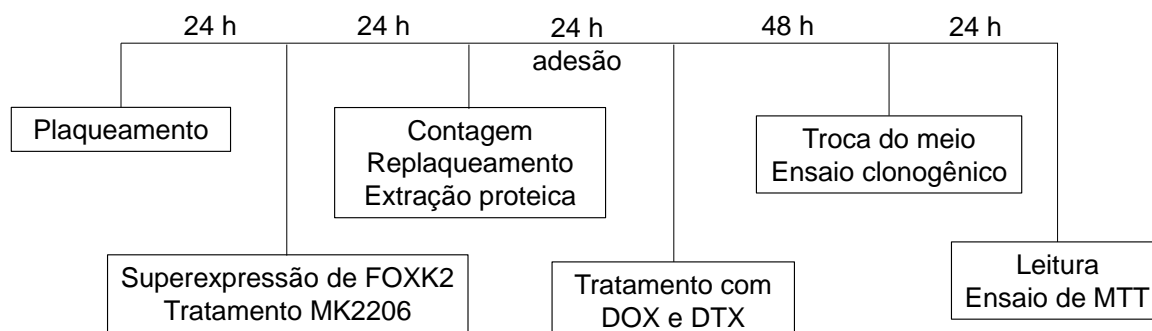
Placa	Área (cm <sup>2</sup> )	Número células	DMEM + SFB	Lipo <sup>1</sup> (µL)	OPTI-MEM	DNA (µg)
6 poços	10	3 x 10 <sup>5</sup>	1,5 mL	4	500 µL	4
Petri 10 cm	60	1,8 x 10 <sup>6</sup>	9 mL	24	3 mL	24

<sup>1</sup>Lipofectamina2000

### 3.7. Inibição farmacológica de AKT e superexpressão de FOXK2

Para avaliar o efeito da inibição farmacológica de AKT nos níveis proteicos exógenos de FOXK2 e na resistência aos quimioterápicos, as células MDA-MB-231 foram tratadas com MK2206 e submetidas à transfecção plasmidial transiente para superexpressão de FOXK2 (**Figura 3.4**). Nesse ensaio, FOXK2 é superexpressa na presença e na ausência da ativação de AKT. Para isso, as células foram plaqueadas e, 24 h após a adesão, foram transfectadas com os plasmídeos pCMV5 ou pCMV5-FOXK2, conforme a Tabela 3.3, e tratadas com 10 µM do MK2206. Após 24 h de transfecção e tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas para o tratamento com DOX ou DTX e a realização dos ensaios de MTT e

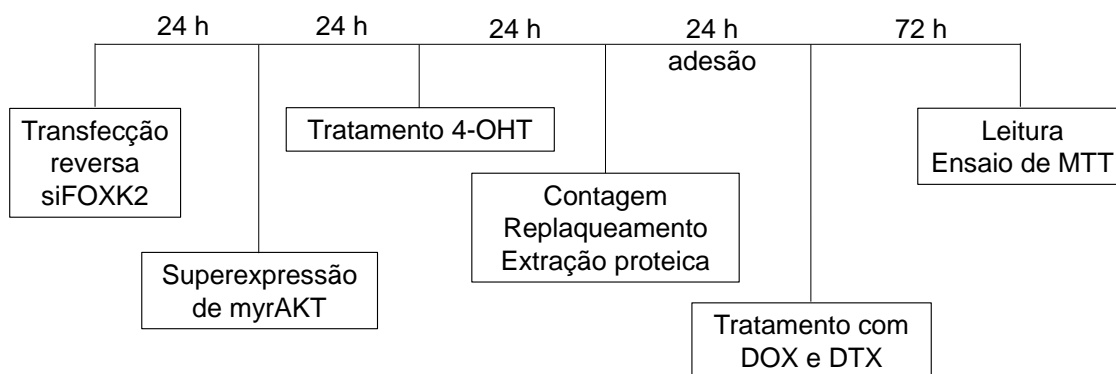
clonogênico. Para análise da inibição de AKT e superexpressão de FOXK2, foi utilizada a técnica de Western blotting.



**Figura 3.4 – Desenho experimental de inibição farmacológica de AKT pelo MK2206 e transfecção dos plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2) na linhagem MDA-MB-231.** DOX: doxorubicina; DTX: docetaxel.

### 3.8. Inibição de FOXK2 e superexpressão de myrAKT

Para avaliar o impacto da superexpressão de AKT constitutivamente ativa (myrAKT) no perfil proteico de FOXK2 e na quimiorresistência nas células MCF-7, foi realizado um segundo modelo experimental de co-transfecção de RNA e DNA (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5 – Desenho experimental de co-transfecção da linhagem MCF-7 com siRNA controle negativo (Non-Silencing control) ou siRNA para FOXK2 e o plasmídeo pBABE-(myr)Akt:ER.** 4-OHT: 4-hidroxitamoxifeno; DOX: doxorubicina; DTX: docetaxel.

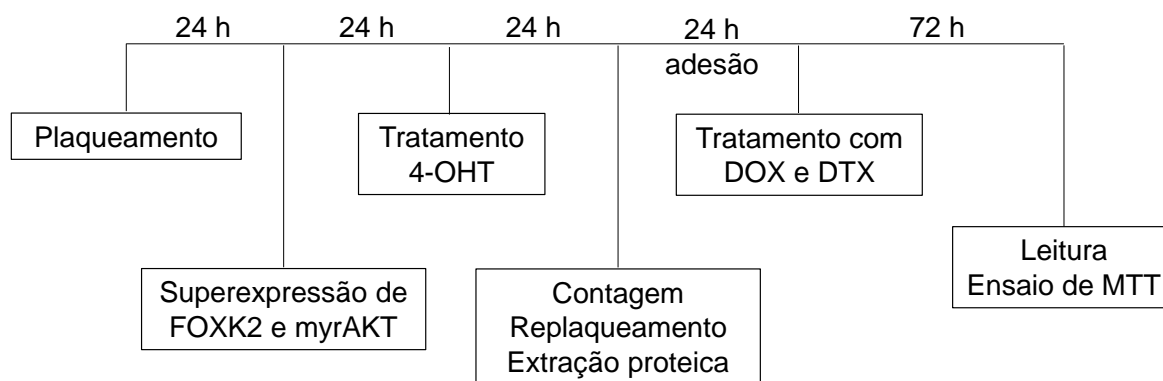
Nesse ensaio, a expressão de FOXK2 foi inibida por siRNA (Thermo Scientific Dharmacon; Life Technologies), a partir do modelo de transfecção descrito no Tópico 3.5. Como controle, as células também foram expostas à condição ‘Mock’ (todos os reagentes de transfecção, exceto o RNA). Após 24 h, as células foram transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER, conforme a Tabela 3.3. Após 24 h de transfecção, as células foram expostas ao etanol (veículo) ou a 200 nM de 4-OHT por mais 24 h, para indução da superexpressão de AKT, conforme descrito no Tópico 3.3. Por fim, as células foram tripsinizadas, contadas e



replaqueadas para o tratamento com DOX ou DTX e a realização do ensaio de MTT. Ao final, a superexpressão de AKT e inibição de FOXK2 foram avaliadas por Western blotting.

### 3.9. Superexpressão de FOXK2 e myrAKT

A fim de avaliar o impacto da superexpressão de AKT constitutivamente ativa (myrAKT) no conteúdo proteico de FOXK2 e na resistência aos quimioterápicos nas células MCF-7, foi realizado um experimento de co-transfecção de DNA (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6 – Desenho experimental de co-transfecção de DNA da linhagem MCF-7 com os plasmídeos pCMV5 (vetor vazio) ou pCMV5-FOXK2 (vetor codificando FOXK2) e o plasmídeo pBABE-(myr)Akt:ER.** 4-OHT: 4-hidroxitamoxifeno; DOX: doxorubicina; DTX: docetaxel.

Nesse experimento, FOXK2 é superexpressa por transfecção plasmidial transiente na presença e na ausência da indução de myrAKT. Após o plaqueamento, as células foram transfectadas com os plasmídeos pCMV5 ou pCMV5-FOXK2 e também com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER, conforme a Tabela 3.3. Após 24 h de transfecção, as células foram expostas ao etanol (veículo) ou a 200 nM de 4-OHT por mais 24 h, para indução da superexpressão de AKT, conforme descrito no Tópico 3.3. Por fim, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas para o tratamento com DOX ou DTX e a realização do ensaio de MTT. Por fim, os níveis proteicos foram avaliados por Western blotting.

### 3.10. Tratamento com a lambda-fosfatase

Para avaliar mudanças no perfil de bandas de FOXK2 que sejam características de fosforilação, foi realizado o tratamento dos extratos celulares com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP), enzima que remove os grupamentos fosfato. Inicialmente, foi feita a padronização do tratamento, usando diferentes linhagens celulares e protocolos descritos na literatura. Os extratos celulares totais foram preparados através da lise das células em *Triton Lysis Buffer*

(TLB): 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), 0.5 mM ditiotretol, 10% glicerol e 1% Triton X-100. Os pellets celulares frescos foram lisados no tampão de extração por 30 min no gelo, vortexando em intervalos de 10 min. Ao final, as amostras foram centrifugadas (13000 rpm, 10 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram coletados. Alternativamente, um pellet das células MDA-MB-231 foi encaminhado para extração por sonicação com TLB e *NEBuffer* (New England BioLabs® Inc., B0761S) para metalofosfatases (PMP), onde realizou-se ciclos de 1 min de sonicação e 1 min de incubação no gelo por 5 vezes e mais 5 min de sonicação ao final. Esse lisado seguiu para o protocolo de reação com a  $\lambda$ PP por 1 h a 37 °C (**Tabela 3.4**). Foi adicionado inibidor de protease *cOmplete, Mini, EDTA-free* (Sigma, 11836170001) aos extratos e a quantificação das proteínas foi feita pelo Kit BioRad®, baseado no método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Após a dosagem, para cada amostra, 100  $\mu$ g de proteína foram incubadas em um total de 50  $\mu$ L, contendo 400 unidades de  $\lambda$ PP (New England BioLabs® Inc., P0753S), 1x PMP e 1mM de  $MnCl_2$ . Considerando cada linhagem celular, as condições de reação com a  $\lambda$ PP ocorreram conforme a Tabela 3.4. A partir dos dados da padronização, escolheu-se o protocolo de extração proteica por sonicação e tratamento com  $\lambda$ PP por 1 h a 37 °C para os próximos desenhos experimentais.

**Tabela 3.4 – Condições de padronização da reação com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP)**

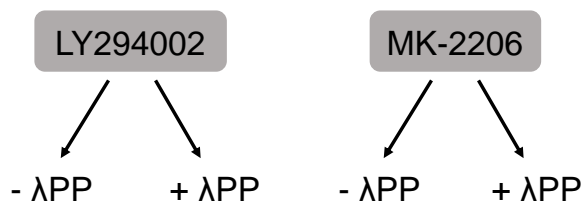
Linhagem celular	Tempo de reação	Temperatura de reação	Referência
HEK293T	1 h	30 °C	Chen <i>et al.</i> , 2020
HT-29	30 min	30 °C	Frank <i>et al.</i> , 2019
	1 h	37 °C	Adaptado de Marais <i>et al.</i> , 2010 <sup>1</sup>
	30 min	37 °C	Marais <i>et al.</i> , 2010
MDA-MB-231	30 min	30 °C	Frank <i>et al.</i> , 2019
	1 h	1 h temperatura ambiente	Iacovides <i>et al.</i> , 2013
	30 min	e 30 min a 37 °C	

<sup>1</sup> Extração proteica foi realizada por sonicação (protocolo detalhado no texto).

### 3.11. Inibição de AKT e tratamento com a lambda-fosfatase

A fim de avaliar se as modulações no padrão de bandas de FOXK2 são dependentes de fosforilação mediada por AKT, os ensaios de inibição farmacológica dessa quinase foram combinados ao tratamento com lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP) (**Figura 3.7**). Para isso, as células MDA-MB-231 foram tratadas com 30  $\mu$ M de LY294002 por 1 h e 25  $\mu$ M de MK-2206 por 24

h), de acordo com o Tópico 3.4. Em seguida, os pellets celulares frescos foram lisados por sonicação e os extratos proteicos foram quantificados e tratados com  $\lambda$ PP, conforme o Tópico 3.10, seguindo o protocolo de reação de 1 h a 37 °C. Por fim, os níveis de FOXK2, fosfo-AKT e AKT total foram avaliados por Western blotting.



**Figura 3.7 – Condições experimentais dos ensaios de inibição de AKT combinados ao tratamento com lambda-fosfatase.** A inibição farmacológica de AKT foi realizada através do tratamento das células MDA-MB-231 com dois compostos: (i) 30  $\mu$ M de LY294002 por 1 h e (ii) 25  $\mu$ M de MK-2206 por 24 h. Então, os extratos proteicos frescos, obtidos por sonicação, foram expostos a duas condições experimentais: ausência de tratamento com lambda-fosfatase (-  $\lambda$ PP) e tratamento com  $\lambda$ PP (+  $\lambda$ PP) por 1 h a 37 °C.

### 3.12. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT é um método colorimétrico que avalia a viabilidade celular a curto prazo com base na atividade da enzima desidrogenase mitocondrial. Em células viáveis, tal enzima reduz o 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo (MTT) em cristais de formazana, que podem ser mensurados por espectrofotometria. Nesse ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de  $10^5$ /mL ( $10^4$  células/poço). Após 24 h de adesão, as células foram tratadas com os seguintes compostos em diferentes concentrações: 5, 10, 25 e 50  $\mu$ M de MK-2206; 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 2  $\mu$ M de DOX e 1, 5, 10, 50, 100 e 200 nM de DTX. Então, as células foram mantidas em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 72 h. Quatro horas antes do término desse período, foram adicionados 20  $\mu$ L de MTT por poço e as placas foram incubadas na estufa pelo tempo restante protegidas da luz. Ao fim da incubação, as placas foram centrifugadas (2000 rpm, 3 min), o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazana, dissolvidos em 150  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido). A densidade óptica foi obtida por espectrofotometria (DTX 800 Multimode Detector; Beckman Coulter) no comprimento de onda de 492 nm. As condições experimentais foram realizadas em triplicata, tanto no controle (não tratado com a droga), quanto em todas as concentrações dos compostos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os resultados foram calculados através das médias dos percentuais de viabilidade celular obtidas nos ensaios.

### **3.13. Ensaio clonogênico**

Para avaliar a capacidade de formação de colônias e a viabilidade celular a longo prazo, foi utilizado o ensaio clonogênico. Para isso, 2000 células foram plaqueadas em poços de 10 cm<sup>2</sup> e incubadas por 24 h em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C para adesão. Posteriormente, as células foram tratadas com 0,01, 0,05, 0,1 e 1 µM de DOX ou 1, 5, 10, 50 e 100 nM de DTX. Após 48 h, o meio de cultura foi trocado por um meio fresco livre de drogas e as células foram acompanhadas até a observação da formação de colônias, em aproximadamente 14 dias. Durante este período, o meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias e as células foram mantidas em estufa. Ao final, as colônias foram lavadas com solução salina de fosfato (PBS) e fixadas com etanol por 15 min à temperatura ambiente. Depois de mais 3 lavagens com PBS, as colônias foram coradas com 0,5 % de cristal violeta por 1 h, lavadas com água corrente e secas ao ar. Posteriormente, as colônias foram fotografadas e, então, 1 mL de ácido acético a 33 % (diluído em PBS) foi adicionado a cada poço. As placas foram mantidas em agitação por 30 minutos para solubilização do cristal violeta, quando 100 µL da solução de cada poço foi transferido, em triplicata, para uma placa de 96 poços. Adicionalmente, foi realizada uma diluição 1:10 (10 µL de amostra + 90 µL de ácido acético 33 %), previamente à leitura da densidade ótica por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os resultados foram calculados através das médias dos percentuais de viabilidade celular obtidas nos ensaios.

### **3.14. Detecção da expressão de proteínas por Western blotting**

A expressão proteica nas células MCF7 e MDA-MB-231 foi analisada pela técnica de Western Blotting. Os extratos celulares totais foram preparados através da lise das células em tampão de extração (FNN0011; Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante. Foram adicionados inibidores de protease e fosfatase (Cell Signaling, 5872S) aos extratos e a quantificação das proteínas foi feita pelo Kit BioRad®, baseado no método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Após a dosagem, foi adicionado às amostras o tampão loading (115 mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) e as proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 min. Posteriormente, um total de 15-30 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida 7 ou 10 % (Acrilamida/ Bis-Acrlamida 30%; 25% H<sub>2</sub>O; 115mM tampão Tris-HCl pH 6.8 ou pH 8.8; 10 % SDS; TEMED; APS), dependendo do peso molecular da proteína de interesse. A corrida foi realizada com tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 0,1 % SDS; pH 8,3; Bio-rad)

à 200 V por aproximadamente 40 min. Em seguida, as proteínas foram transferidas em um sistema úmido (Tampão de transferência: 25 mM Tris, 192 mM Glicina e metanol 20%; pH 8,3; Bio-rad) para uma membrana de nitrocelulose (GE healthcare) à 100 V por 2 h. O padrão da corrida foi verificado com Ponceau Red (Ponceau Red 0,1 %; ácido acético 5 %). Para evitar marcações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas por 1 h com uma solução a 5 % de leite em pó desnatado diluído em TBS/Tween 0,05 % (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM de NaCl; 0,05 % Tween-20). Em seguida, as membranas foram incubadas à 4 °C overnight com os anticorpos primários diluídos em TBS-Tween 0,1 %/BSA 5 % (**Tabela 3.5**).

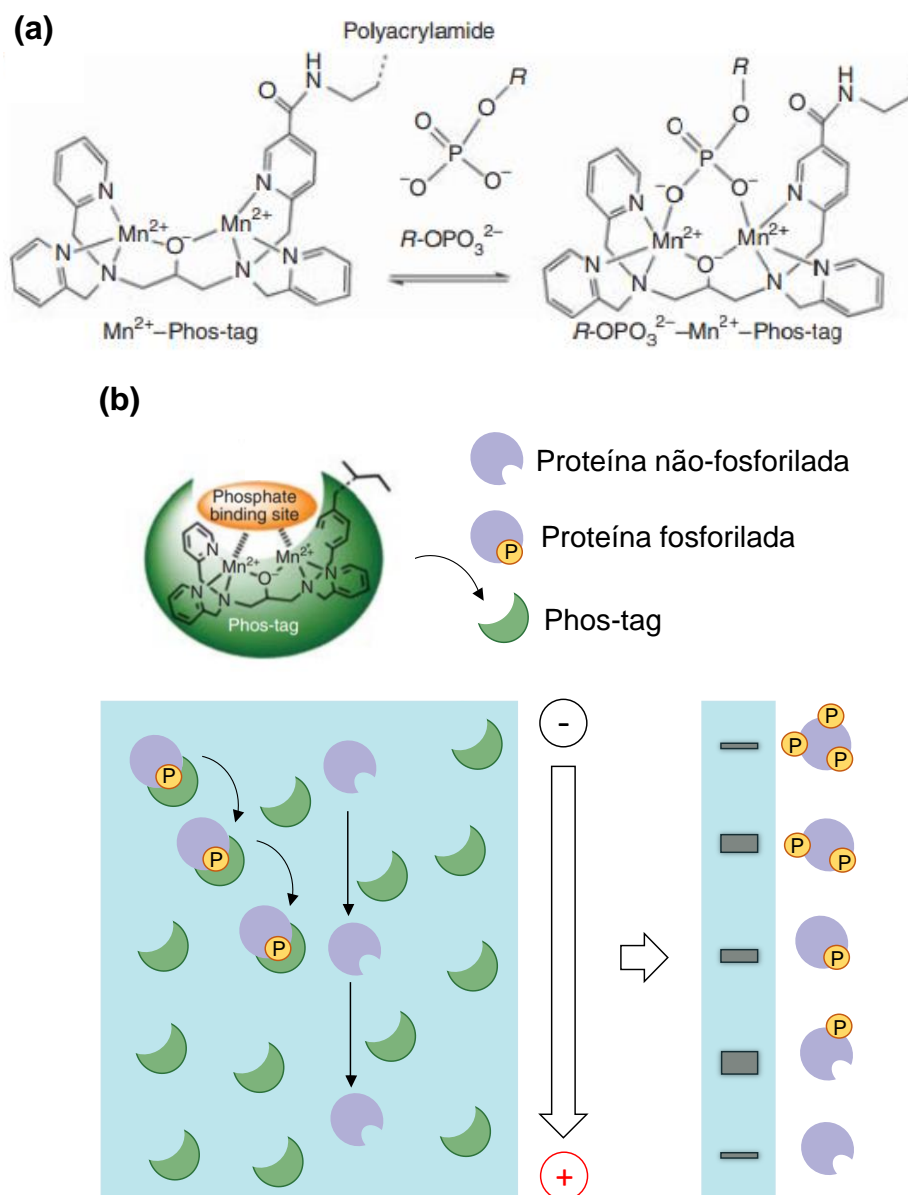
**Tabela 3.5 – Anticorpos primários utilizados na técnica de Western blotting**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
FOXK2	A301-729A	Rabbit	1:500	Bethyl Laboratories
Fosfo-AKT	#9271	Rabbit	1:500	Cell Signaling
AKT total	#9272	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
AKT1	#2938	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
AKT2	#3063	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
AKT3	#14982	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-GSK3 $\beta$	#9336	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
GSK3 $\beta$ total	#9315	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
$\beta$ -actina	A5441	Mouse	1:1000	Sigma-Aldrich
GAPDH	G8795	Mouse	1:10000	Sigma-Aldrich
Hsc70	sc-7298	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Lamina B 1	sc-374015	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -tubulina	sc-5274	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Então, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween 0,05 % por 5 min e incubadas com anticorpos secundários anti-mouse (1:40000) ou anti-rabbit (1:20000) (Sigma-Aldrich) conjugados a HorseRadish-Peroxidase à temperatura ambiente por 1 h, sob agitação. Ao final da incubação, as membranas foram lavadas 4 vezes com TBS-Tween 0,05 % por 10 min e o Kit Clarity Max<sup>TM</sup> Western ECL (BioRad) foi utilizado para revelação. As proteínas Hsc70, GAPDH,  $\beta$ -actina e Lamina B foram utilizadas como controles constitutivos. As bandas foram detectadas usando sistema digital (ChemiDoc<sup>TM</sup> Imaging System, BioRad ou c-Digit Licor, Uniscience) e a densitometria das bandas foi feita pelo programa ImageJ.

### 3.15. Phos-tag™ SDS-PAGE

O Phos-tag™ SDS-PAGE é uma técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida que permite separar proteínas em suas formas fosforiladas e não-fosforiladas, baseado nos níveis de fosforilação e nos sítios de fosforilação (KINOSHITA *et al.*, 2009). O Phos-tag™ é um composto químico desenhado a partir do domínio catalítico de uma fosfatase alcalina, que se liga ao grupo fosfato de proteínas fosforiladas, através de íons metálicos divalentes (zinco ou manganês) presentes em sua estrutura (**Figura 3.8a**) (KINOSHITA *et al.*, 2009).



**Figura 3.8 – Phos-tag™ SDS-PAGE.** (a) Estrutura do Phos-tag e sua ligação ao gel de poliacrilamida e esquema da captura reversível de um grupamento fosfato pelo Phos-tag. (b) O Phos-tag™ SDS-PAGE é uma técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida capaz de separar proteínas fosforiladas e não-fosforiladas, através do Phos-tag: uma molécula funcional que se liga ao grupo fosfato, por meio de íons metálicos divalentes em sua estrutura, como o Mn<sup>2+</sup>, reduzindo a velocidade de migração das proteínas fosforiladas no gel. As formas fosforiladas podem ser separadas tanto pela quantidade quanto pelo sítio de fosforilação. Adaptado de KINOSHITA *et al.*, 2009.

Ao interagir com uma proteína fosforilada, o Phos-tag reduz a sua velocidade de migração no gel de poliacrilamida, permitindo com que a mesma permaneça em uma posição de alto peso molecular no gel em comparação à sua forma não-fosforilada, que migra mais facilmente (**Figura 3.8b**) (KINOSHITA *et al.*, 2009).

### **3.16. Fracionamento subcelular**

As frações citoplasmáticas e nucleares foram separadas utilizando o kit NE-PER (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; ThermoScientific). Brevemente, após cultivo celular ou experimentos, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (1200 rpm, 4 min). Os pellets celulares foram lavados com PBS e, ao final, foram secos e ressuspendidos em 200 µL do tampão CER I. Então, as amostras foram vortexadas e permaneceram no gelo por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 µL do tampão CER II e as amostras foram vortexadas, incubadas no gelo por 1 min e vortexadas novamente. Com isso, as amostras foram centrifugadas (16000g, 5 min) e o sobrenadante foi recuperado (citoplasma). Para purificação da fração nuclear, os pellets foram lavados com PBS, centrifugados (16000g, 5 min) e ressuspendidos em 100 µL do tampão NER. Após isso, as amostras foram vortexadas e incubadas no gelo em intervalos de 10 min por 40 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas (16000g, 10 min) e o sobrenadante foi coletado (núcleo). Os níveis de FOXK2, fosfo-AKT e AKT total foram avaliados nas frações subcelulares por Western blotting. A proteína Lamina B foi usada como constitutivo nuclear, enquanto GAPDH foi utilizado como constitutivo citoplasmático.

### **3.17. Análise de banco de dados em câncer de mama**

A fim de avaliar os níveis proteicos e o perfil de fosforilação de FOXK2 em amostras de pacientes com câncer de mama, analisamos os dados de proteômica e fosfoproteômica do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC), através da plataforma UALCAN, uma ferramenta online disponível no link: <<http://ualcan.path.uab.edu/analysis-prot.html>> (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019). Nessa análise, os níveis proteicos totais e fosforilados de FOXK2 foram comparados entre 125 amostras de tumores primários da mama e 18 amostras de tecido mamário normal adjacente ao tumor (CHEN *et al.*, 2019). Os valores dos níveis proteicos foram transformados para razão  $\log_2$  (amostra individual/amostra comum de referência), onde a amostra de referência foi construída a partir do pool de proteínas

de 40 amostras tumorais representativas da coorte analisada no estudo (KRUG *et al.*, 2020). Os dados também foram normalizados entre as amostras, sendo expressos como Z-valor.

### 3.18. Análises estatísticas

Todos os resultados foram comparados pelo teste t *student* com intervalo de confiança de 95 %. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 4. Resultados

### 4.1. A inibição gênica de AKT modula o conteúdo proteico de FOXK2 em células quimiorresistentes

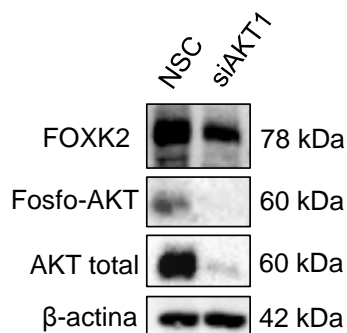
Dados preliminares obtidos durante o meu trabalho de iniciação científica indicam que as células MDA-MB-231, que apresentam resistência à doxorubicina, exibem menor clonogenicidade e se mostram mais sensíveis a esse quimioterápico quando inibidas para AKT (**Figura 1.13**). Além disso, demonstramos que a superexpressão de AKT modula os níveis proteicos de FOXK2 (**Figura 1.14**). Sendo assim, no presente projeto de mestrado, inicialmente avaliamos se a inibição de AKT poderia interferir nos níveis proteicos endógenos de FOXK2. Com essa finalidade, realizamos a inibição gênica de AKT por RNA de interferência nas células MDA-MB-231 e observamos que o conteúdo proteico endógeno de FOXK2 foi modulado mediante a inibição de AKT, com uma redução no perfil de bandas desse fator de transcrição (**Figura 4.1**).

Em seguida, avaliamos o efeito da inibição gênica de AKT nos níveis proteicos exógenos de FOXK2. Para isso, realizamos o experimento de co-transfecção de RNA e DNA, no qual a inibição de AKT por siRNA é combinada à superexpressão de FOXK2, ou seja, FOXK2 é superexpressa na presença e na ausência de AKT. Assim, observamos que o perfil de bandas de FOXK2 superexpressa é modificado após a inibição de AKT, ocorrendo uma redução especialmente das bandas de menor mobilidade de FOXK2 (**Figura 4.2**), um potencial indicativo de modificações pós-traducionais.

Sabendo que AKT compreende três isoformas e que a inibição de uma delas pode ser compensada pelo aumento no conteúdo das demais, avaliamos os níveis de AKT2 e AKT3 na presença e na ausência de AKT1. Assim, observamos que o perfil proteico de AKT2 e AKT3

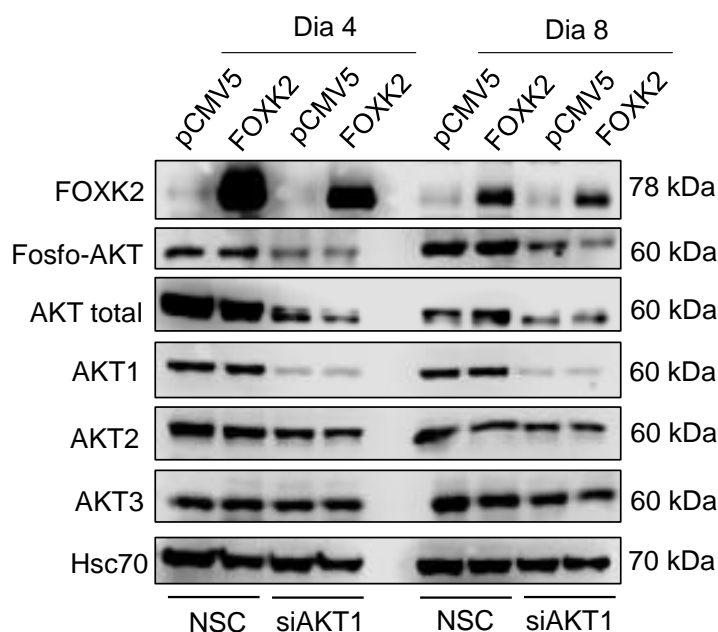


não é modulado mediante a inibição de AKT1 (**Figura 4.2**), sugerindo um efeito específico de AKT1 na regulação dos níveis proteicos de FOXK2.



FOXK2/ $\beta$ -actina 1,0 0,6

**Figura 4.1 – O conteúdo proteico endógeno de FOXK2 é modificado após a inibição gênica de AKT1.** As células MDA-MB-231 foram transfectadas com *non-silencing control* (NSC) e siRNA para AKT1. Após 8 dias de incubação, as células foram coletadas para análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total e  $\beta$ -actina foram avaliados. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência,  $\beta$ -actina. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.



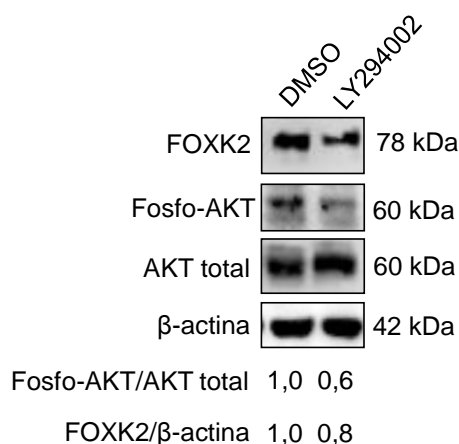
**Figura 4.2 – Os níveis proteicos exógenos de FOXK2 são modificados após a inibição gênica de AKT1.** As células MDA-MB-231 foram transfectadas com *non-silencing control* (NSC) e siRNA para AKT1. Após 48 h de incubação, as células foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2). Após 24 h (Dia 4) e 120 h (Dia 8), as células foram coletadas para análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total, AKT1, AKT2, AKT3 e Hsc70 foram avaliados. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle constitutivo. A figura é representativa de três experimentos independentes.

Como utilizamos um modelo de transfecção transiente, avaliamos se a superexpressão de FOXK2 e a inibição de AKT se mantêm até o oitavo e último dia do nosso desenho

experimental. Observamos que, mesmo em menores níveis, a superexpressão de FOXK2 e a inibição de AKT se mantêm (**Figura 4.2**), viabilizando a realização dos experimentos funcionais a longo prazo. Em conjunto, esses resultados indicam que a inibição de AKT leva a uma redução no perfil proteico de FOXK2, tanto endógeno quanto exógeno, em células quimiorresistentes de câncer de mama.

#### 4.2. A inibição farmacológica de AKT modula o conteúdo proteico de FOXK2 em células quimiorresistentes

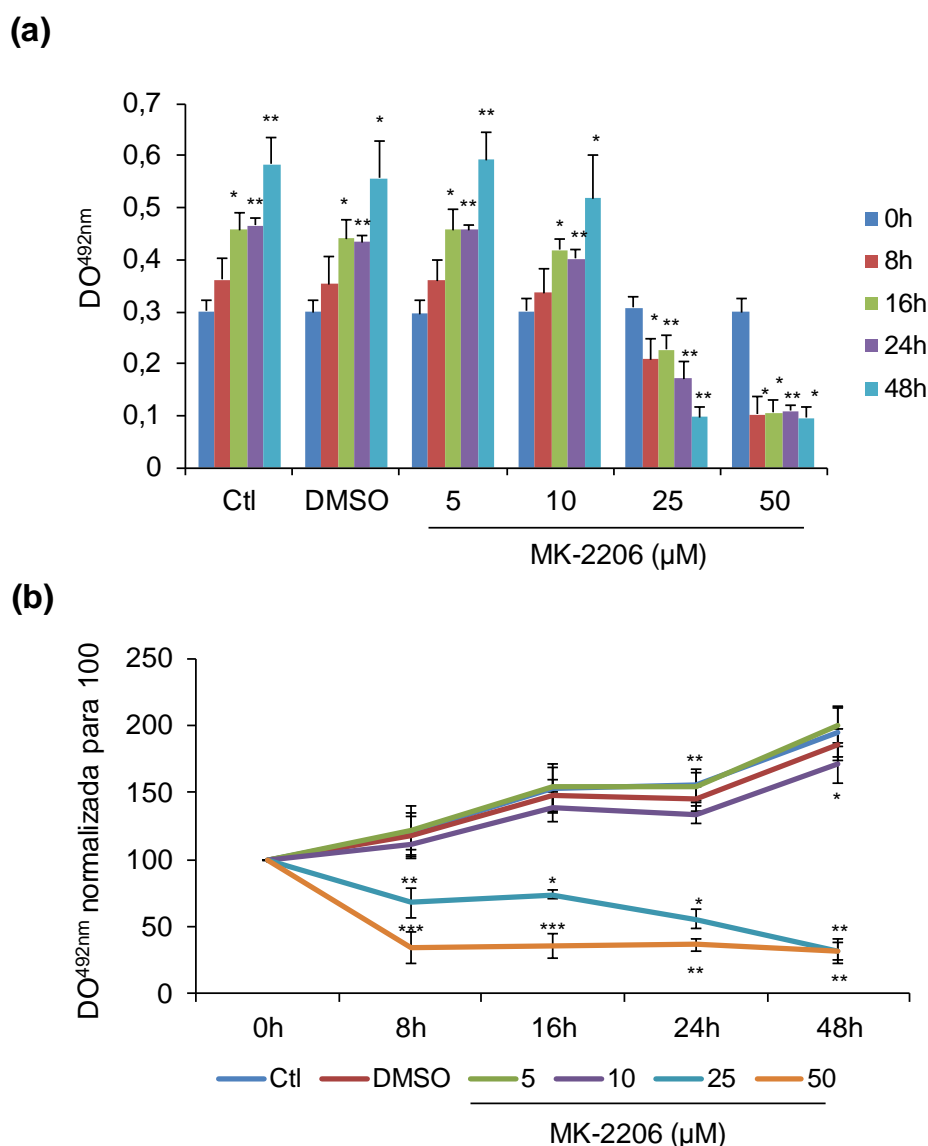
Em seguida, avaliamos o efeito da inibição farmacológica da fosforilação de AKT nos níveis proteicos endógenos de FOXK2 nas células MDA-MB-231. Para isso, as células foram tratadas com o LY294002, um inibidor da PI3K. Primeiramente, observamos que o tratamento com esse composto levou a uma redução nos níveis de fosforilação de AKT (**Figura 4.3**), o que indica uma diminuição, ao menos parcial, da sua atividade. A inibição da ativação de AKT acarretou apenas em uma redução discreta nos níveis proteicos de FOXK2 (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3 – O conteúdo proteico endógeno de FOXK2 é modulado mediante a inibição de AKT pelo LY294002.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com 30  $\mu$ M de LY294002 ou DMSO (veículo) por 1 h e foram coletadas para a análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total e  $\beta$ -actina foram avaliados. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e  $\beta$ -actina, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.

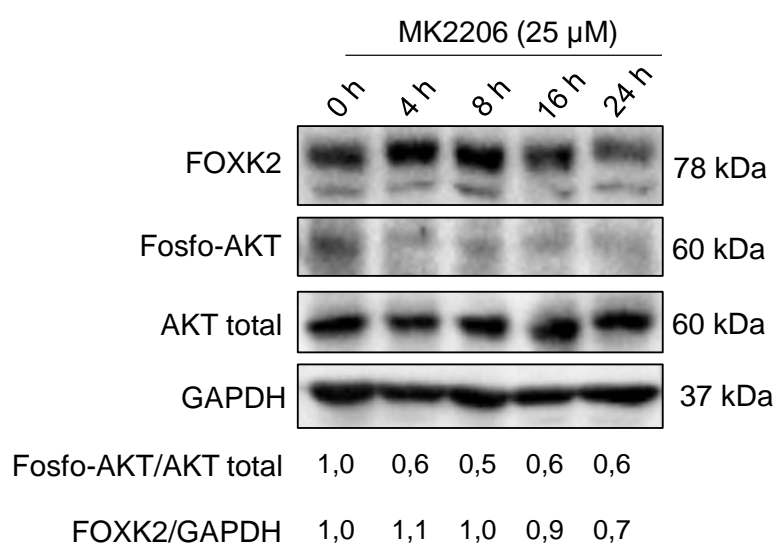
Diante dos resultados pouco expressivos na regulação dos níveis proteicos de FOXK2 mediante o uso do LY294002, possivelmente por esse não ser um modulador específico de AKT, utilizamos um inibidor específico da fosforilação de AKT, o MK-2206. Inicialmente, caracterizamos o perfil de toxicidade desse composto nas células MDA-MB-231, tratando-as com concentrações crescentes de MK-2206 por diferentes intervalos de tempo, determinados

com base na literatura. Por ensaio de MTT, observamos que as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  do MK-2206 não apresentaram uma citotoxicidade pronunciada (**Figura 4.4a**), comparativamente ao controle e ao DMSO, porém as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  apresentaram uma redução significativa da viabilidade para as células MDA-MB-231 (**Figura 4.4a**). Analisando esses mesmos dados ao longo de uma cinética de tempo, verificamos que a concentração de 10  $\mu\text{M}$  do MK-2206 teve um efeito discreto no crescimento das células MDA-MB-231 (**Figura 4.4b**), enquanto as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  afetaram de forma bem mais pronunciada o crescimento celular ao longo do tempo (**Figura 4.4b**).



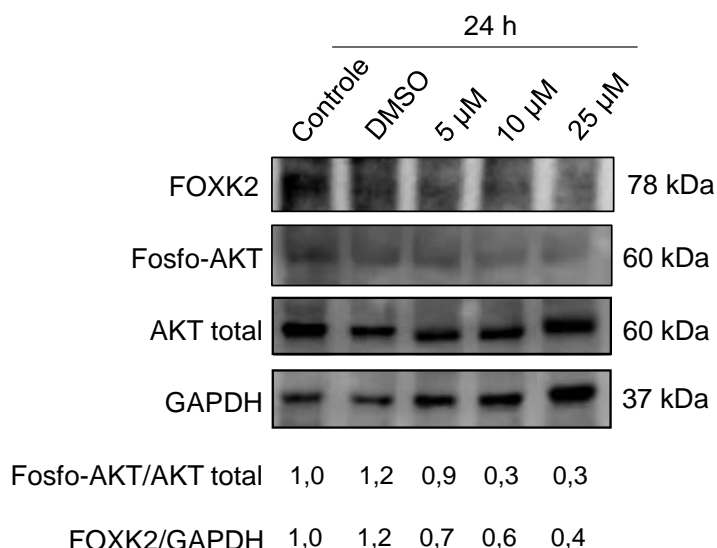
**Figura 4.4 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 promove sensibilidade às células MDA-MB-231.** (a) As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com concentrações crescentes de MK-2206 pelos tempos indicados. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. (b) As células tratadas tiveram as densidades óticas lidas em 492 nm, normalizadas para 100 e comparadas quanto à citotoxicidade do MK-2206 pelo ensaio de MTT. As barras representam média  $\pm$  s.d. de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student (*two-sided*; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; significativo).

A partir desses resultados, utilizamos a concentração de 25  $\mu\text{M}$  do MK-2206, a menor concentração que induziu toxicidade nas nossas células, para avaliar o efeito da inibição da atividade de AKT no conteúdo proteico de FOXK2 ao longo de uma cinética de tempo. Assim, observamos que o tratamento com 25  $\mu\text{M}$  do MK-2206 inibiu a fosforilação de AKT desde os tempos mais precoces até o tempo mais tardio de 24 h (**Figura 4.5**). Por outro lado, observamos uma redução no padrão de bandas de FOXK2 mediante a inibição da atividade de AKT com o MK-2206 nos tempos mais tardios, com um efeito em 16 h, mas principalmente em 24 h (**Figura 4.5**).



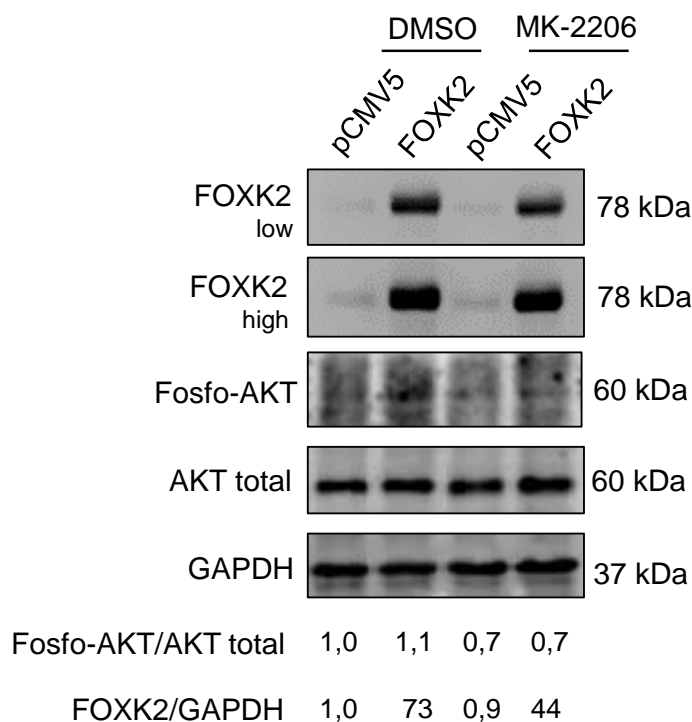
**Figura 4.5 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 altera os níveis proteicos endógenos de FOXK2.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com DMSO (veículo; ponto de 0 h) ou 25  $\mu\text{M}$  de MK-2206 pelos tempos indicados e, então, foram coletadas para a análise dos níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total e GAPDH por Western blotting. O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e GAPDH, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.

Em seguida, avaliamos se o conteúdo proteico de FOXK2 já era modulado com menores concentrações de MK-2206, incluindo as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  que foram utilizadas no ensaio de citotoxicidade. Assim, observamos uma redução da fosforilação de AKT em todas as concentrações de MK-2206, mas especialmente nos tratamentos com 10 e 25  $\mu\text{M}$  do composto (**Figura 4.6**). Ao mesmo tempo, verificamos que houve uma redução no padrão de bandas de FOXK2 mediante a inibição da atividade de AKT com 5 e 10  $\mu\text{M}$  de MK-2206, mas particularmente com 25  $\mu\text{M}$  desse composto (**Figura 4.6**), o que reforça nossos achados anteriores.



**Figura 4.6 – A inibição farmacológica de AKT pelo MK-2206 modula o conteúdo proteico endógeno de FOXX2.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com DMSO (veículo), 5, 10 e 25 µM de MK-2206 por 24 h e, então, foram coletadas para a análise dos níveis de FOXX2, fosfo-AKT, AKT total e GAPDH por Western blotting. O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXX2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e GAPDH, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.

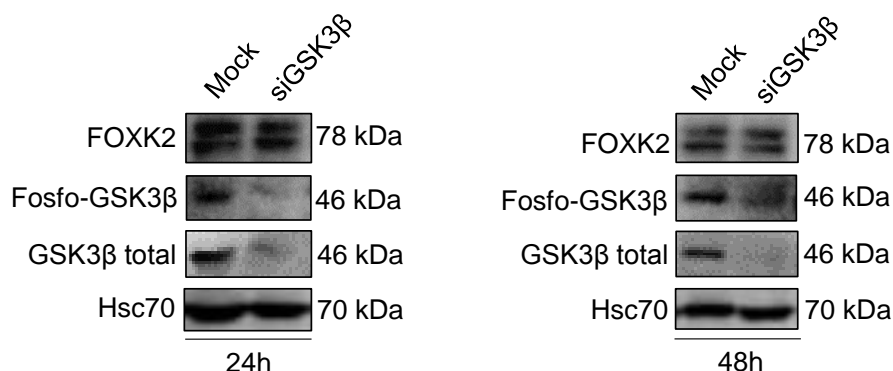
A fim de investigar o efeito da inibição farmacológica de AKT nos níveis proteicos exógenos de FOXX2, combinamos a superexpressão de FOXX2 à inibição da ativação de AKT pelo MK-2206. A partir desse desenho experimental, observamos que o conteúdo proteico exógeno de FOXX2 também é modificado após a inibição farmacológica de AKT, ocorrendo uma redução das bandas de menor mobilidade de FOXX2 (**Figura 4.7**). Vale ressaltar que a inibição da fosforilação de AKT pelo MK-2206 não foi tão pronunciada nesse ensaio (**Figura 4.7**), o que pode ter contribuído para os efeitos mais sutis na modulação dos níveis proteicos exógenos de FOXX2, comparados aos obtidos mediante a inibição gênica de AKT. Esses achados sugerem que o conteúdo proteico endógeno e exógeno de FOXX2 pode ser modulado por AKT em células quimiorresistentes de câncer de mama, reforçando a hipótese do estudo.



**Figura 4.7 – Os níveis proteicos exógenos de FOXK2 são modificados após a inibição farmacológica de AKT com MK-2206.** Após 24 h de adesão, as células MDA-MB-231 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) e foram tratadas com DMSO (veículo) ou 10  $\mu$ M de MK-2206. Após 24 h, as células foram coletadas para análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total e GAPDH foram avaliados. O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e GAPDH, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de dois experimentos independentes.

### 4.3. A inibição gênica de GSK3 $\beta$ , alvo clássico de fosforilação por AKT, não modula os níveis proteicos de FOXK2

Dados da literatura mostram que GSK fosforila os fatores FOXK, o que está associado a reprogramações metabólicas (HE *et al.*, 2018; SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Considerando que GSK é um alvo conhecido de fosforilação por AKT (MANNING & TOKER, 2017; HOXHAJ & MANNING, 2020), nos questionamos se a regulação de FOXK2 por AKT poderia ser um efeito indireto, mediado por GSK. Diante disso, investigamos se GSK3 $\beta$  modularia FOXK2 no nosso modelo, através da avaliação do efeito da inibição gênica de GSK3 $\beta$  por RNA de interferência nos níveis proteicos de FOXK2 em células MDA-MB-231. Sendo assim, observamos que a expressão de GSK3 $\beta$  foi inibida, tanto em 24 quanto em 48 h após a transfecção (**Figura 4.8**), porém a inibição de GSK3 $\beta$  não modulou o conteúdo proteico de FOXK2 (**Figura 4.8**), sugerindo que essa quinase possivelmente não regula FOXK2 no nosso modelo.

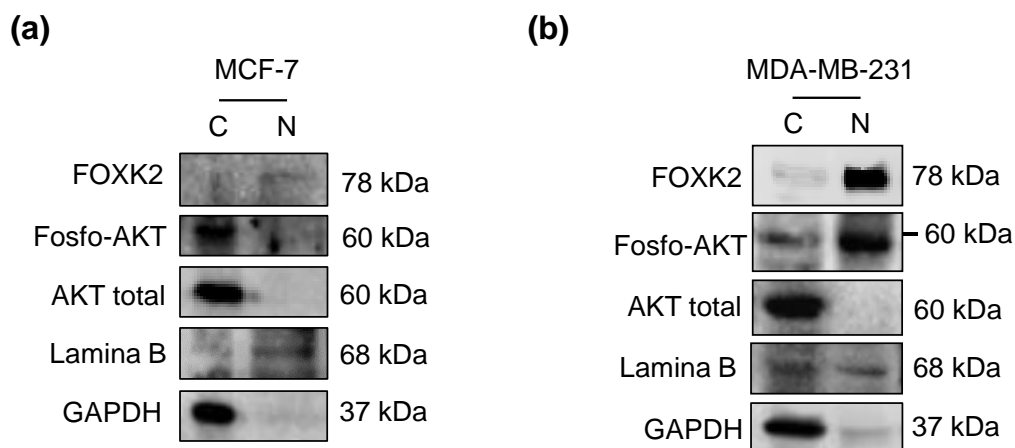


**Figura 4.8 – O conteúdo proteico de FOXK2 não é modulado mediante a inibição gênica de GSK3β.** As células MDA-MB-231 foram transfectadas com siRNA para GSK3β ou expostas à condição ‘Mock’: todos os reagentes de transfecção, exceto RNAs. Após 24 e 48 h de incubação, as células foram coletadas para análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-GSK3β, GSK3β total e Hsc70 foram avaliados. A Hsc70 foi utilizada como controle constitutivo. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

#### 4.4. A localização nuclear de AKT fosforilada está associada ao perfil de maior resistência aos quimioterápicos

Alguns estudos demonstram que a localização subcelular dos fatores FOXK pode ser modulada por modificações pós-traducionais, tanto através de fosforilações mediadas direta ou indiretamente por mTOR (BOWMAN *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018; SAKAGUCHI *et al.*, 2019), quanto por fosforilações reguladas pela via de ATM-CHK2 (CHEN *et al.*, 2020). Dessa forma, avaliamos se a inibição de AKT teria um impacto não apenas nos níveis proteicos, como também na localização subcelular de FOXK2 em células de câncer de mama. Primeiramente, realizamos um fracionamento subcelular para caracterizar o perfil de localização de AKT e FOXK2 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. Com isso, observamos que FOXK2 está localizada predominantemente no núcleo de ambas as linhagens (**Figura 4.9a** e **Figura 4.9b**), o que corrobora os achados da literatura para esse fator de transcrição. Por outro lado, observamos um padrão de expressão subcelular diferencial para AKT fosforilada. Enquanto as células MCF-7 apresentam maiores níveis de AKT fosforilada e AKT total no compartimento citoplasmático (**Figura 4.9a**), as células MDA-MB-231 possuem maiores níveis de AKT fosforilada no núcleo, diferente do perfil observado para sua forma total (**Figura 4.9b**). Esses resultados reforçam que AKT fosforilada pode translocar para os diferentes compartimentos da célula para regular diferencialmente os seus substratos. De forma ainda mais interessante, esses achados indicam que FOXK2 e AKT fosforilada encontram-se predominantemente no mesmo compartimento subcelular das células MDA-MB-231, diferentemente do perfil observado para a linhagem quimiossensível MCF-7. Logo, esses dados sugerem que AKT e FOXK2 estão

localizadas no núcleo de células resistentes a drogas, o que favorece a hipótese de que essas proteínas possam interagir para contribuir para a quimiorresistência.

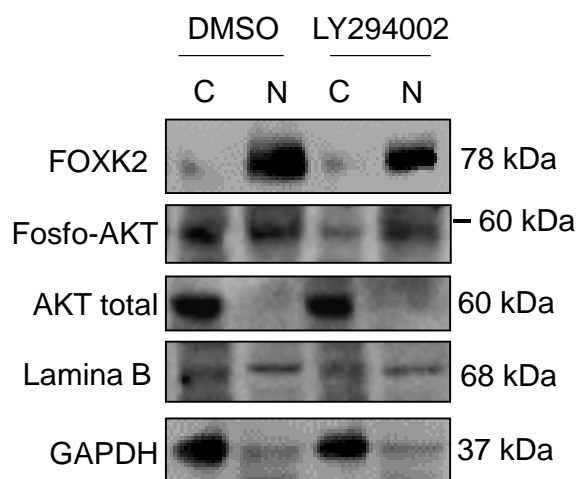


**Figura 4.9 – O perfil de localização subcelular de FOXK2 e AKT se apresenta diferencial em células MCF-7 e MDA-MB-231.** As células MCF-7 (a) e MDA-MB-231 (b) tiveram suas frações citoplasmáticas e nucleares separadas pelo kit NE-PER (Thermoscientific) e os níveis proteicos de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total, GAPDH e Lamina B foram avaliados por Western blotting. A Lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto o GAPDH foi utilizado como controle constitutivo citoplasmático. As figuras são representativas de três experimentos independentes. C: Citoplasma; N: Núcleo.

#### **4.5. A inibição farmacológica de AKT não modula a localização subcelular de FOXK2 em células quimiorresistentes**

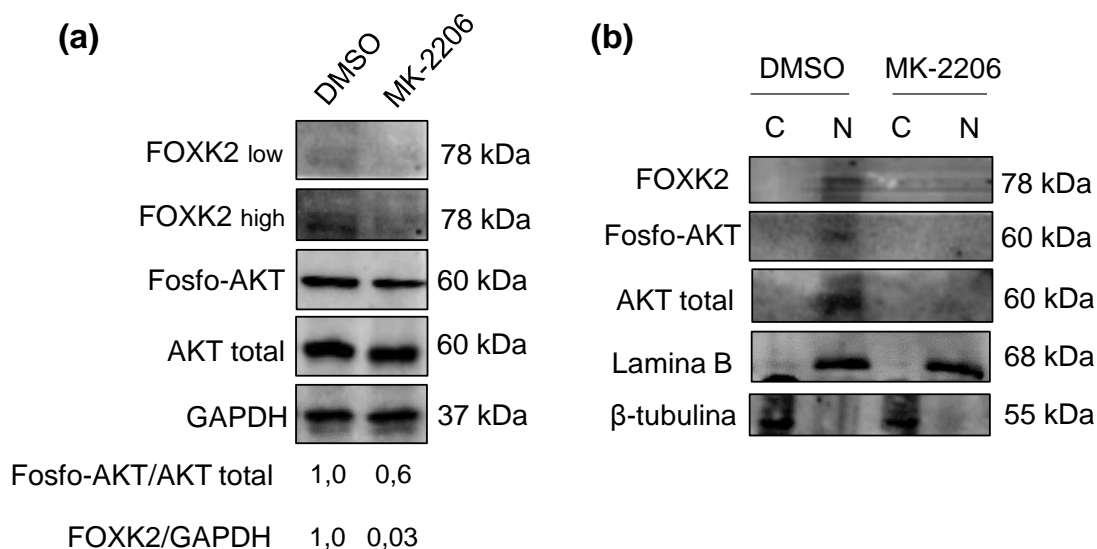
Após a caracterização da localização subcelular das proteínas em estudo nos nossos modelos experimentais, tratamos as células quimiorresistentes MDA-MB-231 com LY29002 e realizamos o fracionamento subcelular, para verificar se a inibição da ativação de AKT poderia modular a localização subcelular de FOXK2. Inicialmente, observamos que o tratamento com LY29002 reduziu os níveis de fosforilação de AKT (**Figura 4.10**), indicando uma inibição, ao menos parcial, da sua atividade. Embora tenha ocorrido uma diminuição nos níveis proteicos de FOXK2 (**Figura 4.10**), como nos nossos resultados anteriores, o tratamento com LY294002 não modulou a localização subcelular desse fator de transcrição (**Figura 4.10**), indicando que a fosforilação de AKT não regula a translocação núcleo-citoplasma de FOXK2 no nosso modelo.





**Figura 4.10 – A localização subcelular de FOXK2 não é modulada após a inibição de AKT pelo LY294002 em células MDA-MB-231.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com 30  $\mu$ M de LY294002 ou DMSO (veículo) por 1 h e foram coletadas para a análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total, GAPDH e Lamina B foram avaliados nos extratos proteicos fracionados. A Lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto o GAPDH foi utilizado como controle constitutivo citoplasmático. A figura é representativa de três experimentos independentes. C: Citoplasma; N: Núcleo.

Posteriormente, avaliamos se o tratamento com MK-2206, inibidor específico de AKT, poderia modular a localização subcelular de FOXK2. Primeiramente, confirmamos que o tratamento com MK-2206 reduziu os níveis de fosforilação de AKT e modulou os níveis proteicos de FOXK2 (**Figura 4.11a**). Apesar de ter ocorrido uma diminuição no conteúdo proteico de FOXK2 (**Figura 4.11b**), o tratamento com MK-2206 não modulou a localização subcelular desse fator de transcrição (**Figura 4.11b**). Ao mesmo tempo, o tratamento com esse composto também levou a uma redução dos níveis de AKT total (**Figura 4.11b**), o que pode ter ocorrido por uma diminuição nos níveis proteicos totais devido à morte celular induzida pelo tratamento. Esses achados sugerem, por duas abordagens distintas de inibição farmacológica, que a ativação de AKT não modula a translocação núcleo-citoplasma de FOXK2 no nosso modelo.

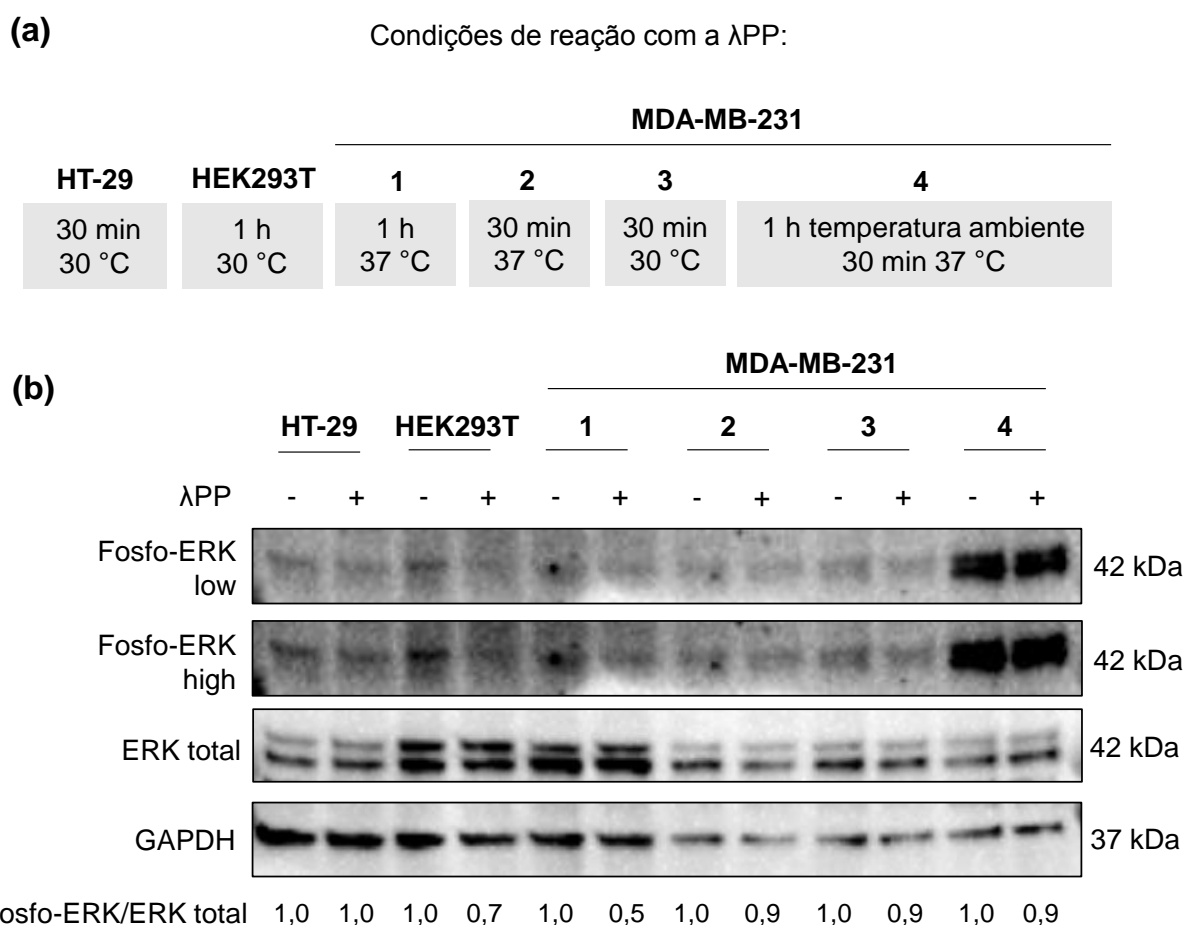


**Figura 4.11 – A localização subcelular de FOXK2 não é modulada após a inibição de AKT pelo MK-2206 em células MDA-MB-231.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com 25  $\mu$ M de MK-2206 ou DMSO (veículo) por 24 h e foram coletadas para análise por Western blotting dos extratos proteicos totais (a) e fracionados (b), onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total, GAPDH, Lamina B e  $\beta$ -tubulina foram avaliados. O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo para os extratos totais. Para os extratos fracionados, a Lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto a  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle constitutivo citoplasmático. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e GAPDH, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. As figuras são representativas de três experimentos independentes. C: Citoplasma; N: Núcleo.

#### 4.6. O tratamento com a lambda-fosfatase modula os níveis proteicos de FOXK2 nas células quimiorresistentes

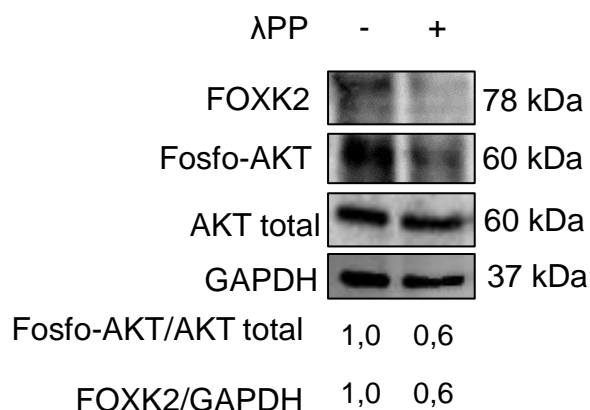
Para avaliar mudanças no perfil de bandas de FOXK2 que sejam características de fosforilação, realizamos o tratamento dos extratos proteicos das células MDA-MB-231 com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP), uma enzima que remove os grupamentos fosfato de proteínas fosforiladas. Inicialmente, realizamos a padronização do tratamento com as seguintes linhagens celulares: HEK293T, HT-29 e MDA-MB-231, seguindo diferentes protocolos de reação da  $\lambda$ PP disponíveis na literatura (Figura 4.12a). Nesse experimento, utilizamos os níveis de fosforilação de ERK como um marcador para a atividade da  $\lambda$ PP e verificamos que o tratamento com a enzima levou a uma redução nos níveis de fosforilação de ERK no protocolo de reação de 1 h a 30 °C com a linhagem HEK293T, assim como no protocolo de reação de 1 h a 37 °C nas células MDA-MB-231 submetidas à sonicação (Figura 4.12b). Logo, para a realização dos próximos experimentos com a linhagem MDA-MB-231, escolhemos o protocolo 1: reação da  $\lambda$ PP por 1 h a 37 °C, com prévia extração proteica por sonicação.

Posteriormente, realizamos o tratamento dos extratos proteicos das células MDA-MB-231 com a  $\lambda$ PP, seguindo o protocolo definido na padronização e avaliamos os níveis proteicos de FOXK2. Utilizando a AKT fosforilada como um marcador para a atividade enzimática, observamos que o tratamento com a  $\lambda$ PP reduziu os níveis de fosforilação de AKT (**Figura 4.13**), o que indica que a enzima está desempenhando sua função de remover os grupamentos fosfato. De forma interessante, verificamos que houve uma redução no padrão de bandas de FOXK2 mediante o tratamento com a  $\lambda$ PP (**Figura 4.13**), o que sugere que FOXK2 tem os seus níveis proteicos regulados, pelo menos em parte, por fosforilação em nosso modelo celular de câncer de mama



**Figura 4.12 – Padronização do tratamento com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP).** Os extratos proteicos das linhagens indicadas foram preparados através da lise das células em Triton Lysis Buffer (TLB), com exceção do pellet 1 das células MDA-MB-231, cujas proteínas foram extraídas por sonicção com TLB e NEBuffer para metalofosfatases (PMP). Para cada amostra, 100  $\mu$ g de proteína foram incubadas em um total de 50  $\mu$ L, contendo 400 unidades de  $\lambda$ PP, 1x PMP e 1mM de MnCl<sub>2</sub>. Um controle pareado sem a adição da enzima foi realizado para cada pellet. As condições de reação com a  $\lambda$ PP estão indicadas na figura (a). Ao final, os níveis de fosfo-ERK, ERK total e GAPDH foram avaliados por Western blotting (b). O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-ERK foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, ERK total. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.

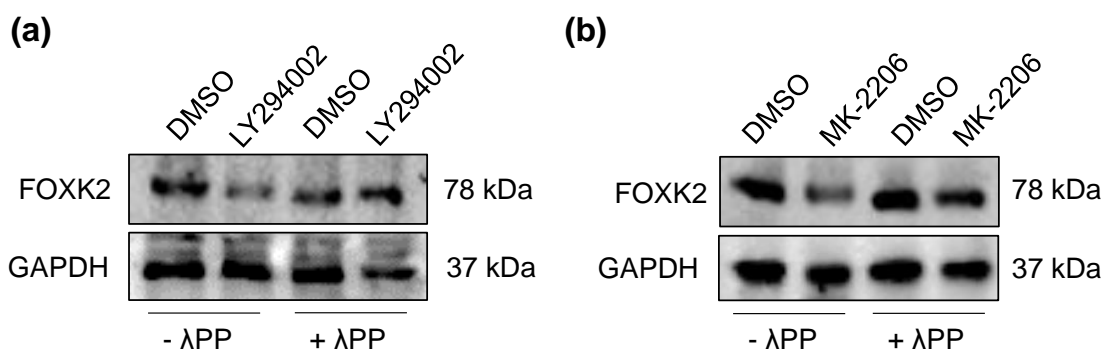
## MDA-MB-231



**Figura 4.13 – O conteúdo proteico de FOXK2 é alterado mediante o tratamento com a lambda-fosfatase ( $\lambda$ PP).** Os extratos proteicos das células MDA-MB-231 foram preparados por sonicação com TLB e NEBuffer para metalofosfatases (PMP). Em seguida, 100  $\mu$ g de proteína foram incubadas em um total de 50  $\mu$ L, contendo 400 unidades de  $\lambda$ PP, 1x PMP e 1mM de MnCl<sub>2</sub>. Um controle pareado sem a adição da enzima também foi realizado. A reação com a  $\lambda$ PP ocorreu por 1 h a 37 °C. Ao final, os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total e GAPDH foram avaliados por Western blotting. GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. Os níveis proteicos relativos de fosfo-AKT e FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, AKT total e GAPDH, respectivamente. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. A figura é representativa de três experimentos independentes.

### 4.7. O tratamento com a lambda-fosfatase altera o padrão de mobilidade de FOXK2 em células MDA-MB-231 expostas aos inibidores farmacológicos de AKT

Para verificar se a modulação nos níveis proteicos de FOXK2 mediada por AKT é dependente de fosforilação, combinamos as abordagens de inibição farmacológica de AKT ao tratamento com a  $\lambda$ PP. Primeiramente, confirmamos que o conteúdo proteico de FOXK2 é modificado mediante a inibição de AKT pelo LY294002 (**Figura 4.14a**) e pelo MK-2206 (**Figura 4.14b**). De maneira interessante, o tratamento com a  $\lambda$ PP altera o perfil de mobilidade da banda de FOXK2, que migra um pouco mais rapidamente no gel (**Figuras 4.14a e 4.14b**), denotando a remoção dos grupos fosfato pela enzima. Além disso, na presença da enzima, o efeito da inibição de AKT nos níveis proteicos de FOXK2 é amenizado em ambos os tratamentos (**Figuras 4.14a e 4.14b**). Esses dados indicam que a modulação do conteúdo proteico de FOXK2 mediada pela inibição de AKT é possivelmente dependente de fosforilação, o que corrobora a hipótese desse estudo.

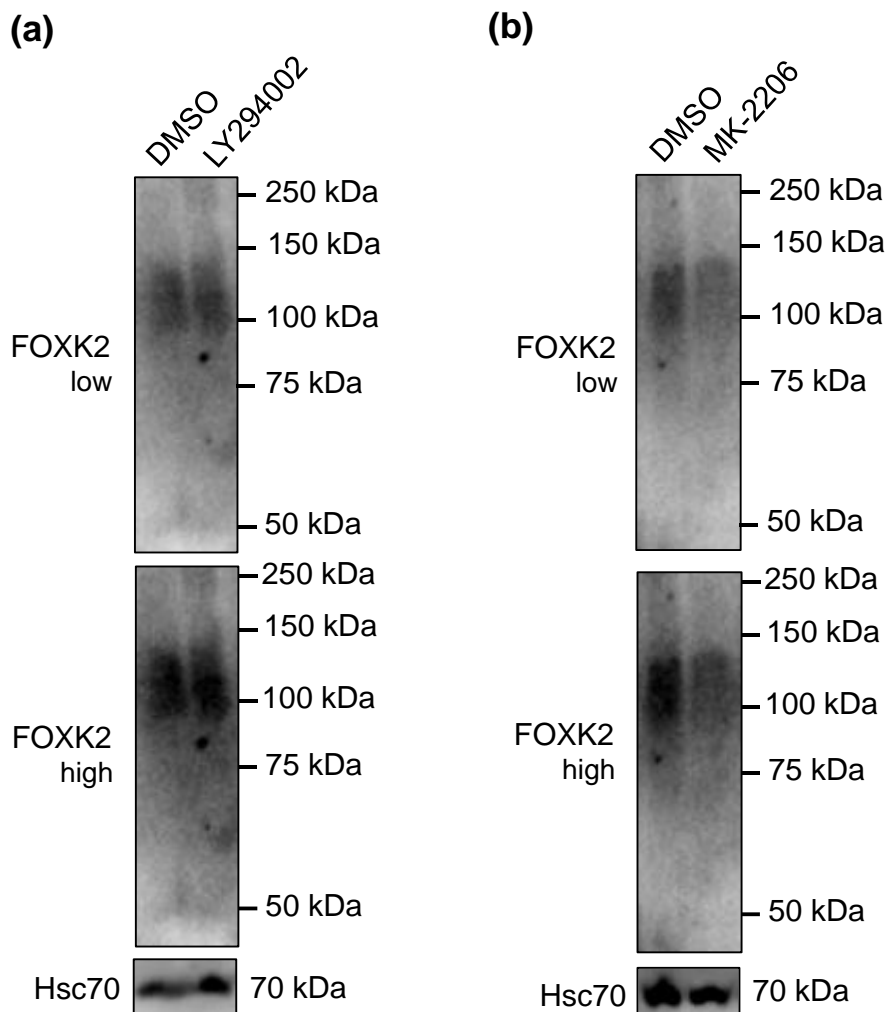


**Figura 4.14 – O tratamento com a lambda-fosfatase altera o perfil de mobilidade de FOXK2 em células inibidas para AKT.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com 30 μM de LY294002 ou DMSO (veículo) por 1 h (a) ou 25 μM de MK-2206 ou DMSO (veículo) por 24 h (b). Os extratos proteicos foram preparados por sonicação com TLB e NEBuffer para metalofosfatases (PMP) e, então, 100 μg de proteína foram incubadas em um total de 50 μL, contendo 400 unidades de λPP, 1x PMP e 1mM de MnCl<sub>2</sub>. Um controle pareado sem a adição da enzima também foi realizado. A reação com a λPP ocorreu por 1 h a 37 °C. Ao final, os níveis de FOXK2 e GAPDH foram avaliados por Western blotting. O GAPDH foi utilizado como controle constitutivo. As figuras são representativas de um único experimento.

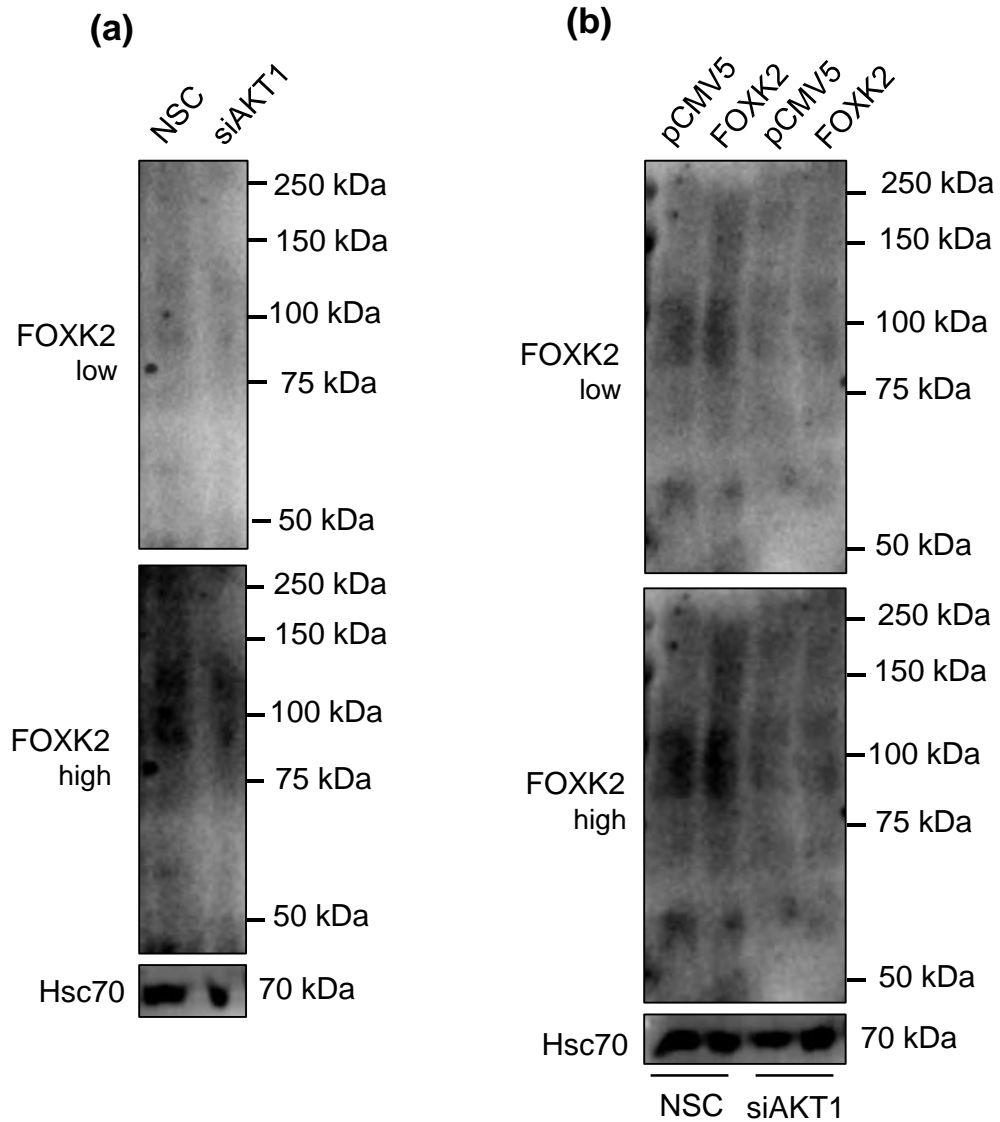
#### 4.8. O conteúdo proteico de FOXK2 em gel Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE é modificado mediante inibição e superexpressão de AKT

Diante dos nossos resultados de modulação dos níveis proteicos de FOXK2 mediante as manipulações de AKT e tratamento com a λPP, inibimos e superexpressamos AKT novamente nas células MCF-7 e MDA-MB-231, porém, nesse ensaio, investigamos o padrão de mobilidade das bandas de FOXK2 em gel Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE, um gel de poliacrilamida com tags para proteínas fosforiladas (Phos-tag). Considerando o peso molecular predito de 78 kDa, primeiramente observamos que FOXK2 migra com uma mobilidade reduzida no gel Phos-tag (**Figuras 4.15, 4.16 e 4.17**), sugerindo que essa proteína pode ser regulada por fosforilação. Em seguida, observamos que o tratamento com o LY294002 promove um *shift* nas bandas de menor mobilidade de FOXK2 (**Figura 4.15a**), indicando que FOXK2 tem sua fosforilação reduzida e migra com maior mobilidade no gel mediante a inibição de AKT. Por outro lado, mediante a inibição farmacológica de AKT com o MK-2206 (**Figura 4.15b**), bem como a sua inibição gênica (**Figura 4.16**), verificamos um padrão de inibição global das bandas de FOXK2, com redução de bandas com diferentes perfis de mobilidade. Esses achados podem sugerir que as proteínas FOXK2 podem ter diferentes sítios-alvo de fosforilação, ocupados por quantidades distintas de grupamentos fosfato, cuja remoção implica em um padrão de modulação global tanto das bandas de menor, quanto das de maior mobilidade. De forma interessante, verificamos um aumento no padrão de bandas de mobilidade reduzida de FOXK2 mediante a superexpressão de AKT constitutivamente ativa (myrAKT) nas células MCF-7 (**Figura 4.17**). Em conjunto, esses dados indicam que FOXK2 pode ser modulada por fosforilação mediada

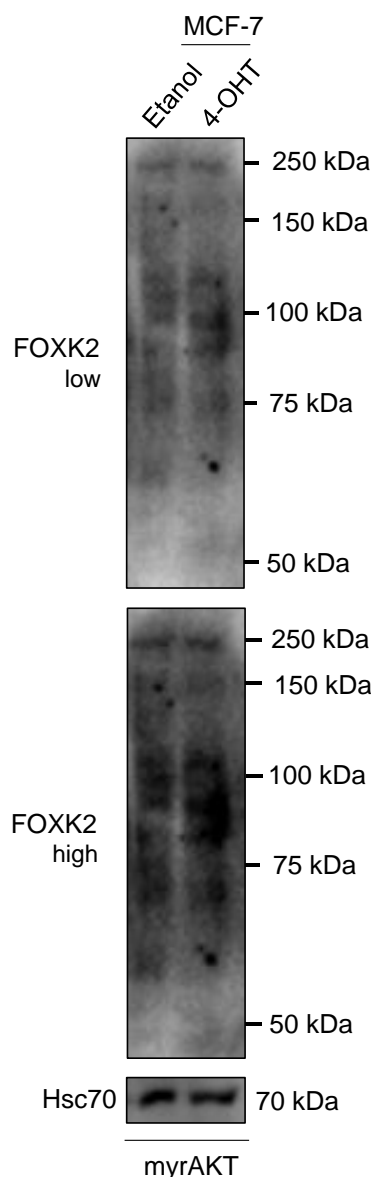
por AKT, possivelmente em diferentes sítios-alvo e com um perfil diferencial de adição de grupamentos fosfato por molécula.



**Figura 4.15 – A mobilidade das bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é alterada após a inibição farmacológica de AKT pelo LY294002 e pelo MK-2206.** As células MDA-MB-231 foram tratadas com 30  $\mu$ M de LY294002 ou DMSO (veículo) por 1 h (a) e 25  $\mu$ M de MK-2206 ou DMSO (b) por 24 h e, então, foram coletadas para a análise por Western blotting em gel de poliacrilamida Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE, onde os níveis de FOXK2 e Hsc70 foram avaliados. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle constitutivo. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.



**Figura 4.16 – O perfil de bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é modulado de forma global pela inibição gênica de AKT.** As células MDA-MB-231 foram transfectadas com *non-silencing control* (NSC) e siRNA para AKT1. Após 72 h de transfecção, as células foram coletadas para análise por Western blotting em gel de poliacrilamida Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE (a). Alternativamente, as células inibidas para AKT por 48h foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) (b). As células foram coletadas para a análise por Western blotting em gel de poliacrilamida Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE, onde os níveis de FOXK2 e Hsc70 foram avaliados. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle constitutivo. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.



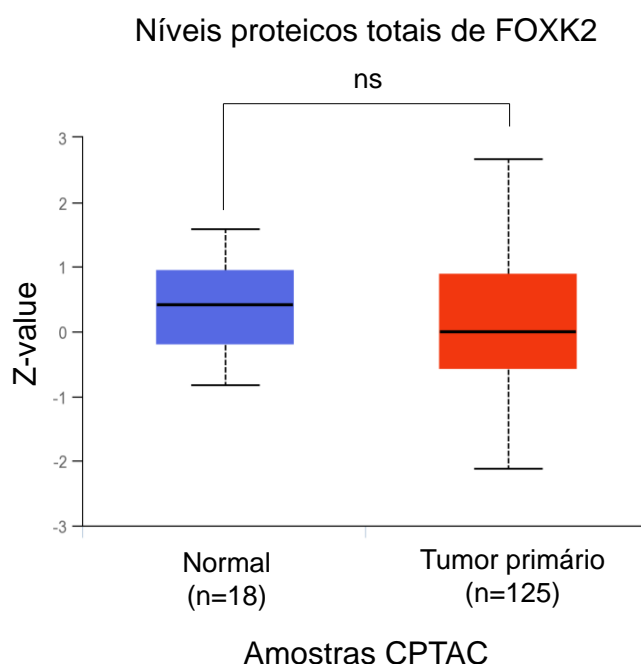
**Figura 4.17 – O perfil de bandas de FOXK2 em gel Phos-tag é modulado após a superexpressão de AKT.** As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER. Após 24 h, as células foram tratadas com etanol (veículo) ou 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) por 24 h. Ao final, as células foram coletadas para a análise por Western blotting em gel de poliacrilamida Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE, onde os níveis de FOXK2 e Hsc70 foram avaliados. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle constitutivo. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

#### **4.9. Os níveis de fosforilação de FOXK2 são encontrados elevados em amostras de pacientes com câncer de mama**

A partir dos achados de modulação dos níveis proteicos de FOXK2 mediante o tratamento com a  $\lambda$ PP nas células MDA-MB-231, avaliamos o perfil de fosforilação desse fator de transcrição em amostras de pacientes com câncer de mama. Através do portal online UALCAN, analisamos os dados proteômicos e fosfoproteômicos do consórcio CPTAC, comparando amostras de tecido tumoral (n=125) e não-tumoral (n=18). Primeiramente,

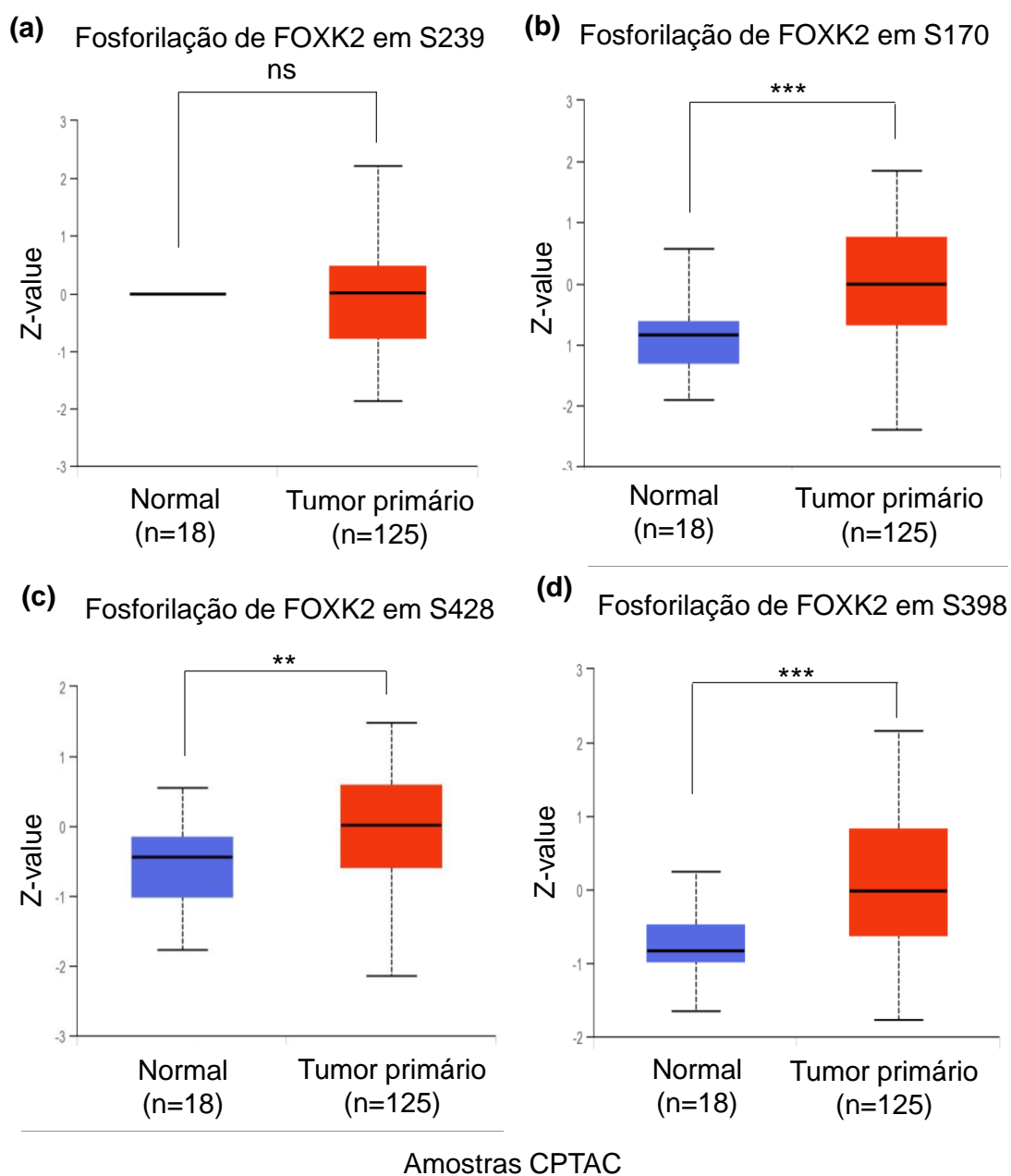


avaliamos o conteúdo proteico total de FOXK2 e observamos que não há diferença significativa nos níveis proteicos totais de FOXK2 entre as amostras de tumores primários de mama e as amostras de tecido normal (**Figura 4.18**).



**Figura 4.18 – Níveis proteicos totais de FOXK2 em amostras de tecido normal e amostras de câncer de mama.** Análise do conteúdo proteico total de FOXK2 em amostras de tumores primários de câncer de mama (n=125) e amostras de tecido normal adjacente ao tumor (n=18), utilizando dados do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC), através da ferramenta UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>). A expressão diferencial entre os grupos foi avaliada por teste t, usando valores transformados em log (base 2). ns: não significativo.

Por outro lado, ao avaliarmos os níveis proteicos de FOXK2 fosforilada, identificamos alguns sítios diferencialmente expressos entre os tecidos tumorais e não-tumorais. Com exceção da serina 239 (S239) (**Figura 4.19a**), encontramos os sítios de fosforilação em FOXK2 serina 170 (S170) (**Figura 4.19b**), serina 428 (S428) (**Figura 4.19c**) e serina 398 (S398) (**Figura 4.19d**) mais expressos nos tumores primários de mama em relação aos tecidos normais. Em conjunto, esses achados sugerem que FOXK2 pode ser modulada por fosforilações em diferentes sítios-alvo nos tumores de mama.

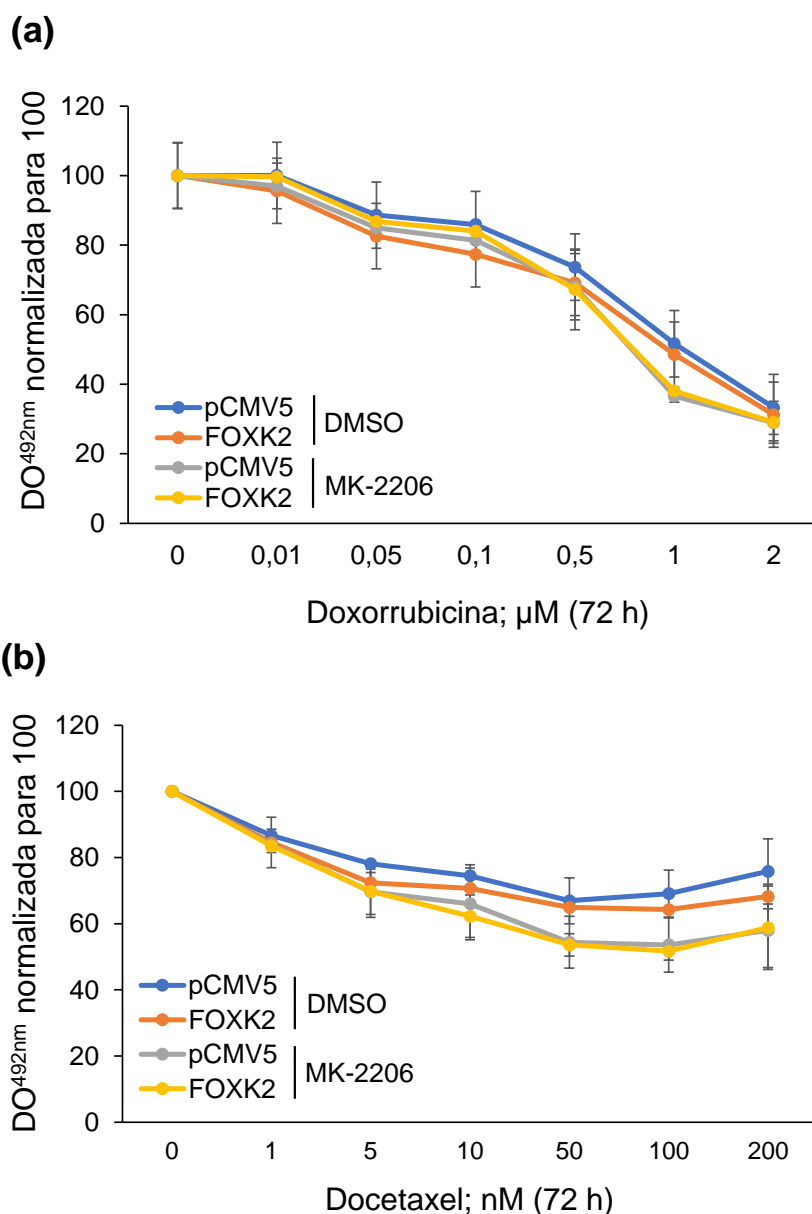


**Figura 4.19 – Níveis proteicos de FOXK2 fosforilada em amostras de tecido normal e amostras de câncer de mama.** Análise dos níveis de FOXK2 fosforilada na serina (S239) (a), serina 170 (S170) (b), serina 428 (S428) (c) e serina 398 (S398) (d) em amostras de tumores primários de câncer de mama (n=125) e amostras de tecido normal adjacente ao tumor (n=18), utilizando dados do *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC)*, através da ferramenta UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>). A expressão diferencial entre os grupos foi avaliada por teste t, usando valores transformados em log (base 2). ns: não significativo. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; significativo.

#### 4.10. A inibição de AKT pelo MK-2206 sensibiliza as células MDA-MB-231 aos quimioterápicos

Considerando a hipótese desse estudo, a superexpressão de FOXK2 em conjunto com a inibição de AKT poderia sensibilizar as células quimiorresistentes ao tratamento com os fármacos. Dessa forma, realizamos a superexpressão de FOXK2 e a inibição de AKT com MK-

2206 nas células MDA-MB-231 e avaliamos a resposta celular ao tratamento quimioterápico. Considerando primeiramente os nossos dados obtidos com o ensaio de MTT, verificamos que as células que superexpressam FOXK2 apresentaram uma discreta sensibilidade à doxorrubicina (DOX) (**Figura 4.20a**) e ao docetaxel (DTX) (**Figura 4.20b**).

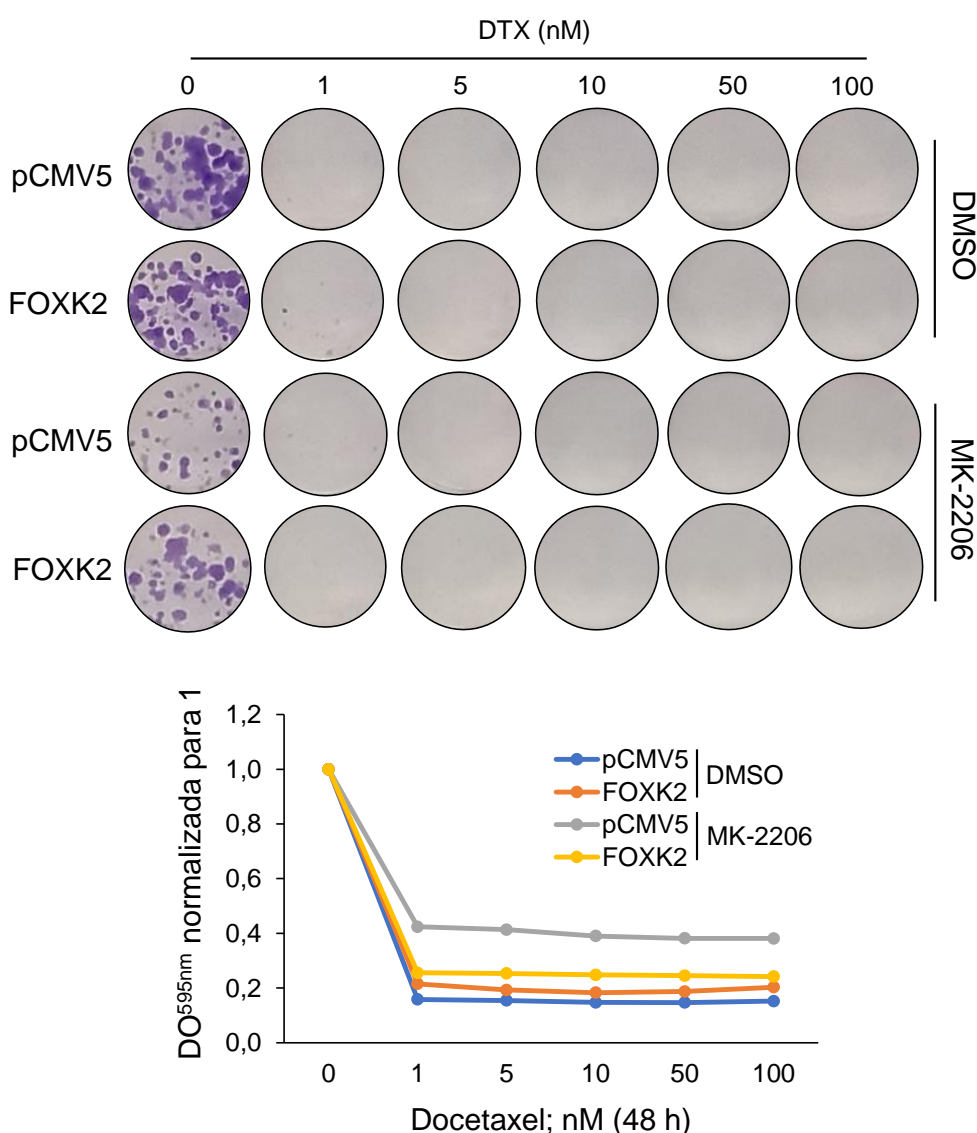


**Figura 4.20 – A inibição de AKT pelo MK-2206 sensibiliza as células MDA-MB-231 à doxorrubicina e ao docetaxel.** Após 24 h de adesão, as células MDA-MB-231 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) e foram tratadas com DMSO (veículo) ou 10 μM de MK-2206. Após 24 h, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com concentrações crescentes de doxorrubicina (DOX) e docetaxel (DTX) por 72 h. As densidades óticas foram obtidas a 492 nm, normalizadas para 100 e comparadas quanto à citotoxicidade dos quimioterápicos pelo ensaio de MTT. As barras representam média ± s.d. de dois experimentos independentes.

Já de forma um pouco mais proeminente, a inibição de AKT pelo MK-2206 sensibilizou as células ao tratamento com os quimioterápicos (**Figuras 4.20a e 4.20b**), particularmente ao

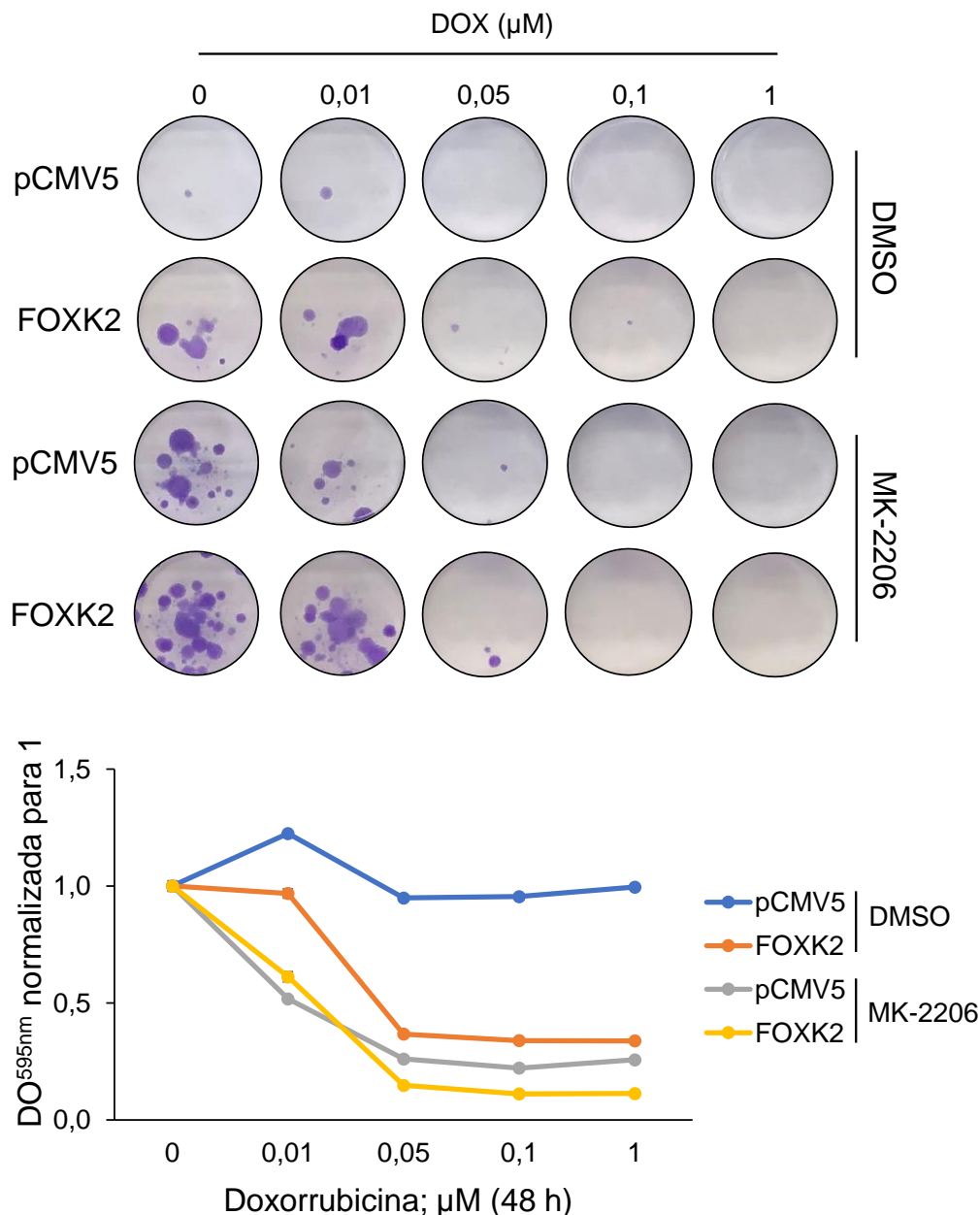
DTX nas concentrações de 50, 100 e 200 nM (**Figura 4.20b**). De forma interessante, o efeito na quimiossensibilidade mediado pelo tratamento com o MK-2206 não foi potencializado pela indução concomitante da superexpressão de FOXK2 (**Figuras 4.20a e 4.20b**).

Posteriormente, confirmamos esses dados por meio da avaliação da viabilidade celular a longo prazo. Através da análise dos resultados do ensaio clonogênico em células tratadas com DTX, verificamos que a formação de colônias foi muito inibida já nas menores concentrações do fármaco (**Figura 4.21**), o que dificultou as análises sobre o impacto do eixo AKT-FOXK2 na resposta ao quimioterápico em todas as condições experimentais.



**Figura 4.21 – O tratamento com docetaxel inibe de forma pronunciada a capacidade de formação de colônias das células MDA-MB-231, independentemente dos níveis de AKT e FOXK2.** As células MDA-MB-231 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) e foram tratadas com DMSO (veículo) ou 10  $\mu$ M de MK-2206. Após 24 h, as células foram plaqueadas em poços de 10  $\text{cm}^2$  e tratadas com concentrações crescentes de docetaxel (DTX) por 48 h. Então, as células foram cultivadas em meio fresco por cerca de 14 dias e coradas com cristal violeta. As densidades óticas foram obtidas a 595 nm, normalizadas para 1 e comparadas quanto à citotoxicidade do DTX pelo ensaio clonogênico. O gráfico é representativo de um único experimento.

Já ao avaliarmos os dados do ensaio clonogênico em células tratadas com DOX, verificamos que tanto a superexpressão de FOXK2, quanto o tratamento com o MK-2206 reduzem a capacidade de formação de colônias em resposta ao tratamento com o quimioterápico (Figura 4.22).

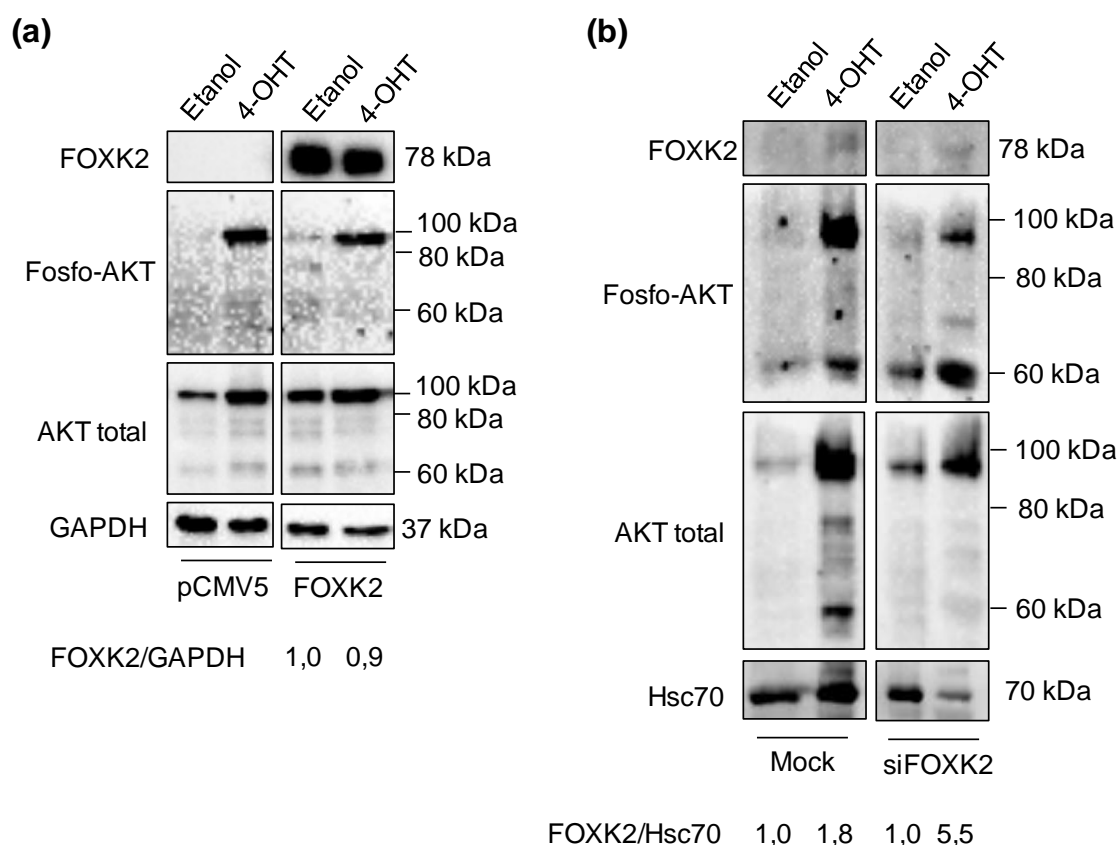


**Figura 4.22** – A combinação do tratamento com o MK-2206 e a superexpressão de FOXK2 sensibilizam as células MDA-MB-231 à doxorrubicina. As células MDA-MB-231 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) e foram tratadas com DMSO (veículo) ou 10  $\mu\text{M}$  de MK-2206. Após 24 h, as células foram plaqueadas em poços de 10  $\text{cm}^2$  e tratadas com concentrações crescentes de doxorrubicina (DOX) por 48 h. Então, as células foram cultivadas em meio fresco por cerca de 14 dias e coradas com cristal violeta. As densidades óticas foram obtidas a 595 nm, normalizadas para 1 e comparadas quanto à citotoxicidade da DOX pelo ensaio clonogênico. O gráfico é representativo de um único experimento.

De forma interessante, dentre as células inibidas para AKT, aquelas que superexpressam FOXK2 possuem uma capacidade ainda menor de formação de colônias mediante o tratamento com DOX, particularmente nas concentrações de 0,05, 0,1 e 1  $\mu$ M (**Figura 4.22**). Esses achados indicam que a superexpressão de FOXK2 pode ressensibilizar as células inibidas para AKT à DOX, o que sugere que a modulação combinada desse eixo de regulação pode ter um impacto na sensibilidade ao quimioterápico a longo prazo.

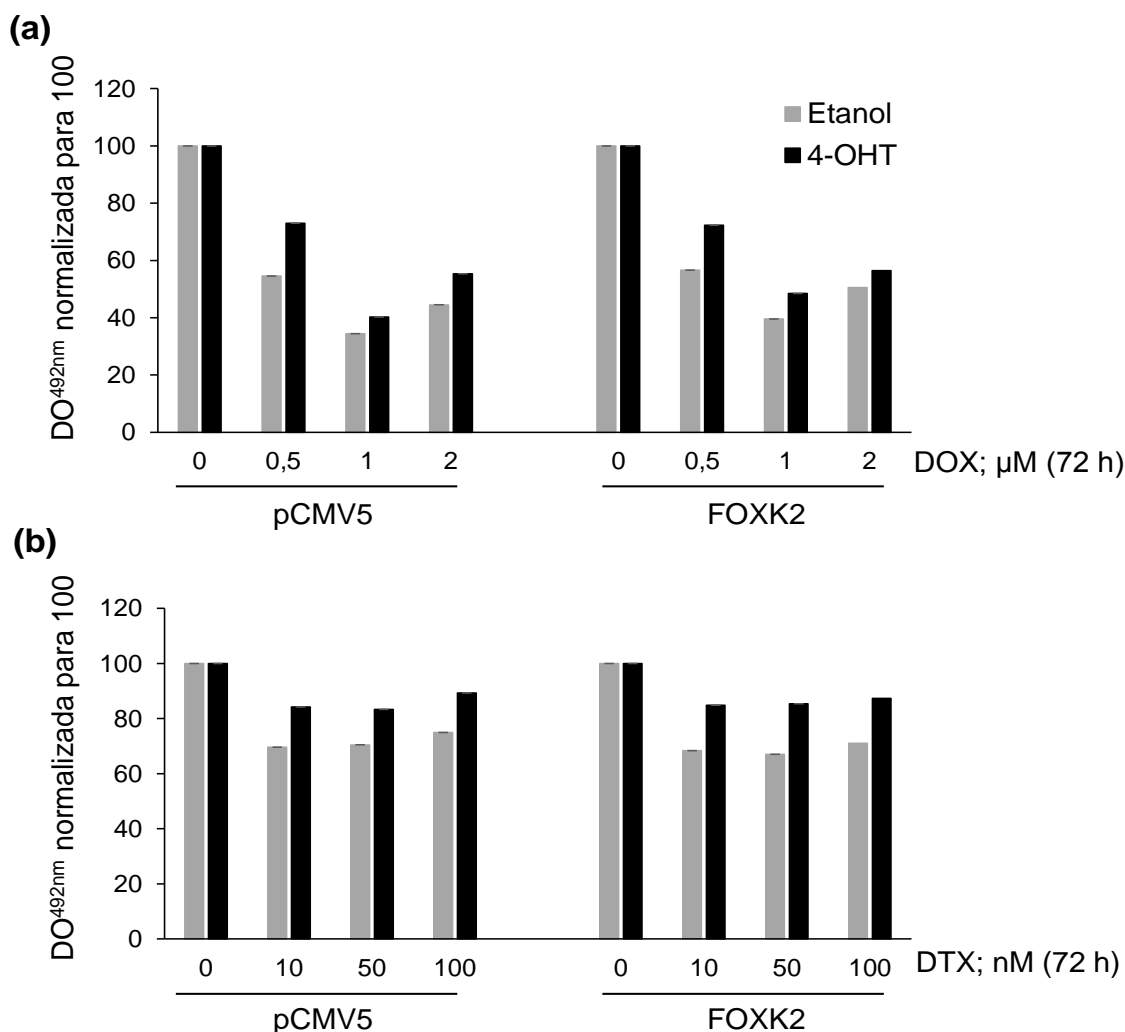
#### **4.11. A superexpressão de myrAKT confere resistência ao tratamento quimioterápico, independentemente dos níveis proteicos de FOXK2**

Diante dos nossos achados de modulação dos níveis proteicos de FOXK2 mediante a inibição de AKT, inicialmente, avaliamos o impacto da superexpressão dessa quinase no conteúdo proteico endógeno e exógeno de FOXK2 em células MCF-7, que apresentam baixos níveis de AKT fosforilada. Para isso, transfectamos as células com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER, que codifica uma AKT constitutivamente ativa (myrAKT) indutível por 4-OHT (**Figura 3.1**). Como mencionado no Tópico 3.3, nesse vetor, AKT é expressa fusionada ao HBD e, portanto, assume um peso molecular de 93 kDa. Assim, confirmamos que houve a superexpressão exógena de AKT (**Figura 4.23a e 4.23b**), expressa pelo aumento nos níveis de AKT fosforilada, tanto exógenos (**Figura 4.23a**) quanto endógenos (**Figura 4.23b**), sugerindo que a indução da superexpressão de AKT também pode influenciar positivamente os seus níveis proteicos endógenos. Em seguida, verificamos que a superexpressão de AKT indutível por 4-OHT leva a um aumento nos níveis proteicos endógenos de FOXK2 (**Figura 4.23b**), corroborando os nossos achados anteriores. Entretanto, a superexpressão de AKT não foi capaz de modular os níveis proteicos exógenos de FOXK2 (**Figura 4.23a**). De forma interessante, ao combinarmos a inibição de FOXK2 por RNA de interferência à superexpressão de AKT, observamos que a indução da superexpressão de AKT aumenta, ao menos parcialmente, o conteúdo proteico desse fator de transcrição (**Figura 4.23b**).



**Figura 4.23 – A superexpressão de AKT modula o conteúdo proteico endógeno, porém não exógeno, de FOXK2.** As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) (a) ou foram transfectadas com siRNA para FOXK2 e expostas à condição ‘Mock’, todos os reagentes de transfecção, exceto RNAs (b). Após 24 h, as células foram transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER e, depois de 24 h, foram tratadas com etanol (veículo) ou 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) por mais 24 h. Por fim, as células foram coletadas para a análise por Western blotting, onde os níveis de FOXK2, fosfo-AKT, AKT total, GAPDH e Hsc70 foram avaliados. GAPDH e Hsc70 foram utilizados como controles constitutivos. Os níveis proteicos relativos de FOXK2 foram determinados com base nos níveis do produto do gene-alvo versus a referência, GAPDH ou Hsc70. As intensidades das bandas insaturadas de Western blot foram determinadas usando o ImageJ. Os valores são mostrados abaixo das bandas de Western blot. As figuras são representativas de um único experimento.

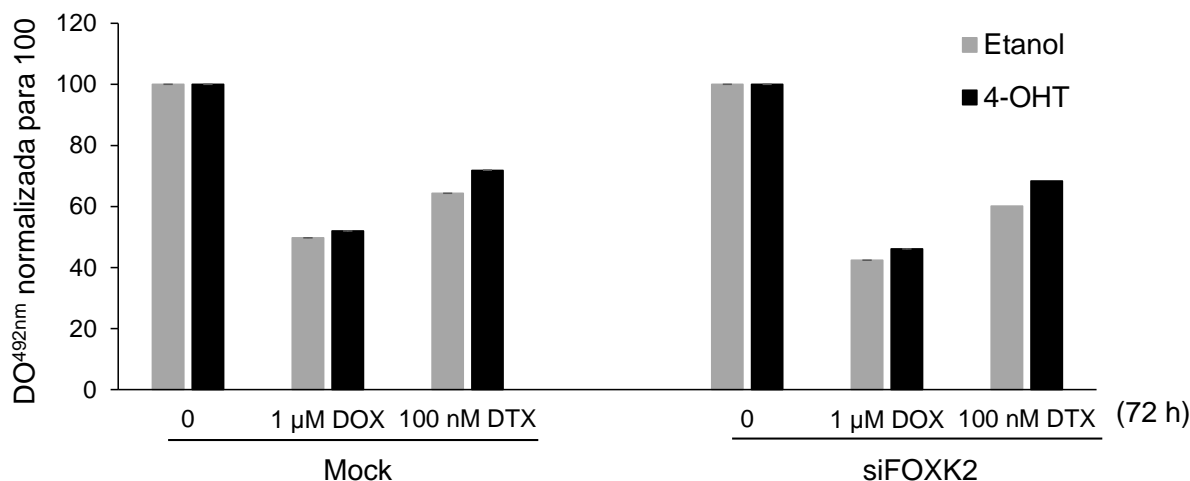
Por fim, avaliamos o efeito da superexpressão de AKT na resposta de células MC-7 ao tratamento com os fármacos, analisando também se modulações nos níveis proteicos de FOXK2 poderiam afetar o fenótipo induzido pela superexpressão dessa quinase. De forma notável, as células que superexpressam AKT constitutivamente ativa (myrAKT) apresentam-se menos sensíveis ao tratamento com DOX (Figuras 4.24a e 4.25) e DTX (Figuras 4.24b e 4.25), validando o papel dessa quinase na quimiorresistência no câncer de mama.



**Figura 4.24 – A superexpressão de AKT confere resistência aos quimioterápicos, independentemente dos níveis proteicos de FOXK2.** As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor vazio (pCMV5) e o vetor selvagem para FOXK2 (pCMV5-FOXK2) (a e b) por 24 h, quando foram novamente transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER por 24 h e tratadas com etanol (veículo) ou 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) por mais 24 h. Por fim, as células foram replaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com concentrações crescentes de doxorubicina (DOX) e docetaxel (DTX) por 72 h. As densidades óticas foram lidas em 492 nm, normalizadas para 100 e comparadas quanto à citotoxicidade dos quimioterápicos pelo ensaio de MTT. Os gráficos são representativos de um único experimento e os desvios são técnicos.

Por outro lado, as manipulações de superexpressão (**Figuras 4.23a**) e de inibição de FOXK2 (**Figura 4.23b**) não foram capazes de modular o efeito protetivo de myrAKT (**Figuras 4.24a, 4.24b e 4.25**). Esses dados sugerem que a modulação isolada dos níveis proteicos e da atividade de AKT pode ser suficiente para alterar o perfil celular de resposta aos quimioterápicos.





**Figura 4.25 – A combinação da superexpressão de AKT com a inibição de FOXK2 não modula a sensibilidade aos quimioterápicos.** As células MCF-7 foram transfectadas com o siRNA para FOXK2 ou expostas à condição ‘Mock’, todos os reagentes de transfecção, exceto RNAs. Após 24 h, as células foram transfectadas com o vetor pBABE-(myr)Akt:ER e, depois de 24 h, tratadas com etanol (veículo) ou 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) por mais 24 h. Por fim, as células foram replaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com doxorubicina (DOX) ou docetaxel (DTX) por 72 h. As densidades óticas foram lidas em 492 nm, normalizadas para 100 e comparadas quanto à citotoxicidade dos quimioterápicos pelo ensaio de MTT. Os gráficos são representativos de um único experimento e os desvios são técnicos.

## 5. Discussão

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente e com maior taxa de mortalidade entre as mulheres no Brasil e no mundo (INCA, 2019; IARC, 2020), além de ser uma doença altamente heterogênea (CURTIS *et al.*, 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Apesar dos avanços no tratamento, a resistência à quimioterapia ainda é uma das principais causas de falha terapêutica (PLAVA *et al.*, 2019; NEDELJKOVIĆ & DAMJANOVIĆ, 2019), o que limita as opções de tratamento e contribui para um pior prognóstico das pacientes. Diante dessa problemática, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos quimioterápicos é fundamental para prover o racional de novas estratégias terapêuticas que consigam sobrepujar o fenótipo de quimiorresistência.

Embora as funções biológicas de FOXK2 ainda sejam pouco exploradas, esse fator de transcrição vem sendo implicado em vias de sensibilidade aos quimioterápicos em células de câncer de mama, onde foi demonstrado que FOXK2 medeia a sensibilidade às drogas, através da ativação transcricional de *FOXO3a*. Já em células de câncer de mama resistentes aos quimioterápicos, os níveis proteicos e a função de FOXK2 encontram-se desregulados (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2018). Entretanto, os mecanismos de regulação desse fator de transcrição ainda são pouco conhecidos, particularmente no contexto dos tumores de mama. Diante disso, nesse estudo, investigamos o

impacto das modulações de AKT nos níveis proteicos e na localização subcelular de FOXK2, assim como o papel do eixo de regulação AKT-FOXK2 na quimiorresistência em células de câncer de mama.

Nossos achados demonstram que a inibição gênica e farmacológica de AKT levam a uma redução do padrão de bandas de FOXK2 nas células quimiorresistentes MDA-MB-231. No que diz respeito especificamente à inibição farmacológica da fosforilação de AKT com o LY294002, um inibidor da PI3K, verificamos efeitos sutis na regulação do perfil de bandas de FOXK2. Mecanismos de ativação de AKT independentes da PI3K já foram reportados na literatura, como, por exemplo, a fosforilação ativadora mediada por Ack1 (*activated Cdc42 kinase 1*) (CHAN *et al.*, 2014; RISSO *et al.*, 2015). Uma vez ativada, Ack1 fosforila AKT em seu resíduo de tirosina 176, recrutando-a para a membrana, onde pode se tornar completamente ativa, um mecanismo que ocorre de forma independente dos níveis de PIP3 e mesmo após a inibição da PI3K. De forma interessante, a ativação de Ack1 e a fosforilação de AKT na tirosina 176 foram associadas a tumores de mama em estágios mais avançados e com pior sobrevida em pacientes (MAHAJAN *et al.*, 2010). Em conjunto, essas descrições sugerem que AKT pode ser ativada por outras vias de sinalização independentes da PI3K em células de câncer de mama, fazendo com que a inibição da PI3K pelo LY294002 não tenha um efeito determinante na inibição da atividade de AKT. Reforçando essa hipótese, ao utilizarmos o MK-2206, um inibidor alostérico específico de AKT, observamos resultados mais consistentes no que diz respeito à regulação dos níveis proteicos de FOXK2. Adicionalmente, a modulação de outros substratos da PI3K induzida pelo LY294002 poderia estar interferindo no padrão de bandas de FOXK2. Como exemplo, foi demonstrado que mTORC1, um alvo conhecido da PI3K por meio da via PI3K/AKT/mTOR, regula indiretamente os fatores FOXK, suprimindo a fosforilação desses reguladores transcricionais por GSK3 (HE *et al.*, 2018), o que sugere que a inibição de mTORC1 mediante o tratamento com LY294002 poderia ter compensado o efeito da inibição de AKT nos níveis proteicos de FOXK2. De forma consistente aos dados da inibição de AKT, a superexpressão dessa quinase aumentou os níveis proteicos endógenos de FOXK2 nas células MCF-7, nosso modelo quimiossensível, o que está de acordo com nossos dados prévios (**Figura 1.14**). Por outro lado, a superexpressão de AKT não afetou o perfil de indução de expressão exógena de FOXK2, o que pode sugerir que os níveis exógenos desse fator de transcrição tenham atingido o limiar máximo de fosforilação por AKT. Em conjunto, esses dados corroboram a nossa hipótese de que AKT pode modular os níveis proteicos de FOXK2 em células de câncer de mama.

Apesar de a modulação do conteúdo proteico de FOXK2 mediante as manipulações de inibição e superexpressão de AKT ter se mostrado consistente em nossos achados, nem todas

essas abordagens evidenciaram a regulação das bandas de menor mobilidade de FOXK2. Esse perfil de modulação global de bandas de FOXK2 levanta a possibilidade de que, além da potencial regulação pós-traducional proposta por esse estudo, AKT possa modular indiretamente os níveis transcricionais de FOXK2, alterando os seus níveis proteicos. Até o momento, poucos trabalhos investigaram a regulação transcricional de FOXK2 e apenas Qian e colaboradores (2017) demonstraram que Sox9 é capaz de se ligar diretamente ao promotor de *FOXK2* e induzir a sua transcrição em câncer colorretal, onde esse eixo de regulação desempenha funções oncogênicas. Embora já tenha sido demonstrado que AKT favorece a atividade de Sox9 em modelo murino de câncer de mama (AL-ZAHRANI *et al.*, 2020), o fator de transcrição Sox9 atua como um oncogene nos tumores mamários (MA *et al.*, 2020), enquanto FOXK2 é conhecidamente um supressor tumoral nesse modelo (LIU *et al.*, 2015; SHAN *et al.*, 2016), sugerindo que o possível eixo AKT-Sox9-FOXK2 não está contribuindo para os efeitos globais observados no conteúdo proteico de FOXK2 nas nossas células. No entanto, AKT pode estar modulando outros fatores de transcrição que regulam FOXK2, adicionando mais um nível de complexidade ao potencial eixo de sinalização AKT-FOXK2. Em adição, sabe-se que AKT regula uma ampla gama de substratos (MANNING & TOKER, 2017) e já foi descrito que FOXK2 pode ser modulada pós-transcricionalmente, como achados de regulação de seu RNA mensageiro por microRNAs (LIN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020). Logo, as manipulações de AKT podem alterar indiretamente os níveis de microRNAs que têm o RNA mensageiro de FOXK2 como alvo, o que também pode contribuir para a regulação da síntese de FOXK2 e, conseqüentemente, impactar nas modulações globais nos níveis proteicos desse fator de transcrição.

Quanto à localização subcelular, nossos dados indicam que FOXK2 está localizada preferencialmente no núcleo das células de câncer de mama, corroborando os achados da literatura para esse fator de transcrição, tanto em células tumorais mamárias (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015) quanto em outros modelos celulares (JI *et al.*, 2014; SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Por outro lado, nossos resultados indicam que AKT fosforilada se encontra preferencialmente no núcleo das células MDA-MB-231, diferentemente do perfil observado para as células quimiossensíveis MCF-7. Esses resultados indicam uma associação da localização nuclear de AKT fosforilada ao fenótipo de quimiorresistência e à localização nuclear de FOXK2 em células de câncer de mama, reforçando que essas proteínas podem interagir e contribuir para o fenótipo de resistência a drogas. A localização nuclear de AKT foi descrita ainda na década de 90 (MEIER *et al.*, 1997) e já foi reportado que todas as isoformas dessa quinase podem translocar para esse compartimento subcelular em resposta a uma variedade de estímulos (MARTELLI *et al.*, 2012). Embora AKT não possua um sinal de

localização nuclear (NLS) (MARTELLI *et al.*, 2012), essa quinase pode translocar para o núcleo através da interação com outras proteínas, como Tcl1 (*proto-oncogene T-cell leukemia-1*) (PEKARSKY *et al.*, 2000). De forma interessante, AKT nuclear já foi associada com o aumento e a manutenção da população de células tronco tumorais ou células iniciadoras de tumor (CITs) em câncer de mama (GARGINI *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2015), que vêm sendo extensivamente relacionadas com iniciação e progressão tumoral, metástases e resistência a drogas nesse modelo (ZHENG *et al.*, 2021). Logo, esses achados reforçam os resultados desse estudo que relacionam a localização nuclear de AKT ao fenótipo de quimiorresistência em células de câncer de mama. Além disso, quando no núcleo, AKT pode regular diferencialmente os seus substratos, incluindo moduladores do ciclo celular e fatores transcricionais de reprogramação celular (JAIN *et al.*, 2015), assim como interagir com a maquinaria de reparo de dano ao DNA, de exportação de RNAs (MARTELLI *et al.*, 2012) e de transcrição (COA *et al.*, 2019). Com isso, fica claro que a localização de AKT ativa no núcleo das células MDA-MB-231 pode contribuir para a regulação diferencial de FOXK2, alterando o perfil de resposta ao tratamento quimioterápico.

Embora AKT possa interagir com FOXK2 no núcleo das células quimiorresistentes, nossos dados indicam que a fosforilação e, conseqüentemente, a ativação de AKT não modula a translocação núcleo-citoplasma de FOXK2 no nosso modelo, uma vez que esse fator de transcrição permanece acumulado no núcleo das células MDA-MB-231 mesmo após a inibição farmacológica de AKT, tanto pelo LY294002 quanto pelo MK-2206. Esses dados diferem de outros achados, que demonstram que FOXK2 pode ter a sua localização subcelular modulada por fosforilações mediadas direta ou indiretamente por mTOR em contextos de reprogramações metabólicas (BOWMAN *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018; SAKAGUCHI *et al.*, 2019), assim como fosforilações reguladas pela via de ATM-CHK2, que controlam o processo autofágico (CHEN *et al.*, 2020). Um achado bem estabelecido na literatura demonstra que os membros da família FOXO são regulados negativamente pelas fosforilações mediadas por AKT, sendo exportados do núcleo e enviados para degradação (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2016; MANNING & TOKER, 2017). Embora a translocação núcleo-citoplasma dos fatores FOXO induzida por AKT não se aplique à regulação de FOXK2 em nosso modelo, tais descrições da literatura relacionam AKT à modulação de membros da família FOX, o que também fortalece o possível eixo de regulação AKT-FOXK2.

Reforçando a hipótese de modificação pós-traducional de FOXK2 por AKT, ao tratarmos os extratos proteicos das células MDA-MB-231 com a lambda-fosfatase, observamos uma alteração no padrão de mobilidade de FOXK2, o que foi consistente com o padrão de migração reduzido dessa proteína em gel Phos-tag. Transpondo para as amostras de pacientes,

nossas análises indicam que os níveis proteicos de FOXK2 fosforilada encontram-se elevados em tumores de mama, quando comparados ao tecido mamário normal adjacente ao tumor. Os dados obtidos a partir do banco de dados CPTAC revelaram as serinas 170, 428 e 398 mais expressas nos tumores de mama. De forma interessante, dentre esses sítios, a serina 398 (S398) também foi identificada na nossa análise *in silico*, através do software iGPS (SONG *et al.*, 2012; ver tópico 1.2.4), como um possível sítio de fosforilação por AKT em FOXK2. Esses dados somam à nossa hipótese de que o eixo AKT-FOXK2 pode ser dependente de fosforilação, principalmente considerando que o resíduo de S398 encontra-se próximo de outros sítios conhecidamente fosforilados na sequência de FOXK2, incluindo as serinas 368 e 423 (MARAIS *et al.*, 2010) e as serinas 415 e 419 (SAKAGUCHI *et al.*, 2019). Somando a esses achados, nossos resultados também mostram uma clara redução das bandas de menor mobilidade de FOXK2 após a inibição gênica e farmacológica de AKT (**Figuras 4.2 e 4.7**), um potencial indicativo de modificações pós-traducionais. Apesar dos sítios cruciais para a interação entre tais proteínas não terem sido identificados, esses dados sugerem que FOXK2 pode ser modulada por fosforilações em diferentes sítios-alvo nos tumores de mama e reforçam o possível eixo de regulação AKT-FOXK2. Esses aspectos são reforçados pelas descrições da literatura que mostram que esse fator de transcrição pode ser fosforilado em diferentes resíduos (MARAIS *et al.*, 2010; SAKAGUCHI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020), tendo a mobilidade de suas bandas alterada (MARAIS *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2020). De forma consistente, o mesmo mecanismo regulatório foi demonstrado para FOXK1, ao ser regulado diretamente por fosforilações mediadas por GSK3 e mTOR (BOWMAN *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018). Vale ressaltar que GSK3 não parece mediar os efeitos de AKT sobre FOXK2 em células MDA-MB-231, frente aos nossos achados de que a inibição gênica de GSK3 não modula o conteúdo proteico de FOXK2. Esses dados sugerem que o eixo AKT-GSK3-FOXK2 pode desempenhar suas funções regulatórias de forma dependente do tipo de tecido de origem.

A partir dos ensaios de inibição farmacológica de AKT com o MK-2206, validamos o papel dessa quinase na resistência à doxorrubicina e ao docetaxel nas células MDA-MB-231. Esses resultados estão de acordo com nossos dados prévios, que demonstraram que a inibição gênica de AKT por RNA de interferência, além de levar a uma menor viabilidade celular, também torna as células MDA-MB-231 mais sensíveis à doxorrubicina (**Figura 1.13**). De forma consistente, confirmamos o efeito protetor de AKT nas células MCF-7, a partir da sua superexpressão constitutivamente ativa (myrAKT). Esses achados corroboram as descrições da literatura que mostram o papel da ativação da via de AKT na resistência a diferentes abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer de mama, incluindo a quimioterapia (MILLER *et al.*, 2011; MIAO *et al.*, 2017; ARAKI & MIYOSHI, 2018; FUJIMOTO *et al.*, 2020). AKT

atua como um regulador chave da quimiorresistência, através da sua relação com diferentes vias de sinalização e regulação de diversos processos celulares, podendo: (i) atenuar a apoptose e a morte celular associada à autofagia, induzidas por muitos agentes antineoplásicos; (ii) sustentar vias de sobrevivência e de proliferação celular; (iii) modular positivamente a expressão de enzimas antioxidantes e de transportadores membranares que atuam como bombas de efluxo (JABBARZADEH KABOLI *et al.*, 2020). Assim, a inibição de membros da via PI3K/AKT vem despertando grande interesse, com estudos pré-clínicos e clínicos em andamento (ClinicalTrials.gov; ELLIS & MA, 2019; NOOROLYAI *et al.*, 2019; PASCUAL & TURNER, 2019) e alguns compostos já aprovados para o uso na clínica (BASELGA *et al.*, 2012; ANDRÉ *et al.*, 2019). Particularmente, foi descrito que a combinação de inibidores de AKT à quimioterapia pode prolongar a sobrevida das pacientes com tumores de mama triplo negativos (KIM *et al.*, 2017; SCHMID *et al.*, 2020), reforçando nossos dados preliminares que indicam um potencial benefício da inibição de AKT para melhorar a resposta a drogas nesse modelo.

Embora o perfil de bandas de FOXK2 exógena tenha sido modulado após a inibição de AKT pelo MK-2206, a superexpressão de FOXK2 não ressensibilizou as células MDA-MB-231 inibidas para AKT à doxorrubicina e ao docetaxel. Esses resultados estão de acordo com nossos dados prévios obtidos durante o meu trabalho de monografia que demonstraram que a superexpressão de FOXK2 não alterou a resposta ao tratamento com doxorrubicina em células MDA-MB-231 inibidas para AKT1 por RNA de interferência (dados não publicados). Esse mesmo perfil foi observado nas células MCF-7, em que a superexpressão e a inibição de FOXK2 não foram capazes de modular o efeito protetivo de myrAKT na resposta aos fármacos, apesar de termos observado um aumento, mesmo que discreto, nos níveis proteicos endógenos de FOXK2 após a superexpressão de myrAKT. Por estarem na mesma via de sinalização, o efeito da inibição ou superexpressão de AKT pode ser suficiente para modular os níveis de FOXK2 e alterar a resposta celular aos quimioterápicos, de forma que inibir ou superexpressar FOXK2 não potencializaria esse efeito. De forma mais específica, acreditamos que os sítios essenciais para esse eixo de sinalização possam já estar ocupados, de forma que a fosforilação basal de FOXK2 endógena por AKT pode ser suficiente para gerar o efeito que observamos mediante a inibição e a superexpressão de AKT. Além disso, a avaliação da resposta a quimioterápicos aqui realizada não exclui a hipótese de que o eixo AKT-FOXK2 pode ter um impacto mais significativo em outros processos celulares, como proliferação, migração e invasão. Essa possibilidade é reforçada por relatos crescentes implicando FOXK2 (SHAN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018b) e AKT (CHENG *et al.*, 2007; DILLON *et al.*, 2009; STOTTRUP *et al.*, 2016; LEAL-ORTA *et al.*, 2019; MARCIAL-MEDINA *et al.*, 2019) na modulação de marcadores da transição epitélio-mesênquima e na

regulação da migração e invasão celular. Ainda vale ressaltar que as células MDA-MB-231 apresentam um perfil intermediário de resistência aos quimioterápicos e de conteúdo proteico e atividade de FOXK2, exibindo um fenótipo entre a linhagem quimiossensível (MCF-7) e as linhagens quimiorresistentes desenvolvidas em laboratório, a partir da parental MCF-7. Portanto, as modulações no eixo AKT-FOXK2 podem vir a ter um impacto mais pronunciado nas células resistentes aos quimioterápicos. Essa hipótese será avaliada em experimentos futuros, uma vez que o estabelecimento desses modelos tenha sido finalizado. Visto que a MDA-MB-231 é um modelo celular triplo negativo e tais tumores estão associados com pior prognóstico e carecem de uma terapia específica, o estudo de possíveis alvos terapêuticos nesse modelo é essencial, o que justifica a utilização dessas células em nosso estudo. Vale destacar que ensaios preliminares revelaram que a combinação da inibição de AKT pelo MK-2206 com a superexpressão de FOXK2 torna as células mais sensíveis ao tratamento com a doxorrubicina a longo prazo. Em conjunto, esses achados podem indicar dinâmicas mais complexas de regulação da resposta aos quimioterápicos pelo eixo AKT-FOXK2, cujos efeitos biológicos parecem apresentar um perfil tempo e modelo-dependente.

## 6. Conclusões

- A inibição de AKT por abordagens metodológicas distintas reduz os níveis proteicos endógenos e exógenos de FOXK2, particularmente das bandas de menor mobilidade. Além disso, a regulação de FOXK2 por AKT possivelmente não depende de GSK3 $\beta$ .
- FOXK2 e AKT fosforilada estão localizadas predominantemente no núcleo das células quimiorresistentes, diferente do perfil observado nas células quimiossensíveis. Por outro lado, a inibição de AKT parece não estar implicada na translocação núcleo-citoplasma de FOXK2.
- A proteína FOXK2 tem a sua mobilidade alterada pelo tratamento com a lambda-fosfatase e apresenta um padrão de migração reduzido em gel Phos-tag, denotando que essa proteína pode ser regulada por fosforilação. De forma notável, sítios de fosforilação em FOXK2 se encontram mais expressos nos tumores de mama em comparação aos tecidos saudáveis adjacentes.
- Por fim, a inibição e a superexpressão de AKT alteram a resposta à doxorrubicina e ao docetaxel em células MCF-7 e MDA-MB-231, o que foi associado à modulação dos níveis proteicos de FOXK2. Entretanto, a superexpressão ou a inibição desse fator de transcrição não alterou o perfil celular de resposta aos quimioterápicos induzido pelas manipulações de AKT.

## 7. Referências bibliográficas

- ABEYRATHNA, P. & SU, Y. **The critical role of Akt in cardiovascular function.** *Vascul Pharmacol.* 2015;74:38-48.
- AHMED, S.; SAMI, A.; XIANG, J. **HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer.** *Breast Cancer.* 2015 Mar;22(2):101-16.
- ALMAWI, A.W.; MATTHEWS, L.A.; GUARNE, A. **FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond.** *Prog. Biophys. Mol. Boil.* 2017, 127, 105–110.
- AL-ZAHRANI, K.N.; ABOU-HAMAD, J.; PASCOAL, J. *et al.* **AKT-mediated phosphorylation of Sox9 induces Sox10 transcription in a murine model of HER2-positive breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 2021;23:55.
- ANDRÉ, F.; CIRUELOS, E.; RUBOVSKY, G. *et al.* SOLAR-1 Study Group. **Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2019, 380, 1929–1940.
- AOKI, M. & FUJISHITA, T. **Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017; 407:153-189.
- ARAKI, K. & MIYOSHI, Y. **Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer.** *Breast Cancer.* 2018;25(4):392-401.
- ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G. *et al.* **Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*.** *Biotechnol. Bioeng.* 1969; 9, 1101–1110.
- BALAJI, S.A.; UDUPA, N.; CHAMALLAMUDI, M.R. **Role of the Drug Transporter ABCC3 in Breast Cancer Chemoresistance.** *PLoS One.* 2016 May 12;11(5): e0155013.
- BAR-ZEEV, M.; LIVNEY, Y.D.; ASSARAF, Y.G. **Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance.** *Drug Resist Updat.* 2017 Mar;31:15-30.
- BASELGA, J.; CAMPONE, M.; PICCART, M. *et al.* **Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer.** *N Engl J Med.* 2012 Feb 9;366(6):520-9.



BAYMAZ, H.I.; FOURNIER, A.; LAGET, S. *et al.* **MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain.** *Proteomics* 2014, 14, 2179–2189.

BETTAIEB, A.; PAUL, C.; PLENCHETTE, S. *et al.* **Precision medicine in breast cancer: reality or utopia?** *J Transl Med.* 2017, 15:139.

BOURNE, H.R. *et al.* Cell Signaling: Signaling through enzyme-coupled receptors. In: ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell.** 6. ed. New York: Garland Science, 2015. p. 850-866.

BOWMAN, C.J.; AYER, D.E.; DYNLACHT, B.D. **Foxk proteins repress the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs.** *Nat. Cell Boil.* 2014, 16, 1202–1214.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama.** Portaria Conjunta Nº 19 de 3 de julho de 2018.

Broad Institute. Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). [portals.broadinstitute.org/ccle](http://portals.broadinstitute.org/ccle). Acessado em 08 de dezembro de 2020.

BRODBECK, D.; HILL, M.M.; HEMMING, B.A. **Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain.** *J Biol Chem.* 2001;276(31):29550-29558.

CAGEL, M.; GROTZ, E.; BERNABEU, E. *et al.* **Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside.** *Drug Discov Today.* 2017 Feb;22(2):270-281.

CALLEJA, V.; LAGUERRE, M; LARIJANI, B. **3-D structure and dynamics of protein kinase B—new mechanism for the allosteric regulation of an AGC kinase.** *J Chem Biol.* 2009 Mar; 2(1): 11–25. Published online 2009 Feb 20.

CARBONE, M.; YANG, H.; PASS, H.I. *et al.* **BAP1 and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 2013, 13, 153–159.

CARVALHO, C.; SANTOS, R.X.; CARDOSO, S. *et al.* **Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect.** *Curr Med Chem.* 2009;16(25):3267-85.

CHAN, C.H.; JO, U.; KOHRMAN, A. *et al.* **Posttranslational regulation of Akt in human cancer.** *Cell Biosci.* 2014, Oct 1;4(1):59.

CHANDRASHEKAR, D. S.; BASHEL, B.; BALASUBRAMANYA, S. A. H. *et al.* **UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses.** *Neoplasia.* 2017 Aug;19(8):649-658.

CHARGARI, C.; TOILLON, R.A.; MACDERMED, D. *et al.* **Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale?** *Lancet Oncol.* 2009 Jan;10 (1):53-60.

CHEN, S.; JIANG, S.; HU, F. *et al.* **Foxk2 inhibits non-small cell lung cancer epithelial-mesenchymal transition and proliferation through the repression of different key target genes.** *Oncol. Rep.* 2017, 37, 2335–2347.

CHEN, F.; CHANDRASHEKAR, D.S.; VARAMBALLY, S. *et al.* **Pan-cancer molecular subtypes revealed by mass-spectrometry-based proteomic characterization of more than 500 human cancers.** *Nat Commun.* 2019 Dec 12;10(1):5679.

CHEN, Y.; WU, J.; LIANG, G. *et al.* **CHK2-FOXK axis promotes transcriptional control of autophagy programs.** *Sci Adv.* 2020 Jan 1;6(1):eaax5819. eCollection 2020 Jan.

CHENG, G.Z.; CHAN, J.; WANG, Q. *et al.* **Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel.** *Cancer Res.* 2007; 67(5):1979–87.

CHIEN, A. J.; TRIPATHY, D.; ALBAIN, K. S. *et al.* **MK-2206 and Standard Neoadjuvant Chemotherapy Improves Response in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and/or Hormone Receptor-Negative Breast Cancers in the I-SPY 2 Trial.** *J Clin Oncol.* 2020 Apr 1;38(10):1059-1069.

CHIN, Y.R. & TOKER, A. **The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration.** *Mol Cell.* 2010;38(3): 333–44.

CHIN, Y. R.; YOSHIDA, T.; MARUSYK, A. *et al.* **Targeting Akt3 Signalling in Triple-Negative Breast Cancer.** *Cancer Res.* 2014, 74 (3).

CHITTOCK, E.C.; LATWIEL, S.; MILLER, T.C. *et al.* **Molecular architecture of polycomb repressive complexes.** *Biochem. Soc. Trans.* 2017, 45, 193–205.

CHUNG, S.; YAO, J.; SUYAMA, K. *et al.* **N-cadherin regulates mammary tumor cell migration through Akt3 suppression.** *Oncogene.* 2013;32(4):422–30.

COA, L.L.; ABREU, T.F.; TASHIMA, A.K. *et al.* **AKT/protein kinase B associates with  $\beta$ -actin in the nucleus of melanoma cells.** *Biosci Rep.* 2019 Jan 30;39(1):BSR20181312.

COLEY, H.M. **Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer.** *Cancer Treat Rev.* 2008 Jun;34(4):378-90.

COON, J.S.; MARCUS, E.; GUPTA-BURT, S. *et al.* **Amplification and overexpression of topoisomerase II predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer.** *Clin. Cancer Res.* 2002 8: 1061–1067.

CURTIS, C.; SHAH, S.P.; CHIN, S.F. *et al.* **The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups.** *Nature.* 2012 Apr 18;486(7403):346-52.

DEAN-COLOMB, W. & ESTEVA, F.J. **Emerging agents in the treatment of anthracycline- and taxane-refractory metastatic breast cancer.** *Semin Oncol.* 2008 Apr;35(2 Suppl 2):S31-8; quiz S40.

DILLON, R.L.; MARCOTTE, R.; HENNESSY, B.T. *et al.* **Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression.** *Cancer Res.* 2009;69(12):5057–64.

DU, F.; QIAO, C.; LI, X. *et al.* **Forkhead Box K2 Promotes Human Colorectal Cancer Metastasis by Upregulating ZEB1 and EGFR.** *Theranostics* 2019 31;9(13):3879-3902.

ELLIS, H. & MA, C. X. **PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy.** *Curr Oncol Rep.* 2019 Dec 11;21(12):110.

FARHAN, M.; WANG, H.; GAUR, U. *et al.* **FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer.** *Int J Biol Sci.* 2017; 13(7): 815–827.

FRANK, T.; TUPPI, M.; HUGLE, M. *et al.* **Cell cycle arrest in mitosis promotes interferon-induced necroptosis.** *Cell Death Differ.* 2019 Oct;26(10):2046-2060.

FUJII, Y.; NAKAMURA, M. **FOXK2 transcription factor is a novel G/T-mismatch DNA binding protein.** *J. Biochem.* 2010, 147, 705–709.

FUJIMOTO, Y.; MORITA, T. Y.; OHASHI, A. *et al.* **Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells.** *Sci Rep.* 2020 Dec 10;10(1):21762.

GARGINI, R.; CERLIANI, J.P.; ESCOLL, M. *et al.* **Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway.** *Stem Cells.* 2015 Mar;33(3):646-60.

GILKES, D.M.; SEMENZA, G.L.; WIRTZ, D. **Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis**. *Nat Rev Cancer*. 2014, Jun;14(6):430-9.

GOLSON, M.L. & KAESTNER, K.H. **Fox transcription factors: from development to disease**. *Development*. 2016 Dec 15;143(24):4558-4570.

GOTTESMAN, M. M.; LAVI, O.; HALL, M.D. *et al.* **Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56:85- 102.

GREGORY, M.A.; QI, Y.; HANN, S.R. **Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization**. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51606-51612.

GROTTKE, A.; EWALD, F.; LANGE, T. *et al.* **Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4**. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146370.

GUERRERO-ZOTANO, A.; MAYER, I.A.; ARTEAGA, C.L. **PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment**. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):515-524.

GUO, B.; TAM, A.; SANTI, S.A. *et al.* **Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells**. *BMC Cancer*. 2016 Sep 29;16(1):762.

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J. *et al.* **Breast cancer**. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.

HE, L.; GOMES, A.P.; WANG, X. *et al.* **mTORC 1 Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation**. *Mol. Cell* 2018, 70, 949–960.

HENRY, W. S.; LASZEWSKI, T.; TSANG, T. *et al.* **Aspirin suppresses growth in PI3K-mutant breast cancer by activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling**. *Cancer Res*. 2017 February 01; 77(3): 790–801.

HERBST, R. S. & KHURI, F. R. **Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents**. *Cancer Treat Rev*. 2003 Oct;29(5):407-15.

HERS, I.; VINCENT, E.E.; TAVARÉ, J. M. **Akt signalling in health and disease**. *Cell Signal*. 2011, Oct;23(10):1515-27.

HINZ, N. & JUCKER, M. **Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review.** Cell Commun Signal. 2019 Nov 21;17(1):154.

HOPKINS, B. D.; PAULI, C.; DU, X. *et al.* **Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors.** Nature. 2018 Aug;560(7719):499-503.

HOXHAJ, G. & MANNING, B. D. **The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signaling and cancer metabolism.** Nat Rev Cancer. 2020 Feb; 20(2): 74–88.

HU, Y.; YAGUE, E.; ZHAO, J. *et al.* **Sabutoclax, pan-active BCL-2 protein family antagonist, overcomes drug resistance and eliminates cancer stem cells in breast cancer.** Cancer Lett. 2018a Jun 1; 423:47-59.

HU, X.; WANG, J.; HE, W. *et al.* **MicroRNA-433 targets AKT3 and inhibits cell proliferation and viability in breast cancer.** Oncol Lett. 2018b;15(3):3998–4004.

HUW, L.Y.; O'BRIEN, C.; PANDITA, A. *et al.* **Acquired PIK3CA amplification causes resistance to selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors in breast cancer.** Oncogenesis. 2013 Dec 23;2(12):e83.

IACOVIDES, D. C.; JOHNSON, A. B.; WANG, N. *et al.* **Identification and quantification of AKT isoforms and phosphoforms in breast cancer using a novel nanofluidic immunoassay.** Mol Cell Proteomics. 2013 Nov;12(11):3210-20.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [texto na internet]. Rio de Janeiro, INCA, 2019.

International Agency for Research on Cancer (IARC): The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Cancer Today [texto na internet]. 2020.

ISAKOFF, S.J.; ENGELMAN, J.A.; IRIE, H.Y. *et al.* **Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells.** Cancer Res. 2005;65(23):10992-11000.

IURLARO, M.; FICZ, G.; OXLEY, D. *et al.* **A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.** Genome Boil. 2013, 14, R119.

JABBARZADEH KABOLI, P.; SALIMIAN, F.; AGHAPOUR, S. *et al.* **Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer - A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy.** Pharmacol Res. 2020 Jun;156:104806.

JAIN, M.V.; JANGAMREDDY, J.R.; GRABAREK, J. *et al.* **Nuclear localized Akt enhances breast cancer stem-like cells through counter-regulation of p21(Waf1/Cip1) and p27(kip1).** Cell Cycle. 2015;14(13):2109-20.

JARVINEN, T.A.H.; TANNER, M.; BARLUND, M. *et al.* **Characterization of topoisomerase II gene amplification and deletion in breast cancer.** Gene Chromosome Cancer 1999 26: 142–150.

JI, Z.; DONALDSON, I.J.; LIU, J. *et al.* **The forkhead transcription factor FOXK2 promotes AP-1-mediated transcriptional regulation.** Mol. Cell. Boil. 2012, 32, 385–398.

JI, Z.; MOHAMMED, H.; WEBBER, A. *et al.* **The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex.** Nucleic Acids Res. 2014, 42, 6232–6242.

JIN, C.-Y.; KIM, G.-Y.; CHOI, Y. H. **Induction of apoptosis by aqueous extract of Cordyceps militaris through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 Cells.** J Microbiol Biotechnol. 2008 Dec;18(12):1997-2003.

JURIC, D.; CASTEL, P.; GRIFFITH, M. *et al.* **Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI3K $\alpha$  inhibitor.** Nature. 2015 Feb 12; 518(7538): 240–244.

KATOH, M. & KATOH, M. **Identification and characterization of human FOXK1 gene in silico.** Int J Mol Med. 2004 Jul;14(1):127-32.

KIM, S.B.; DENT, R.; IM, S.A. *et al.* **Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial.** Lancet Oncol. 2017 Oct; 18(10): 1360–1372.

KNAPPSKOG, S. & LONNING, P.E. **P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer.** Expert Opin. Ther. Targets, 2012, 16(Suppl.1):S23-S30.

KOHN, A.D.; BARTHEL, A.; KOVACINA, K.S. *et al.* **Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt.** J Biol Chem 273:11937–11943. J Biol Chem. 1998 May 8;273(19):11937-43.

KOMOREK, J.; KUPPUSWAMY, M.; SUBRAMANIAN, T. *et al.* **Adenovirus type 5 E1A and E6 proteins of low-risk cutaneous beta-human papillomaviruses suppress cell transformation through interaction with FOXK1/K2 transcription factors.** J. Virol. 2010, 84, 2719–2731.

KRUG, K.; JAEHNIG, E.J.; SATPATHY, S. *et al.* (2020). **Proteogenomic Landscape of Breast Cancer Tumorigenesis and Targeted Therapy**. *Cell*, 183(5), 1436-1456.e31.

KUMAR, C. C. & MADISON, V. **AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors**. *Oncogene*. 2005, Nov 14;24(50):7493-501.

LAM, E. W.; BROSENS, J.J.; GOMES, A.R. *et al.* **Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony**. *Nat Rev Cancer*. 2013 Jul;13(7):482-95.

LEAL-ORTA, E.; RAMIREZ-RICARDO, J.; CORTES-REYNOSA, P. *et al.* **Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid**. *J Cell Commun Signal*. 2019;13(2):235-244.

LI, C.; LAI, C.F.; SIGMAN, D.S. *et al.* **Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 7739–7743.

LI, C.-W.; XIA, W.; LIM, S.-O. *et al.* **AKT1 Inhibits Epithelial to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer through Phosphorylation-Dependent Twist1 Degradation**. *Cancer Res*. 2016;76(6):1451–62.

LI, Y.; CAI, B.; SHEN, L. *et al.* **MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3**. *Cancer Lett*. 2017; 397:111–9.

LI, W.; HOU, J.-Z.; NIU, J. *et al.* **Akt1 inhibition promotes breast cancer metastasis through EGFR-mediated  $\beta$ -catenin nuclear accumulation**. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):82.

LI, J.; GUO, R.; LIU, Q. *et al.* **Circular RNA Circ-ITCH Inhibits the Malignant Behaviors of Cervical Cancer by microRNA-93-5p/FOXK2 Axis**. *Reprod Sci*. 2020 Mar;27(3):860-868.

LIN, Y.; CUI, H.; XU, H. *et al.* **Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway**. *Oncol Rep*. 2012 Jun;27(6):1976-80.

LIN, M.F.; YANG, Y.F.; PENG, Z.P. *et al.* **FOXK2, regulated by miR-1271-5p, promotes cell growth and indicates unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma**. *Int. J. Biochem. Cell Boil*. 2017, 88, 155–161.

LIU, Y.; AO, X.; JIA, Z. *et al.* **FOXK2 transcription factor suppresses ERalpha-positive breast cancer cell growth through down-regulating the stability of ERalpha via mechanism involving BRCA1/BARD1.** *Sci. Rep.* 2015, 5, 8796.

LIU, X.; WEI, X.; NIU, W. *et al.* **Downregulation of FOXK2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer.** *Mol. Med. Rep.* 2018, 18, 4356–4364.

LIU, M.; YU, J.; WANG, D. *et al.* **Epigenetically Upregulated MicroRNA-602 Is Involved in a Negative Feedback Loop with FOXK2 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** *Mol Ther.* 2019 Oct 2;27(10):1796-1809.

MA, Y.; SHEPHERD, J.; ZHAO, D. *et al.* **SOX9 Is Essential for Triple-Negative Breast Cancer Cell Survival and Metastasis.** *Mol Cancer Res.* 2020 Dec;18(12):1825-1838.

MAHAJAN, K.; COPPOLA, D.; CHALLA, S. *et al.* **Ack1 Mediated AKT/PKB Tyrosine 176 Phosphorylation Regulates Its Activation.** *PLoS One.* 2010, 5(3): e9646.

MAKKI, J. **Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.** *Clin Med Insights Pathol.* 2015 Dec 21;8:23-31. eCollection 2015.

MALHOTRA, G.K.; ZHAO, X.; BAND, H. *et al.* **Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.** *Cancer Biol Ther.* 2010 Nov 15;10(10):955-60.

MALONEY, S. M.; HOOVER, C. A.; MOREJON-LASSO, L. V. *et al.* **Mechanisms of Taxane Resistance.** *Cancers (Basel).* 2020 Nov 10;12(11):3323.

MANNING, B. D. & TOKER, A. **AKT/PKB Signaling: Navigating the Network.** *Cell.* 2017 Apr 20;169(3):381-405.

MARAI, A.; JI, Z.; CHILD, E.S. *et al.* **Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK.cyclin complexes.** *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 35728–35739.

MARCIAL-MEDINA, C.; ORDONEZ-MORENO, A.; REYES-GONZALES, C. *et al.* **Oleic acid induces migration through a FFAR1/4, EGFR and Akt dependent pathway in breast cancer cells.** *Endocr Connect.* 2019;8(3):252-265.

MAROULAKOU, I. G.; OEMLER, W.; NABER, S. P. *et al.* **Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice.** *Cancer Res.* 2007, Jan 1;67(1):167-77.



MARTELLI, A.M.; TABELLINI, G.; BRESSANIN, D. *et al.* **The emerging multiple roles of nuclear Akt.** *Biochim Biophys Acta.* 2012 Dec;1823(12):2168-78.

MEIER, R.; ALESSI, D.R.; CRON, P. *et al.* **Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B $\beta$ .** *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30491–30497.

MIAO, Y.; ZHENG, W.; LI, N. *et al.* **MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway.** *Sci Rep.* 2017;7:41942.

MILLER, T. W.; REXER, B. N.; GARRETT, J. T. *et al.* **Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer.** *Breast Cancer Research* 2011, 13:224.

MOREL, C.; CARLSON, S.M.; WHITE, F.M. *et al.* **Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis.** *Mol Cell Biol.* 2009 Jul;29(14):3845-52. Epub 2009 May 11.

MORENO-ASPITIA, A. & PEREZ, E.A. **Anthracycline- and/or taxane-resistant breast cancer: results of a literature review to determine the clinical challenges and current treatment trends.** *Clin Ther.* 2009 Aug;31(8):1619-40.

MORSE, D. L.; GRAY, H.; PAYNE, C. M. *et al.* **Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells.** *Mol Cancer Ther.* 2005 Oct;4(10):1495-504.

MURTHY, R. K.; LOI, S.; OKINES, A. *et al.* **Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer.** *Randomized Controlled Trial. N. Engl. J. Med.* 2020 Feb 13;382(7):597-609.

National Institute of Health (NIH). National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov.* Acessado em 21 de novembro de 2020.

NEDELJKOVIĆ, M. & DAMJANOVIĆ, A. **Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge.** *Cells.* 2019 Aug 22;8(9):957.

NESTAL DE MORAES, G.; KHONGKOW, P.; GONG, C. *et al.* **Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer.** *Oncogenesis* 2015, 4, e167.

NESTAL DE MORAES, G.; BELLA, L.; ZONA, S. *et al.* **Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance.** *Curr Drug Targets.* 2016,17(2):164-77.

NESTAL DE MORAES, G.; JI, Z.; FAN, L.Y. *et al.* **SUMOylation modulates FOXK2-mediated paclitaxel sensitivity in breast cancer cells.** *Oncogenesis* 2018, 7, 29.

NESTAL DE MORAES, G.; CARNEIRO, L.D.T.; MAIA, R.C. *et al.* **FOXK2 Transcription Factor and Its Emerging Roles in Cancer.** *Cancers (Basel).* 2019 Mar 20;11(3). pii: E393.

NIK-ZAINAL, S.; DAVIES, H.; STAAF, J. *et al.* **Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences.** *Nature.* 2016 May 2; 534(7605): 47–54.

NOOROLYAI, S.; SHAJARI, N.; BAGHBANI, E. *et al.* **The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer.** *Gene.* 2019; 698:120-128.

OKINO, Y.; MACHIDA, Y.; FRANKLAND-SEARBY, S. *et al.* **BRCA1-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase antagonizes the ubiquitin-mediated activation of FoxK2 target genes.** *J. Boil. Chem.* 2015, 290, 1580–1591.

PASCUAL, J. & TURNER, N. C. **Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer.** *Ann Oncol.* 2019 Jul 1;30(7):1051-1060.

PEKARSKY, Y.; KOVAL, A.; HALLAS, C. *et al.* **Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 3028–3033.

PÉREZ-TENORIO, G.; KARLSSON, E.; STAL, O. **Clinical value of isoform-specific detection and targeting of AKT1, AKT2 and AKT3 in breast cancer.** *Breast Cancer Manag.* 2014, 3(5), 409–421.

PLAVA, J.; CIHOVA, M.; BURIKOVA, M. *et al.* **Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer.** *Mol Cancer.* 2019 Mar 30;18(1):67.

POLYTARCHOU, C.; ILIOPOULOS, D.; HATZIAPOSTOLOU, M. *et al.* **Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation.** *Cancer Res.* 2011;71(13):4720–31.

QIAN, Y.; XIA, S.; FENG, Z. **Sox9 mediated transcriptional activation of FOXK2 is critical for colorectal cancer cells proliferation.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 483, 475–481.

RAKHA, E.A.; REIS-FILHO, J.S.; BAEHNER F. *et al.* **Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.** *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207.

REINHARDT, H.C.; YAFFE, M.B. **Phospho-Ser/Thr-binding domains: Navigating the cell cycle and DNA damage response.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, 14, 563–580.

RENNER, O.; BLANCO-APARICIO, C.; GRASSOW, M. *et al.* **Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by membrane localization of p110alpha predisposes mammary glands to neoplastic transformation.** *Cancer Res.* 2008;68(23):9643-9653.

RIGGIO, M.; PERRONE, M. C.; POLO, M. L. *et al.* **AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins.** *Sci Rep.* 2017, Mar 13;7:44244.

RISSO, G.; BLAUSTEIN, M.; POZZI, B. *et al.* **Akt/PKB: one kinase, many modifications.** *Biochem J.* 2015, Jun 1;468(2):203-14.

RIVERA, E. & GOMEZ, H. **Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone.** *Breast Cancer Res.* 2010;12 Suppl 2:S2.

ROBSON, M.; IM, S.-A.; SENKUS, E. *et al.* OlympiAD trial. **Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation.** *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):523-533.

SAKAGUCHI, M.; WEIKANG, C.; WANG, C.H. *et al.* **FoxK1 and FoxK2 in Insulin Regulation of Cellular and Mitochondrial Metabolism.** *Nat Commun.* 2019 Apr 5;10(1):1582.

SCHMID, P.; ADAMS, S.; RUGO, H.S. *et al.* IMpassion130 Trial Investigators. **Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2018, 379, 2108–2121.

SCHMID, P.; ABRAHAM, J.; CHAN, S. *et al.* **Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial.** *J Clin Oncol.* 2020 Feb 10;38(5):423-433.

SHAN, L.; ZHOU, X.; LIU, X. *et al.* **FOXK2 Elicits Massive Transcription Repression and Suppresses the Hypoxic Response and Breast Cancer Carcinogenesis.** *Cancer Cell* 2016, 30, 708–722.

ŠKUBNÍK, J.; PAVLÍČKOVÁ, V.; RUML, T. *et al.* **Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy.** *Plants (Basel)*. 2021 Mar 17;10(3):569.

SONG, C.; YE, M.; LIU, Z. *et al.* **Systematic analysis of protein phosphorylation networks from phosphoproteomic data.** *Mol Cell Proteomics*. 2012, Oct;11(10):1070-83.

SPRUIJT, C.G.; GNERLICH, F.; SMITS, A.H. *et al.* **Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.** *Cell* 2013, 152, 1146–1159.

STOTTRUP, C.; TSANG, T.; CHIN, Y. R. **Upregulation of AKT3 Confers Resistance to the AKT Inhibitor MK2206 in Breast Cancer.** *Mol Cancer Ther*. 2016, Aug;15(8):1964-74.

SUKONINA, V.; MA, H.; ZHANG, W. *et al.* **FOXK1 and FOXK2 regulate aerobic glycolysis.** *Nature* 2019, 566, 279–283.

SUN, T.; WANG, H.; LI, Q. *et al.* **Forkhead box protein k1 recruits TET1 to act as a tumor suppressor and is associated with MRI detection.** *Jpn. J. Clin. Oncol*. 2016, 46, 209–221.

SUN, Y.S.; ZHAO, Z.; YANG, Z.N. *et al.* **Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.** *Int J Biol Sci*. 2017; 13(11): 1387–1397.

SUN, J.; YIN, A.; ZHANG, W. *et al.* **CircUBAP2 Inhibits Proliferation and Metastasis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Targeting miR-148a-3p/FOXK2 Pathway.** *Cell Transplant* 2020; 29:963689720925751.

SUYAMA, K.; YAO, J.; LIANG, H. *et al.* **An Akt3 Splice Variant Lacking the Serine 472 Phosphorylation Site Promotes Apoptosis and Suppresses Mammary Tumorigenesis.** *Cancer Res*. 2018;78(1):103–14.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C.R. **Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems.** *J Pharm Pharmacol*. 2013 Feb;65(2):157-70.

TAHERIAN-FARD, A.; SRIHARI, S.; RAGA, M.A. **Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis.** *Brief Bioinform*. 2015 May; 16(3):461-74.

TANG, Y.; WANG, Y.; KIANI, M.F. *et al.* **Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer.** *Clin Breast Cancer*. 2016 Oct;16 (5):335-343.

The Cancer Genome Atlas Network. **Comprehensive molecular portraits of human breast tumors.** *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61-70.

THORN, C.F.; OSHIRO, C.; MARSH, S. *et al.* **Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.** *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul;21(7):440-6.

TOULANY, M.; MAIER, J.; IIDA, M. *et al.* **Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells.** *Cell Death Discovery.* 2017, 3, 17072.

VANHAESEBROECK, B.; GUILLERMET-GUIBERT, J.; GRAUPERA, M. *et al.* **The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 May;11(5):329-41.

VERRET, B.; CORTES, J.; BACHELOT, T. *et al.* **Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer.** *Ann Oncol.* 2019 Dec 1;30(Suppl\_10):x12-x20.

VUONG, D.; SIMPSON, P.T.; GREEN, B. *et al.* **Molecular classification of breast cancer.** *Virchows Arch.* 2014 Jul;465(1):1-14.

WAKS, A.G. & WINER, E.P. **Breast Cancer Treatment: A Review.** *JAMA.* 2019 Jan 22;321(3):288-300.

WANG, W.; LI, X.; LEE, M. *et al.* **FOXKs promote Wnt/beta-catenin signaling by translocating DVL into the nucleus.** *Dev. Cell* 2015, 32, 707–718.

WANG, Y.; WAN, G.H.; WU, Y.M. *et al.* **AP-1 confers resistance to anti-cancer therapy by activating XIAP.** *Oncotarget.* 2018a Jan 3;9(18):14124-14137.

WANG, B.; ZHANG, X.; WANG, W. *et al.* **Forkhead box K2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of human glioma cells and predicts a favorable prognosis.** *OncoTargets Ther.* 2018b, 11, 1067–1075.

WANG, W.; LIM, K. G.; FENG, M. *et al.* **KDM6B Counteracts EZH2-Mediated Suppression of IGFBP5 to Confer Resistance to PI3K/AKT Inhibitor Treatment in Breast Cancer.** *Mol Cancer Ther.* 2018c Sep;17(9):1973-1983.

WEISNER, J.; GONTLA, R.; VAN DER WESTHUIZEN, L. *et al.* **Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015 Aug 24;54(35):10313-6.

XIA, Y.-K.; ZENG, Y.-R.; ZHANG, M.-L. *et al.* **Tumor-derived neomorphic mutations in ASXL1 impairs the BAP1-ASXL1-FOXK1/K2 transcription network.** *Protein Cell.* 2020 Jul 18. Online ahead of print.

YANG, F.; TEVES, S.S.; KEMP, C.J. *et al.* **Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics.** *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1845(1):84-9.

YANG, X.; LESLIE, G.; DOROSZUK, A. *et al.* **Cancer Risks Associated With Germline *PALB2* Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families.** *J Clin Oncol.* 2020 Mar 1;38(7):674-685.

ZHANG, F.; MA, X.; LI, H. *et al.* **FOXK2 suppresses the malignant phenotype and induces apoptosis through inhibition of EGFR in clear-cell renal cell carcinoma.** *Int. J. Cancer* 2018, 142, 2543–2557.

ZHENG, Q.; ZHANG, M.; ZHOU, F. *et al.* **The Breast Cancer Stem Cells Traits and Drug Resistance.** *Front Pharmacol.* 2021 Jan 28;11:599965.

## 8. Anexos

### 8.1. Tabela da análise *in silico* de sítios putativos de regulação por quinases na sequência proteica de FOXK2, utilizando o software de predição iGPS 1.0

iGPS 1.0 – GPS algorithm with the interaction filter								
Predicted Site-specific Kinase-substrate Relations								
Position	Code	Peptide	Gene Name	Kinase Name	Interaction	Predictor	Score	Cutoff
55	T	LMKKRSV <b>T</b> IGRNSSQ	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	4.29	2.56
463	S	TPVTTST <b>S</b> QPPVVQT	FOXK2	SMG1	String	Atypical/PIKK	3.3	2.79
463	S	TPVTTST <b>S</b> QPPVVQT	FOXK2	TRRAP	String	Atypical/PIKK	3.3	2.79
61	S	VTIGRNS <b>S</b> QGSVDVS	FOXK2	SMG1	String	Atypical/PIKK	3.29	2.79
61	S	VTIGRNS <b>S</b> QGSVDVS	FOXK2	TRRAP	String	Atypical/PIKK	3.29	2.79
294	Y	HITKNYP <b>Y</b> RTADKG	FOXK2	JAK3	String	TK/JakA	2.68	2.68
294	Y	HITKNYP <b>Y</b> RTADKG	FOXK2	JAK1	String	TK/JakA	2.68	2.68
294	Y	HITKNYP <b>Y</b> RTADKG	FOXK2	JAK2	String	TK/JakA	2.68	2.68
294	Y	HITKNYP <b>Y</b> RTADKG	FOXK2	TYK2	String	TK/JakA	2.68	2.68

Adaptado de Song *et al.*, 2012, *Mol Cell Proteomics*

## 8.2. Tabela da análise *in silico* de potenciais sítios de fosforilação por AKT1 na sequência proteica de FOXK2, utilizando o software de predição iGPS 1.0

Position	Code	Peptide	Gene Name	Kinase Name	Interaction	Predictor	Score
55	T	LMKKRSV <b>T</b> IGRNSSQ	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	4.29
373	S	SSRSAPAS <b>S</b> PNHAGVL	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	2.04
142	T	LQLPRV <b>C</b> TFRFPSTN	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.89
248	S	PENEKEA <b>S</b> GGDSPKD	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.82
634	T	PELKRI <b>K</b> TEDGEGIV	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.7
398	S	ESLSREG <b>S</b> PAPLEPE	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.65
220	S	SPRGAG <b>S</b> SGYKVGRV	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.24
61	S	VTIGRNS <b>S</b> QGSVDVS	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	1.17
168	S	KREKQEA <b>S</b> ESPVKAV	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.96
453	T	AIKPVT <b>T</b> YVATPVTT	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.94
153	T	PSTNI <b>K</b> ITFTALSSE	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.92
451	T	PQAIKP <b>V</b> TYTVATPV	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.9
613	S	THASASA <b>S</b> LPTKRHN	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.81
394	S	AQTPES <b>L</b> SREGSPAP	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.79
548	T	TASRI <b>I</b> QAQTTPVQ	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.78
456	T	PVTYTV <b>A</b> TPVTTSTS	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.74
611	S	LATHASA <b>S</b> ASLPTKR	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.74
558	T	TTPVQ <b>T</b> VIVQQAPL	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.73
9	S	AAAAA <b>L</b> SAGATPPA	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.72
53	S	EYLMKKR <b>S</b> VTIGRNS	FOXK2	AKT1	String	AGC/AKT	0.7

Adaptado de Song *et al.*, 2012, Mol Cell Proteomics

## 8.3. Trabalho publicado relacionado à dissertação de mestrado

Nestal de Moraes G, Carneiro LDT, Maia RC, Lam EW, Sharrocks AD. *FOXK2 Transcription Factor and Its Emerging Roles in Cancer*. *Cancers* (Basel). 2019 Mar 20;11(3):393. doi: 10.3390/cancers11030393.

Review

# FOXK2 Transcription Factor and Its Emerging Roles in Cancer

Gabriela Nestal de Moraes <sup>1,\*</sup> , Luciana da Torre Carneiro <sup>1</sup>, Raquel Ciuvalschi Maia <sup>1</sup>, Eric Wing-Fai Lam <sup>2</sup>  and Andrew David Sharrocks <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Praça da Cruz Vermelha, 23, 6° andar, Rio de Janeiro (RJ) 20230 130, Brazil; lucianadatorre@gmail.com (L.d.T.C.); rcmaia@inca.gov.br (R.C.M.)

<sup>2</sup> Department of Surgery and Cancer, Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, Du Cane Road, London W12 0NN, UK; eric.lam@imperial.ac.uk

<sup>3</sup> Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Oxford Rd, Manchester M13 9PL, UK; andrew.d.sharrocks@manchester.ac.uk

\* Correspondence: gabinest@yaho.com.br; Tel.: +55-21-3207-1198 or +55-21-3207-1808

Received: 15 January 2019; Accepted: 14 March 2019; Published: 20 March 2019



**Abstract:** Forkhead box (FOX) transcription factors compose a large family of regulators of key biological processes within a cell. FOXK2 is a member of FOX family, whose biological functions remain relatively unexplored, despite its description in the early nineties. More recently, growing evidence has been pointing towards a role of FOXK2 in cancer, which is likely to be context-dependent and tumour-specific. Here, we provide an overview of important aspects concerning the mechanisms of regulation of FOXK2 expression and function, as well as its complex interactions at the chromatin level, which orchestrate how it differentially regulates the expression of gene targets in pathophysiology. Particularly, we explore the emerging functions of FOXK2 as a regulator of a broad range of cancer features, such as cell proliferation and survival, DNA damage, metabolism, migration, invasion and metastasis. Finally, we discuss the prognostic value of assessing FOXK2 expression in cancer patients and how it can be potentially targeted for future anticancer interventions.

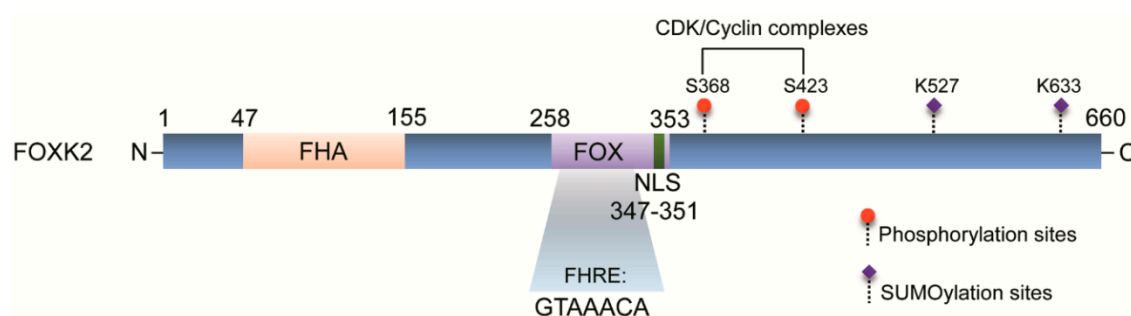
**Keywords:** FOXK2 transcription factor; forkhead box; transcriptional activity; cancer

## 1. FOXK2 Transcription Factor

FOXK2 is a transcription factor belonging to the forkhead box (FOX) family. Members of this family share an evolutionary conserved winged helix DNA binding domain [1] and are known to regulate a wide range of biological processes including metabolism, cell cycle progression, proliferation, survival, differentiation and apoptosis [2]. FOXK2 was initially described as an interleukin-enhancer binding factor (ILF), in a search for genes encoding cellular factors which bind to purine-rich motifs in the human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat [3]. In this study, FOXK2 was shown to bind to the *interleukin-2* (*IL-2*) promoter, the reason why its gene was initially designated *ILF1*. Although FOXK2 can occupy the *IL-2* promoter, it does not directly interact with components of nuclear factor of activating cells (NFAT) complex [4], a transcription factor critically required for *IL-2* mRNA synthesis in activated T-lymphocytes. This further suggests that FOXK2 might help recruit cellular factors to the *IL-2* promoter in resting cells or maybe alter the chromatin structure to enable the binding of NFAT proteins as a preceding step for transcriptional activation. The *FOXK2* gene is located on human chromosome 17q25.3 and transcribes an mRNA expressed in a variety of tissues [5]. FOXK2 mRNA undergoes alternative splicing, with three isoforms having been identified to date [4,5], whose functional differences have not been explored. Although *FOXK2* gene mutations have not been



reported, a partial tetrasomy of 17q25 chromosome disrupting the *FO XK2* gene has been associated with intellectual disability, malformations, syndactyly and central nervous system abnormalities in a 10-year old child [6], suggesting a possible role in development. The *FO XK2* gene has also been found to be hypomethylated in CpG islands in obese patients adipose tissues, which associates with high levels of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), the major methyltransferase in this tissue type [7]. Following weight loss, the patients exhibited decreased NNMT levels, along with changes in the expression of *FO XK2* and some inflammation-related genes [7]. This finding indicates that *FO XK2* gene expression could be modulated by epigenetic modifications, and suggests that *FO XK2* might play pathophysiological functions in adipocyte tissue metabolism. *FO XK2* is a 660 amino acid protein, structurally characterized by a forkhead-associated (FHA) domain, a FOX domain and a nuclear localization signal (NLS) (Figure 1). FHA domains are phosphoprotein-interacting motifs present in prokaryotes and eukaryotes, which specifically recognize phosphorylated residues, particularly threonine and serine [8]. Therefore, FHA-containing proteins are generally involved in cell signaling cascades, such as the DNA damage checkpoint response, cell growth, signal transduction and cell cycle regulation [9]. The FHA domain is not restricted to *FO XK2*, being also found in the *FO XK1* protein, the other member of *FO XK* subfamily in humans. *FO XK1* and *FO XK2* present a high similarity in protein sequence, sharing almost 50% total amino-acid identity [10]. In comparison to its subfamily member *FO XK1*, much less is known about *FO XK2* biology and how it impacts the transcriptional landscape.



**Figure 1.** The domain structure of *FO XK2* protein. *FO XK2* is composed of a forkhead-associated domain (FHA) localized towards the amino terminus and a highly conserved forkhead DNA-binding domain (FOX) localized towards the carboxy-terminal end of the protein. The FOX domain displays a nuclear localization signal (NLS) and mediates *FO XK2* binding to consensus sequences with a GTAAACA core motif. The post-translational modifications (PTM) for *FO XK2* are shown, where serines (S) are targets for phosphorylation by cyclin-dependent kinases (CDK) and lysines (K), for SUMOylation. Amino-acids sites which are targets for PTM are depicted above the scheme. FHRE, forkhead responsive elements.

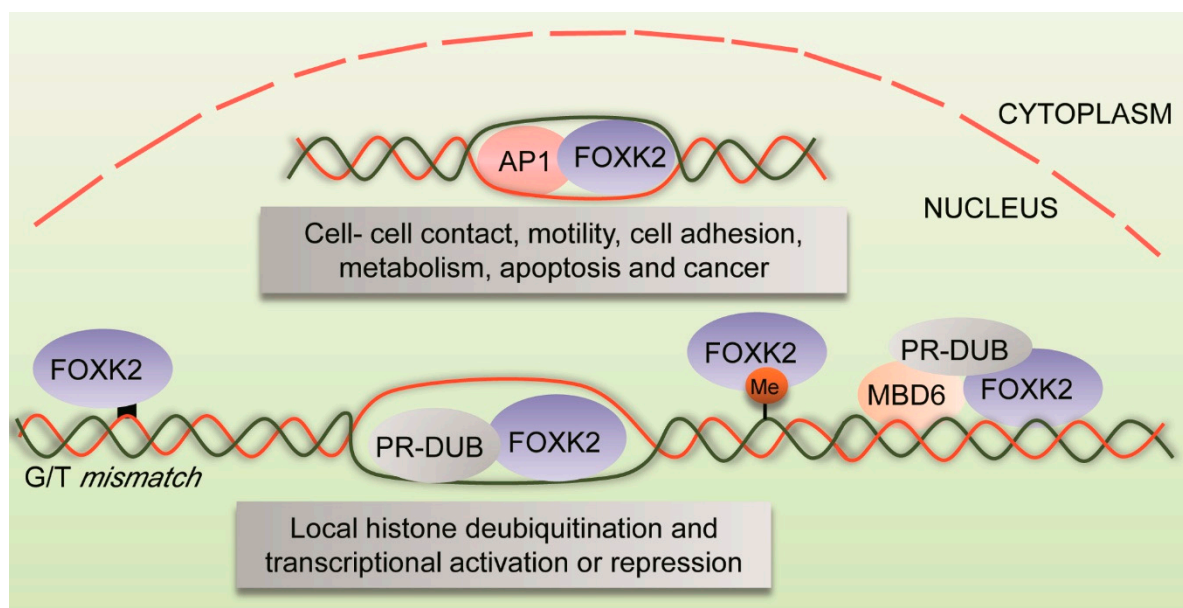
## 2. Mechanistic Insights into *FO XK2* Transcriptional Activity

Although *FO XK2* was identified in the early nineties [3], its biological roles have remained unrevealed for almost two decades. Only in the last ten years have insights into the functions of *FO XK2* been published, which indicate that *FO XK2* plays many broad and distinct roles and is involved in multiple molecular signaling pathways within the cell.

### 2.1. Chromatin Binding Specificities of *FO XK2*

*FO XK2* binds to consensus sequences with a GTAAACA core motif, which is quite similar to motifs recognized by other FOX proteins (Figure 1). Despite sharing the FOX domain with other family members, the specificity and differential binding to target genes are thought to be influenced by the flanking regions [4,11] and, importantly, by the complex interactions with other transcription factors at the chromatin level (Table 1). Indeed, a model of dynamic partial occupancy of binding regions has been determined for *FO XK2* and *FO XO3a*, which have been shown to bind in a widespread manner to the same genomic locations, and thereby govern *FO XO*-dependent gene expression in U2OS cells [11].

In this scenario, rather than directly competing for chromatin occupancy, FOXK2 and other FOX proteins are thought to dynamically associate and dissociate from their shared binding motifs and only regulate targets when other appropriate co-regulatory partners are present. However, genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing analysis has revealed that FOXK2 occupies unique binding regions throughout the genome in human cells, despite sharing some binding sites with other FOX factors [12]. Most of these regions have been shown to be associated with transcriptionally active genes which are either repressed or activated respectively, following functional assays involving FOXK2 knockdown and overexpression. These target genes are enriched for components of signaling pathways associated with cell adhesion and motility, control of transcription and metabolism, apoptosis and cancer (Figure 2). Interestingly, FOXK2 binding regions were found to be enriched for binding motifs of the activator protein-1 (AP-1) transcription factor, particularly in regions with open chromatin [12]. Consistent with this finding, FOXK2 was shown to functionally interact with AP-1 and promote its transcriptional activity. Conversely, FOXK2 depletion results in reduced binding of FOS component of AP-1 to chromatin, indicating that FOXK2 is required for AP-1 recruitment and transcription of targets genes. In this context, FOXK2 appears to be acting towards promoting transcriptional activation. Considering that the AP-1 transcription factor regulates transcription in response to a wide range of stimuli, controlling cellular processes particularly involved in cell fate decisions [13], FOXK2 might play a crucial role in modulating signal-associated gene expression.



**Figure 2.** FOXK2 transcription factor and chromatin-associated events. FOXK2 recruits AP-1 to the chromatin, regulating genes involved in cell-cell contact, motility, cell adhesion, metabolism, apoptosis and cancer. Besides that, FOXK2 interacts with BAP1, a component of PR-DUB complex, leading to local histone deubiquitination and to repression and/or activation of transcription of target genes. In addition to these chromatin-associated events, FOXK2 binds to methylated DNA as well as interacts with MBD6 and PR-DUB complex, recruiting transcriptional complexes. Furthermore, FOXK2 is potentially implicated in DNA repair functions, where it binds to G/T-mismatch regions and interacts with BAP1 deubiquitinase. BAP1, BRCA1-associated protein 1; AP-1, activator protein-1; PR-DUB, polycomb repressive deubiquitinase; MBD6, methyl binding domain protein 6; Me, DNA methylation sites.

**Table 1.** FOXK2 interaction partners.

Interaction Partners	Technique	Interaction Effect	Models	References
FOS and JUN	IP	FOXK2 recruits components of AP-1 complex to chromatin and participates in the transcription of its target genes	U2OS and 293T cell lines	[12]
SIN3A and BAP1-containing PR-DUB complexes	RIME, co-IP and PLA assay	FOXK2 recruits BAP-1 to chromatin, promoting local histone deubiquitination and leading to activation and repression of target genes	U2OS and HEK293T cell lines	[14]
SIN3A	TAP-MS and co-IP	FOXK2 interacts with SIN3A and represses genes involved in the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs	C2C12 myoblasts and IMR90 normal fibroblasts	[15]
SIN3/HDAC, NCoR, PR-DUB and NSL complexes	GFP pull down prior to MS	FOXK2/PR-DUB share target genes with MBD6, suggesting an association between FOXK2 and sites of DNA damage	293T and HeLa cell lines	[16]
CDK-Cyclin complexes	GST pull-down assay	FOXK2 is regulated by cell cycle regulatory machinery and degraded upon CDK-mediated phosphorylation	HEK293 and U2OS cell lines	[17]
E1A and E6 viral proteins	TAP-MS and co-IP	FOXK2 suppresses cell proliferation, oncogenic transformation and tumorigenesis in vivo	KB, A549, 293 and HeLa cell lines; tumours in athymic mice	[18]
ER $\alpha$ and BARD1	Co-IP, mammalian two hybrid system and GST pulldown assay	FOXK2 acts as a scaffold protein for ER $\alpha$ and BARD1, leading to a negative regulation of ER $\alpha$ and target genes and suppressing ER $\alpha$ -positive breast cancer proliferation	HEK 293T, MCF-7, Bcap-37, MDA-MB-231 and T47D cell lines	[19]
NCoR/SMRT, SIN3A, NuRD and REST/CoREST complexes	TAP-MS, co-IP and GST pull down	FOXK2 suppresses proliferation and invasion in models of breast cancer in vitro and in vivo and regulates several signaling pathways, including hypoxia	MCF-7 and HEK293T cell lines; xenograft tumours in SCID mice; breast carcinoma patients samples	[20]
DVL	TAP-MS and co-IP	FOXK2 interacts with DVL and promotes its nuclear translocation, which then activates Wnt signaling contributing to colorectal tumorigenesis	HEK293T, HeLa, HT29, DLD-1 cell lines; xenograft tumours; transgenic mice; colorectal patients samples	[21]

Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME); Immunoprecipitation (IP); Mass spectrometry (MS); Tandem affinity purification-Mass spectrometry (TAP-MS); Glutathione-S-Transferase (GST); Proximity ligation assay (PLA); Dishevelled (DVL); Cyclin-dependent kinase (CDK); Polycomb repressive deubiquitinase (PR-DUB); Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ); BRCA1-associated RING domain protein 1 (BARD1); BRCA1-associated protein 1 (BAP1); activator protein-1 (AP1); Methyl binding domain protein 6 (MBD6); Histone deacetylase (HDAC); nuclear receptor co-repressor (NCoR); non-specific lethal complex (NSL); RE1-silencing transcription factor (REST); nucleosome remodeling deacetylase (NURD).

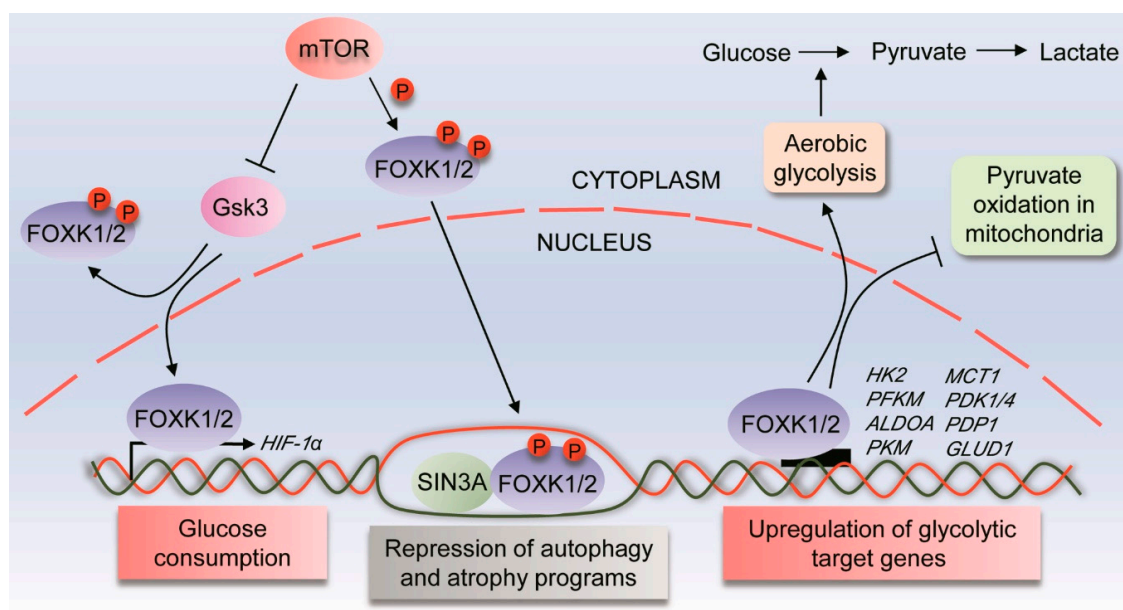
## 2.2. FOXC2 and Histone Ubiquitination

In addition to AP-1, the breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1)-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase was subsequently identified as a partner for FOXC2 in human cells [14]. BAP1 is an important tumour suppressor and a component of the polycomb repressive deubiquitinase (PR-DUB) complex, known to catalyze histone H2A deubiquitination [22,23] (Figure 2). The BAP1-FOXC2 interaction is abrogated with a mutant version of FOXC2 with impaired phosphopeptide binding activity, suggesting a dependency on the FHA domain of FOXC2 [14]. FOXC2 is required for BAP1 recruitment to chromatin, where they have been shown to bind to the same genomic regions and promote local histone deubiquitination to regulate transcription, by both repressing and activating target genes [14]. In cell line models of human embryonic kidney and lung cancer, FOXC2-mediated recruitment of BAP1 to target genes has been confirmed by another study, which identified Thr493 as the phosphorylation site of BAP-1 and that this site is necessary for interaction with the FHA domain of FOXC2 [24]. Also, BAP1 is required to form a ternary complex with FOXC1/K2 and HCF-1 and suppresses activation of FOXC2 target genes dependent on ubiquitination of Ring1B, a ubiquitin E3 ligase [24].

## 2.3. FOXC2 and Cell Metabolism

### 2.3.1. FOXC2 and Autophagy

FOXC2 has also been shown to interact with proteins from the Sin3A histone deacetylase (HDAC) co-repression complex in human cells [14], suggesting another mechanism underlying FOXC2 regulation of transcription (Figure 3). In this scenario, FOXC2 would be expected to act as a transcriptional repressor protein. Further studies in mouse myoblasts and human fibroblasts have also shown that FOXC2 and the closely related FOXC1 can associate with Sin3A, but not with the related Sin3B containing complex. This study went on to further implicate FOXC factors in the regulation of autophagy programs and thus, metabolism [15]. In this context, FOXC1/2 is recruited to and represses genes involved in atrophy and in the initiation of autophagy and vesicle nucleation, such as *Ulk1*, *Ulk2*, *Vps34*, *Ambra1* and *Atg13*, a condition that is reversed upon starvation [15]. Mechanistically, FOXC1-Sin3A repressive interactions at the chromatin level locally modify the histone acetylation profile and the structure of nucleosomes, in a process which involves an exclusive interplay with FOXO3a transcription factor, previously shown to activate autophagic genes in mouse myoblasts [25]. Although interactions of FOXC members with Sin3B were not confirmed in this study, the association of FOXC1 with Sin3a and Sin3b complexes had been previously demonstrated by others in C2C12 myoblasts and NIH 3T3 cells [26,27], suggesting that the recruitment and formation of FOXC-Sin3 complexes on chromatin might be cell-specific or depend on other proteins in the complex. FOXC1-mediated repression of autophagy is facilitated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) (Figure 3), a key regulator of cell homeostasis, while a mutant form of FOXC1 defective for mTOR phosphorylation is relocated to the cytoplasm and displaced from target genes [15]. The role of FOXC transcription factors in metabolism under mTOR control has been subsequently explored in a study which implicated FOXC1/2 in the regulation of glucose consumption [28]. FOXC1/2 knockdown leads to downregulation of *hypoxia-inducing factor 1 alpha* (*HIF1 $\alpha$* ) gene expression and suppression of cell proliferation of mouse embryonic fibroblasts [28]. FOXC1 has been shown to link mTOR signaling to HIF1 $\alpha$ -mediated transcription, through the direct phosphorylation of FOXC1 by glycogen synthase kinase 3 (Gsk3) (Figure 3). Although most of the experiments in these studies have been performed with FOXC1 rather than FOXC2, FOXC1 and FOXC2 were shown to bind to the same regulatory regions associated with their target genes, which might be expected as they share 91% identity in their DNA binding domains [15]. Also, residues around mTOR-regulated phosphorylation sites are highly conserved between FOXC1 and FOXC2, which suggests that FOXC2 might have its subcellular localization modulated by mTOR [15,28]. Additionally, FOXC2 depletion resulted in de-repression of FOXC1 [15], which suggests that FOXC1 and FOXC2 might play redundant roles in the transcriptional regulation of some target genes.



**Figure 3.** FOXK1/2 transcription factors in the control of metabolic processes. FOXK1/2 transcription factors are phosphorylated by mTOR, which translocate them to the nucleus where they interact with the Sin3A complex to suppress genes involved in atrophy and autophagy programs. Moreover, mTOR induces nuclear translocation of FOXK transcription factors through GSK regulation. In this context, FOXK1/2 induces *HIF1 $\alpha$*  gene expression and glucose consumption, contributing to cell proliferation. Additionally, FOXK1/2 regulate aerobic glycolysis while suppressing aerobic oxidation through the upregulation of glycolytic target genes. mTOR, mammalian target of rapamycin; Gsk3, glycogen synthase kinase 3; HIF1 $\alpha$ , hypoxia-inducing factor 1 alpha; SIN3A complex, SIN3 Transcription Regulator Family Member A complex; HK2, hexokinase-2; PFKM, phosphofructokinase muscle isoform; ALDOA, aldolase A; PKM, pyruvate kinase M1/2; MCT1, monocarboxylate transporter 1; PDK1/4, pyruvate dehydrogenase kinases 1/4; PDP1, Pyruvate dehydrogenase phosphatase 1; GLUD1, glutamate dehydrogenase 1; P, phosphorylation site.

### 2.3.2. FOXK2 and Aerobic Glycolysis

More recently, a study has implicated FOXK2 in the regulation of aerobic glycolysis [29]. FOXK1 and FOXK2 expression levels were found to be upregulated in muscle and adipocyte tissues of starved mice, as well as in adipocytes of obese mice and skeletal muscle following exercise [29]. In response to FOXK1 and FOXK2 overexpression, glucose uptake was increased in myoblasts and myotubes, an effect that was reversed by FOXK1/2 knockdown. Furthermore, glycolysis was induced in adipocytes following overexpression of FOXK1/2, demonstrating that they are key transcriptional regulators of glycolytic enzymes. This effect is accompanied by an increase in lactate production and suppression of pyruvate oxidation in the mitochondria (Figure 3). Interestingly, transcriptome analysis of adipocytes with FOXK1/2 overexpression and knockdown revealed that differentially expressed glycolytic pathway genes were co-regulated by both FOXK1 and FOXK2, pointing to additional redundancies in their functions. The *in vivo* relevance of these findings was confirmed, as mice lacking FOXK2 expression exhibited decreased glucose uptake in several tissues [29], further implicating FOXK2 as a potent regulator of aerobic glycolysis.

Altogether, these studies clearly attribute a role for FOXK transcription factors in the control of metabolic processes and therefore, in maintaining cellular homeostasis. Further research is required to uncover not only the potential unique functions that FOXK1 and FOXK2 might play, but also their redundant roles in the transcriptional control of gene networks involved in metabolism. However, we lack information on the mechanisms of regulation governing FOXK expression and function in this context and, eventually, in pathological conditions.

#### 2.4. FO XK2 and DNA Methylation

Besides the aforementioned chromatin-associated events, FO XK2 has been demonstrated to bind to methylated DNA in mouse embryonic stem cells [30,31]. Data concerning the preferential DNA modification recruiting FO XK2 is controversial, with a report pointing to 5-methylcytosine [30] and another, to its oxidized derivative 5-formylcytosine [31]. Although the effects on transcription have not been assigned, FO XK2 has been suggested to act as a methyl binding domain protein (MBD), known to be responsible for the readout of DNA methylation and for coordinating this with other modifications to regulate transcription, replication and DNA repair [32]. The mechanisms by which DNA methylation regulates transcription are still poorly understood, but a report has demonstrated that FO XK2 functionally interacts with MBD6 and PR-DUB in human cells [16], establishing a link between DNA methylation and the recruitment of transcriptional complexes (Figure 2). In this study, MBD5 and MBD6 have been described as novel interactors of PR-DUB, in an MBD domain-dependent manner. On the other hand, MBD6, but not MBD5, is recruited to sites of laser-induced DNA damage independently of its MBD domain and PR-DUB interaction [16]. Altogether, these findings implicate FO XK2 in rather complex chromatin-mediated events, including histone acetylation and ubiquitination and DNA methylation, which finely modulate FO XK2 roles as both a repressor and activator of gene transcription.

### 3. FO XK2 in DNA Repair and Cell Cycle Control

Three of the underlying molecular drivers of cancer are alterations to the gene regulatory machinery, disruptions to the cell cycle control machinery and impairment of the DNA repair process. As FO XK2 has been shown to be associated with all of these processes, it is an attractive candidate for involvement in tumorigenesis.

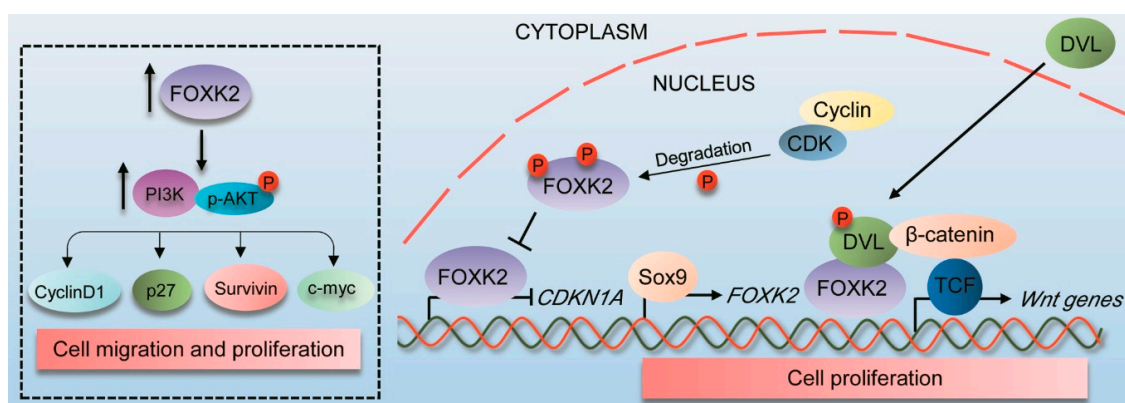
#### 3.1. FO XK2 and DNA Repair

One of the first descriptions of FO XK2 functions was the finding that it could act as a novel G/T-mismatch specific binding protein (nGTBP) [33]. FO XK2 has been shown to bind to mismatched DNA through the FOX domain with high specificity and affinity in human cells [33] (Figure 2), suggesting that it might sense G/T mismatches and trigger mechanisms of DNA repair. Considering that repair of DNA mismatches is a crucial step in preventing mutations [34], FO XK2 might work ensuring replication fidelity and genomic stability. Interestingly, FO XK2 does not contain a catalytic domain usually found in DNA repair proteins. So, it is reasonable to hypothesize that it can recognize and interact with phosphoproteins involved in DNA repair cascades via its FHA domain. Indeed, FO XK2 has been shown to physically interact with BAP1 [14], a protein implicated in DNA repair in addition to its widely studied role in gene regulation [35]. BAP1 phosphorylation and its own catalytic activity are required for its recruitment to double-strand DNA break lesions and promotion of DNA repair by homologous recombination [35]. This suggests that FO XK2 and BAP1 might act in concert and be involved not only in chromatin remodeling and gene expression control, but also in DNA repair pathways. Altogether, these findings potentially imply a function for FO XK2 in the context of the DNA repair regulatory machinery. FO XK2 might be engaged in DNA repair functions by binding to sites of DNA lesions, both interacting with molecules in the DNA repair cascade, potentially via its FHA domain, and recruiting complexes involved in the initiation of the DNA repair signaling pathway. Interestingly, the yeast forkhead protein Fkh1, the homolog of human FO XK1, has been found to be associated with chromatin following induction of DNA double-strand breaks and to regulate donor preference in yeast in an FHA domain-dependent manner [36].

#### 3.2. FO XK2 and Cell Cycle Regulation

Beyond the function in DNA repair, a role in cell cycle progression was attributed to the yeast forkhead proteins Fkh1 and Fkh2, homologs of human FO XK1 and FO XK2 [37]. Fkh2 activity has

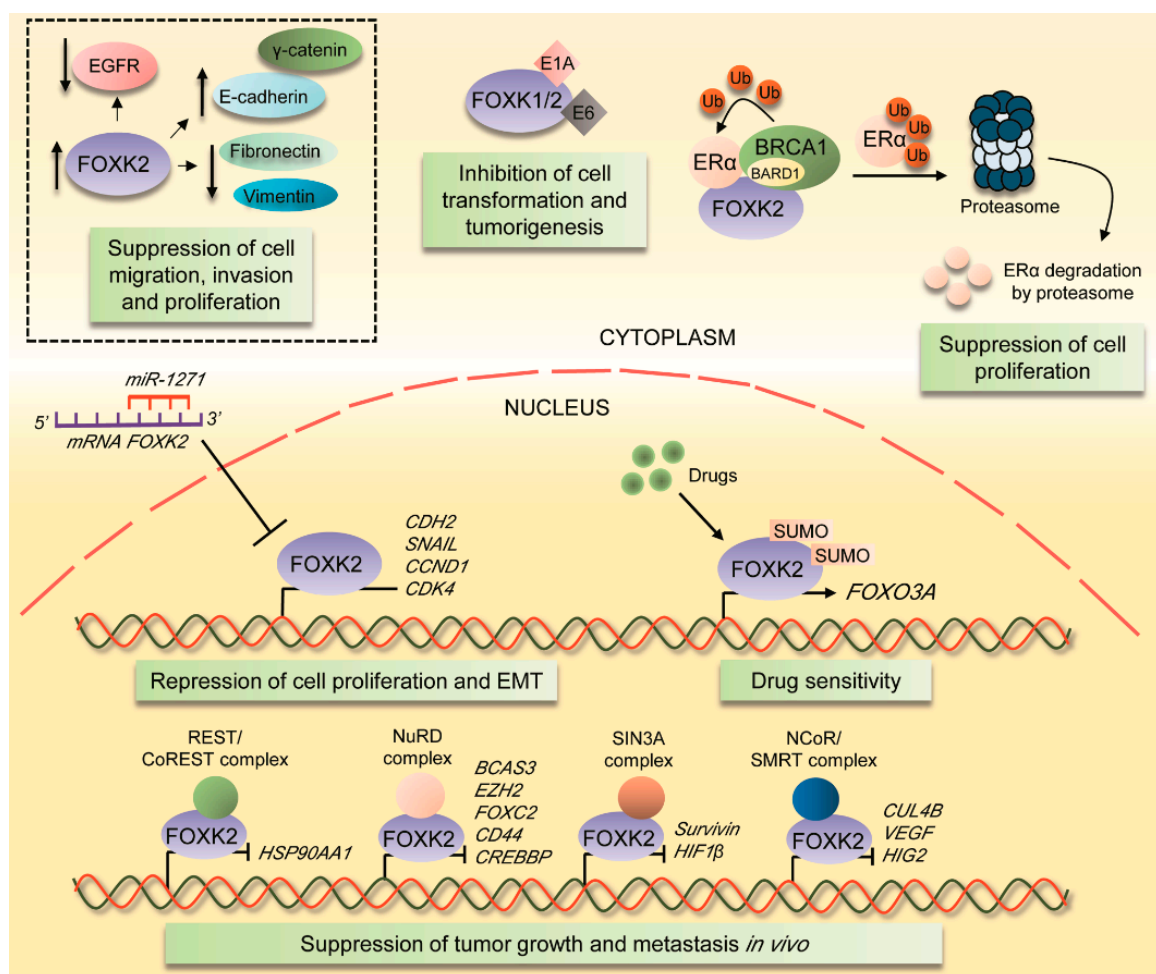
been associated with pseudohyphal growth, in which it has been shown to transcriptionally regulate genes involved in the M-phase transition [37]. Additionally, it has been demonstrated that Fkh2 is regulated in a cell-cycle dependent basis, being phosphorylated by Cdc28p, the major cyclin-dependent kinase in yeast [38]. Fkh2 phosphorylation appears to stabilize interactions of Fkh2 complexes with the co-activator protein Ndd1 at the chromatin level, directly controlling cell-cycle associated gene expression and activating transcription [38]. As Ndd1 is a target for Cdc5 (Plk1 in mammalian cells) [39], Fkh2 acts as a focal point for integrating cell cycle-dependent signals into a transcriptional response. Accordingly, FOXK2 has been identified as a target for CDK-cyclin complexes in human cells, in a study which reported that FOXK2 levels fluctuate in a cell cycle dependent manner, peaking during M phase [17]. Although located in the nucleus of asynchronous U2OS osteosarcoma cells, FOXK2 is excluded from DNA just following cell division, which is linked to decreased binding to the promoter of *MCM3* target gene, a key component of pre-replication complex [17]. In this study, serines 368 and 423 were identified as the major residues for FOXK2 phosphorylation by CDK/cyclin complexes (Figure 1), particularly CDK1 and cyclin B. CDK-mediated phosphorylation affects FOXK2 stability, induces its degradation and impairs its transcriptional activity (Figure 4) [17], providing the first insights into the role of post-translational modifications in the regulation of FOXK2 expression and function. Interestingly, mice lacking MNF—the mouse homologue of FOXK1—show defects in muscle development and regeneration following injury [40]. This further suggests that MNF/FOXK1 regulates genes involved in differentiation and/or proliferation of myogenic stem cells, thus being crucial for the determination of cell fate decisions. Of note, FOXK2 mRNA levels are upregulated upon skeletal muscle vibration stress in humans [41], indicating that there is much to be discovered on the relationship between FOXK transcription factors and muscular physiology.



**Figure 4.** FOXK2 role as an oncogene in cancer. FOXK2 is transcriptionally regulated by the *Sox9* oncogene and promotes proliferation of colorectal cancer cell lines. In this context, FOXK2 interacts with DVL, translocating it to the nucleus, and then promoting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. In agreement, FOXK2 overexpression promotes cell migration and proliferation in hepatocellular carcinoma, which is associated with high levels of Survivin, c-Myc, p27, cyclin D1 and phosphorylated AKT protein expression. A role in cell cycle progression has also been attributed to FOXK2, which is phosphorylated by CDK-cyclin complexes in a cell cycle dependent manner, in a process that induces its degradation and impairs its transcriptional activity following cell division. Box represents associations between FOXK2 and other molecules in studies involving overexpression and inhibition of FOXK2. PI3K, phosphoinositide 3-kinase; AKT, protein kinase B; Cyclin D1, regulator of cell cycle progression; p27, a cell cycle inhibitor; Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family; c-myc, proto-oncogene transcription factor; DVL, Dishevelled; Sox9, the sex-determining region Y box 9; TCF, T-Cell Factor; CDK, cyclin-dependent kinase; *CDKN1A*, gene encoding p21, a cell cycle inhibitor; P, phosphorylation site.

#### 4. Tumour-Specific Roles of FOXK2 as Either an Oncogene or Tumour Suppressor

The first report on the role of FOXK2 in cellular transformation came from the finding that interaction of the C-terminal region of the viral E1A protein with FOXK2 is required for adenoviral-mediated suppression of tumour formation in both in vitro and in vivo assays [18]. This study demonstrated that E1A interacts with FOXK1 and FOXK2, at least in part, through their FHA domain, in a process reliant on phosphorylated E1A levels. Not only the tumour-suppressive role of E1A, but also of E6 proteins from human papillomaviruses 21/14, is likely to depend on concomitant targeting of FOXK1 and FOXK2 via a conserved Thr-Ser-containing motif [18]. Taking into account that HPV14 and HPV21, the HPV subtypes which encode the E6 protein, are linked to benign cutaneous lesions, interaction of E6 proteins with FOXK1/K2 might favor viral infection and replication in epithelial cells over the oncogenic activities of other HPVs, therefore suppressing malignant transformation (Figure 5).



**Figure 5.** FOXK2 role as a tumor suppressor in cancer. FOXK transcription factors interact with E1A adenovirus proteins and E6 proteins from human papillomaviruses 21/14 suppressing malignant transformation. In breast cancer, FOXK2 acts as a scaffold protein between ER $\alpha$  and BARD1 leading to ubiquitin-mediated degradation of ER $\alpha$  and suppression of cell proliferation. Besides that, FOXK2 interacts with REST/CoREST, NuRD, SIN3A and NCoR/SMRT corepressor complexes to specifically repress different set of genes, inhibiting breast cancer tumorigenesis. Additionally, FOXK2 mediates the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents in breast cancer cells through the induction of FOXO3a expression, a process stimulated by SUMOylation of specific lysine residues in FOXK2 sequence. Consistently with the descriptions of FOXK2 as a tumor suppressor, it represses *CDH2*, *SNAIL*, *CCND1*



and *CDK4* genes to inhibit cell migration, invasion and proliferation in lung cancer, in which it has been described as a direct target for the miR-1271. Besides that, FOXX2 also suppresses tumorigenesis in clear-cell renal cell carcinoma, which is associated with decreased protein and mRNA levels of *EGFR* gene. Accordingly, FOXX2 overexpression is accompanied by an increase in epithelial markers and decrease in mesenchymal markers in some tumor models. Box represents associations between FOXX2 and other molecules in studies involving overexpression and inhibition of FOXX2. EGFR, epidermal growth factor receptor;  $\gamma$ -catenin and E-cadherin, epithelial markers; fibronectin and vimentin, mesenchymal markers; ER $\alpha$ , estrogen receptor- $\alpha$ ; BARD1, BRCA1-associated RING domain protein 1; BRCA1, breast cancer type 1 susceptibility protein; *CDH2*, gene encoding N-cadherin; SNAIL (or SNAI1), snail family transcriptional repressor 1; *CCND1*, gene encoding Cyclin D1; *CDK4*, gene encoding Cyclin Dependent Kinase 4; REST/CoREST complex, RE1 Silencing Transcription Factor (REST)/REST corepressor 1(CoREST) complex; NuRD complex, nucleosome remodeling and deacetylase complex; SIN3A complex, SIN3 Transcription Regulator Family Member A complex; NCoR/SMRT complex, Nuclear receptor corepressor 1 (NCoR)/ Nuclear Receptor Corepressor 2 (SMRT) complex; HSP90AA1, heat shock protein 90 alpha family class A member 1; BCAS3, microtubule associated cell migration factor; EZH2, enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit; FOXC2, forkhead box C2; CD44, cluster of differentiation 44; CREBBP, CREB binding protein; Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family; HIF1 $\beta$ , hypoxia inducible factor 1 subunit beta; CUL4B, cullin 4B; VEGF, vascular endothelial growth factor; HIG2 (or HILPDA), hypoxia inducible lipid droplet associated; FOXO3a, forkhead box O3; EMT, epithelial-mesenchymal transition; Ub, ubiquitination; SUMO, SUMOylation site.

The expression of FOXX2 has not been extensively addressed in normal and transformed human tissues. A report has shown that FOXX2 knockdown in non-neoplastic immortalized cell lines results in cell death and decreased proliferation and survival [42]. In the context of cancer research, evidence has emerged only in the last five years, with reports pointing to FOXX2 as a transcription factor with either oncogenic and tumour suppressing functions, as summarized in Tables 2 and 3.

**Table 2.** Genes regulated by FOXK2 in cancer models.

Human Cancer	Genes Regulated	Proteins Encoded	Technique	Effect on Transcription	Function	Oncogene or Tumour Suppressor	Models	References
Osteosarcoma	<i>CDKN1B, MCM3, CDC14A, KDM3A, KLF9, PDE7A</i> and <i>CAPN2</i>	p27, MCM3, CDC14A, KDM3A, KLF9, PDE7A and CAPN2	ChIP	Activation and repression	Regulation of gene networks involved in cell adhesion and motility, control of transcription and metabolism, apoptosis and cancer	N/A	Cell lines	[12]
Osteosarcoma	<i>CDKN1A</i>	p21	Luciferase assay	Repression	Implicated in cell cycle regulatory machinery, CDK phosphorylation of FOXK2 impacts cell viability	Oncogene	Cell lines	[17]
Breast cancer	<i>FOXO3A</i>	FOXO3a	ChIP, knockdown and overexpression	Activation	Mediates cytotoxic effects of paclitaxel and epirubicin	Tumour suppressor	Cell lines; invasive carcinoma patients samples	[43]
Breast cancer	<i>SURVIVIN, BCAS3, CUL4B, EZH2, FOXC2, HIFβ, CD44, VEGF, CREBBP, HIG2</i> and <i>HSP90AA1</i>	Survivin, BCAS3, CUL4B, EZH2, FOXC2, HIFβ, CD44, VEGF, CREBBP, HIG2 and HSP90AA1	ChIP-seq, qChIP and knockdown	Repression	Inhibits cell proliferation, migration and invasion in vitro and suppresses tumour growth and metastasis in vivo, mainly, by repressing hypoxia pathway	Tumour suppressor	Cell lines; xenograft tumours in SCID mice; breast carcinoma patients samples	[20]
Non-small cell lung cancer	<i>CDH2, SNAIL, CCND1</i> and <i>CDK4</i>	N-cadherin, SNAIL, Cyclin D1 and CDK4	ChIP-seq, qChIP, luciferase assays, knockdown and overexpression	Repression	Inhibits cell proliferation in part through induction of G1 arrest and suppresses EMT	Tumour suppressor	Cell lines; lung adenocarcinoma patients samples	[44]

FOXO3a, forkhead box O3; Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family; EZH2, enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit; BCAS3, microtubule associated cell migration factor; CUL4B, cullin 4B; FOXC2, forkhead box C2; HIF1β, hypoxia inducible factor 1 subunit beta; CD44, cluster of differentiation 44; VEGF, vascular endothelial growth factor; CREBBP, CREB binding protein; HIG2 (or HILPDA), hypoxia inducible lipid droplet associated; HSP90AA1, heat shock protein 90 alpha family class A member 1; SNAIL (or SNAI1), snail family transcriptional repressor 1; CDK4, Cyclin Dependent Kinase 4; CDKN1A—cyclin dependent kinase inhibitor 1A; MCM3, minichromosome maintenance complex component 3; CDC14A, cell division cycle 14A; KDM3A, lysine demethylase 3A; KLF9, Kruppel like factor 9; PDE7A, phosphodiesterase 7A; CAPN2, calpain 2; AXIN2, axis inhibition protein 2; LGR5, leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; ChIP, chromatin immunoprecipitation; ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; qChIP, quantitative chromatin immunoprecipitation; EMT, epithelial-mesenchymal transition.

**Table 3.** FOXX2 expression in samples from cancer patients.

Human Cancer	Number of Patients	Technique	% FOXX2 Overexpression	Subcellular Localization	Association with Clinical-Biological Parameters	Prognosis	Oncogene or Tumour Suppressor	Reference
Breast cancer	53 samples	IHC	47.2%	N/A	Negative association with ER $\alpha$ expression	N/A	Tumour suppressor	[19]
Breast cancer	86 samples	IHC	48.8%	Nuclear	Association with FOXO3a expression in samples from patients receiving chemotherapy; Association with ER $\alpha$ and tumour stage	Poor	Tumour suppressor	[43]
Breast cancer	140/25 samples	IHC/RT-PCR	N/A	N/A	FOXX2 mRNA and protein levels are downregulated in breast carcinomas compared to adjacent tissues; Negative correlation with EZH2 and HIF1 $\beta$ levels, histological grade and lymph node positivity	Favorable	Tumour suppressor	[20]
Clear-cell renal cell carcinoma	42 samples	IHC/qRT-PCR/Western blotting	50%	Nuclear	FOXX2 mRNA and protein levels are downregulated compared to adjacent non-tumour renal tissues	Favorable	Tumour suppressor	[45]
Gastric Cancer	150 samples	IHC	48.6%	N/A	FOXX2 mRNA levels downregulated in gastric cancer, compared to non-tumour tissues; FOXX2 protein expression associated with tumour differentiation	Favorable	Tumour suppressor	[46]
Glioma	151/46 samples	IHC/PCR	39.7%	N/A	FOXX2 expression downregulated in high-grade compared to low-grade gliomas and negatively associated with KI67 staining and tumour grade	Favorable	Tumour suppressor	[47]
Non-small cell lung cancer	50 samples	qRT-PCR	N/A	N/A	FOXX2 mRNA levels are downregulated in lung cancer, compared to non-tumour tissues	Favorable	Tumour suppressor	[44]
Colon cancer	200 samples	IHC	45.5%	Nuclear	FOXX2 is overexpressed compared to normal colon and associated with DVL nuclear expression	N/A	Oncogene	[21]
Colorectal Cancer	145 samples	IHC	48.9%	N/A	FOXX2 is overexpressed compared to normal tissues	Poor	Oncogene	[48]
Hepatocellular carcinoma	505/32/12 samples	IHC/qRT-PCR/Western blotting	54.1%	Nuclear	High FOXX2 expression is positively associated with tumour size, TNM stage and vascular invasion; FOXX2 mRNA levels are negatively associated with miR1271	Poor	Oncogene	[49]
Clear-cell renal cell carcinoma	525 samples	*TCGA	49.7%	N/A	FOXX2 gene expression as an independent prognostic factor and associated with tumour grade and gender	Poor	Oncogene	[50]

DVL: Dishevelled; ER $\alpha$ : estrogen receptor alpha; EZH2, enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit; FOXO3a, forkhead boxO3; HIF1 $\beta$ , hypoxia inducible factor 1 subunit beta; IHC: immunohistochemistry; qRT-PCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; TCGA: The Cancer Genome Atlas; N/A: Not analysed.

#### 4.1. FOXK2 Role as a Tumour Suppressor

One of the first studies on the role of FOXK2 in cancer showed that it interacts with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), a master regulator of breast cancer development [19]. FOXK2 interaction with ER $\alpha$  leads to decreased stability and ubiquitin-mediated degradation of ER $\alpha$ , dependently on the BRCA1-associated RING domain protein 1 (BARD1) catalytic subunit of BRCA ubiquitin ligase protein (Figure 5) [19]. FOXK2-ER $\alpha$  interaction is accompanied by reduced transcriptional regulation of ER $\alpha$  target genes and suppression of ER $\alpha$ -driven cell proliferation [19]. Corroborating these data, another study has shown that FOXK2 can mediate the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents in breast cancer cells [43]. Drug sensitization is dependent on FOXK2 binding to the promoter of the gene encoding FOXO3a transcription factor, which is associated with induction of FOXO3a expression (Figure 5). Conversely, the FOXK2-FOXO3a axis is deregulated in drug-resistance cell models, in which FOXK2 fails to be recruited to FOXO3a promoter, despite constitutively high expression levels [43]. In this context, FOXK2-mediated cytotoxic effects in breast cancer cells have been demonstrated to be stimulated by SUMOylation (Figure 5), in a study which identified two consensus SUMOylation motifs within the FOXK2 sequence [51]. FOXK2 transcriptional activity and drug sensitivity are impaired following transfections with a form of FOXK2 mutated for lysines 527 and 633, the major sites for SUMO conjugation (Figure 1). The identification of sites of modification that play a role in controlling FOXK2 activity provides further insight into the role of post-translational modifications in FOXK2 regulation. To further explore FOXK2 functions in breast tumorigenesis, Shan and colleagues [20] have demonstrated that FOXK2 knockdown remarkably increases breast cancer cell proliferation, induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances the invasive and migratory potential of breast cancer cells. Notably, FOXK2-depleted triple negative MDA-MB-231 cells injected in immunodeficient mice formed tumours exhibiting distant metastasis and increased growth rates, further confirming the data in the in vivo scenario [20]. FOXK2 interacts with multiple corepressor complexes, including nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors (NCoR)/SMRT, nucleosome remodeling deacetylase (NuRD), Sin3A and RE1-silencing transcription factor (REST)/CoREST, through its FHA domain and transcriptionally represses the expression of target genes, such as *Survivin*, *BCAS3*, *CUL4B*, *EZH2*, *FOXC2*, *HIF1b*, *CD44*, *VEGF*, *CREBBP*, *HIG2*, and *HSP90AA1* in a complex-specific manner (Figure 5) [20]. These data implicate FOXK2 in the suppression of hypoxia and breast carcinogenesis. Lastly, this study showed that the FOXK2 gene is transactivated by ER $\alpha$ , establishing a novel regulatory loop between FOXK2 and ER $\alpha$  and further pointing to a complex interrelationship between these proteins. It is important to highlight that FOXK2 has also been shown to play roles in triple negative models of breast cancer [20,43], suggesting that it might act independently of ER expression, through a still elusive mechanism. Altogether, this evidence strongly supports a tumour suppressive role for FOXK2 in breast cancer (Figure 5). Of note, FOXK1 has also been implicated in suppressing tumorigenesis in models of breast cancer [52], indicating that tumour suppression might be a conserved function within FOXK family members.

In agreement with the findings in breast cancer, FOXK2 has been implicated in suppressing tumorigenesis in clear-cell renal cell carcinoma [45]. FOXK2 overexpression significantly induces apoptotic features and inhibits cell growth in both in vitro and in vivo models of clear-cell renal cell carcinoma [45]. Also, the capacity of migration and invasion are impaired in FOXK2-overexpressing cells, which present decreased protein and mRNA levels of *EGFR* gene (Figure 5) [45]. This is consistent with data obtained in gastric cancer cells, where FOXK2 overexpression has been demonstrated to induce early apoptosis and inhibit cell growth, migration and invasion, which is accompanied by an E-cadherin increase and a N-cadherin decrease [46]. Similar conclusions have been derived from FOXK2 knockdown studies, where loss of FOXK2 promotes growth, invasion and migration in glioma cells, followed by modulation of expression of E-cadherin, N-cadherin and vimentin EMT markers [47]. Consistent with these findings, Chen and colleagues [44] have reported that FOXK2 overexpression in lung cancer-derived cell lines leads to upregulation of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin

along with downregulation of N-cadherin and vimentin (Figure 5), suggesting that FOXX2 might modulate the expression of epithelial and mesenchymal markers closely linked to the EMT process. FOXX2 depletion promotes cell migration, invasion and proliferation, via transcriptional upregulation of *CDH2*, *SNAIL*, *CCND1* and *CDK4*, identified as target genes (Figure 5) [44]. Interestingly, the *FOXX2* gene has been found to be methylated in circulating leukocytes of smokers in an epigenome-wide association study with nicotine equivalents [53]. This places epigenetic modifications as additional mechanisms for silencing *FOXX2* gene expression, which might have implications for the pathogenesis of lung cancer.

#### 4.2. FOXX2 Role as an Oncogene

Despite the roles described as a tumour suppressor, a few reports have attributed an oncogenic role for FOXX2. FOXX2 has been shown to interact with nuclear Dishevelled (DVL) in colon cancer activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [21]. FOXX2 overexpression translocates DVL to the nucleus, dependently on Wnt3a-mediated DVL phosphorylation, but not on the presence of its FOX DNA binding domain (Figure 4). FOXX2-deficient colon cancer cell lines are growth inhibited in both in vitro and in vivo settings. Conversely, FOXX2 conditional expression induces intestinal hyperproliferation [21]. Corroborating these data, Qian and colleagues [48] have reported that FOXX2 promotes proliferation of colorectal cancer cell lines and has its promoter transcriptionally regulated by the sex-determining region Y box 9 (SOX9) oncogenic protein (Figure 4) [48].

These findings suggest that FOXX2 might contribute to the formation of cancers originated from the colon and rectum. This is in agreement with a description on the oncogenic role for FOXX1 in colorectal cancer [54]. The gene targets involved in mediating FOXX2 oncogenic effects in colorectal cancer remain to be determined. In addition to colorectal cancer, FOXX2 has also been shown to act as an oncogene in hepatocellular carcinoma (HCC), in which it has been demonstrated to promote cell migration and proliferation with the involvement of the PI3K/AKT signaling pathway [49]. In this context, FOXX2 overexpression led to high levels of phosphorylated AKT, Survivin, c-Myc, p27 and cyclin D1 protein expression (Figure 4), an effect that was reversed following FOXX2 knockdown [49]. This study and another [44] also identified FOXX2 as a direct target for the microRNA-1271-5p [49], suggesting that FOXX2 is regulated upstream by both post transcriptional and post-translational modifications.

### 5. Prognostic Value of Assessing FOXX2 Expression in Cancer Patients

Since evidence on the role of FOXX2 in human cancer has only recently emerged, there is not much data available reporting FOXX2 expression in samples from cancer patients (Table 3). In breast cancer patient samples, FOXX2 expression has been analyzed by immunohistochemistry and around 50% positivity has been found [19,43]. In two studies, chi square tests have revealed an association between FOXX2 and ER $\alpha$  expression [19,43], which has not been confirmed by a third one [20]. Also, nuclear FOXX2 has been found to be associated with tumour stage and FOXO3a expression, particularly in samples from patients receiving chemotherapy [20,43]. Interestingly, FOXX2 expression is correlated with reduced disease-free survival in breast cancer patients, consistently with the in vitro data supporting the hypothesis that constitutively high expression levels of nuclear FOXX2 are closely associated with poor clinical outcome and drug resistance [43]. Nevertheless, Shan and colleagues [20] found FOXX2 expression downregulated in breast carcinomas comparatively to their adjacent tissues and correlated this with better survival curves. Some contrasting data observed in these studies might be explained by different patient cohorts and FOXX2 antibodies used, which possibly have distinct specificities and might detect diverse forms of FOXX2 protein, including still undiscovered modified forms. However, the experimental settings and the conclusions drawn in each study are supported by in vitro data and further confirm the role of FOXX2 as a tumour suppressor in breast cancer. Of note, FOXX2 and FOXO3a are evolutionarily closely linked [55] and therefore might

share functional similarities, regulating the same genes and co-operating with similar transcription factors [11].

FOXK2 mRNA expression has been found to be downregulated in high-grade, compared to low-grade glioma [47]. Also, FOXK2 protein expression is negatively associated with tumour grade and staining of KI-67 proliferation marker and positively correlated with favorable prognosis in both uni- and multivariate analysis [47]. A positive correlation of FOXK2 protein expression with good prognosis has also been observed in gastric cancer, in which FOXK2 levels have been seemingly associated with tumour differentiation [46]. A similar phenomenon occurs in samples of non-small lung cancer patients, where FOXK2 mRNA expression is downregulated, compared with non-neoplastic tissues [44]. Consistent with these findings, high FOXK2 expression has been significantly associated with better patient outcome in non-small lung cancer [44]. This pattern of differential expression between neoplastic and non-neoplastic tissues has been confirmed in clear-cell renal cell carcinoma patients, in which FOXK2 mRNA and protein levels are downregulated compared to adjacent non-tumour renal tissues. Low FOXK2 expression is associated with worse disease-free survival and is revealed as an independent prognostic marker [45]. Contrasting this finding, FOXK2 gene expression has been correlated with poor prognosis and associated with gender and tumour grade in a cohort of clear-cell renal cell carcinoma from The Cancer Genome Atlas (TCGA) [50]. It is therefore currently unclear whether FOXK2 functions as a tumour suppressor or oncogene in this cancer type.

Contrasting with the data described above, FOXK2 protein expression has been found elevated in 45.5% colon carcinoma patient samples, compared to normal colon, and this is associated with nuclear DVL expression [21]. The same pattern of differential expression of FOXK2 has been found in a cohort of colorectal cancer, with a 49% high staining positivity [48]. FOXK2 expression has been linked to poor prognosis and associated with SOX9 expression, with patients co-expressing both FOXK2 and Sox9 presenting the worst survival curves [48]. Additionally, FOXK2 protein and mRNA levels have been found upregulated in hepatocellular carcinoma, compared to non-tumorous liver counterpart [49]. Significant associations have been observed between FOXK2 protein expression and clinical-pathological characteristics, such as tumour size, TNM stage and vascular invasion. Also, a negative correlation has been established between FOXK2 mRNA and the tumour suppressor miR1271 in HCC patient samples [49]. Most importantly, HCC patients presenting high FOXK2 protein expression exhibit worse survival in both uni- and multivariate analysis, pointing to FOXK2 as an independent predictor of poor prognosis in this type of cancer [49]. Altogether, these studies clearly link the FOXK2 transcription factor to a poor outcome in HCC and colorectal cancer patients.

Overall, there is a complicated picture emerging where FOXK2 expression may have prognostic or diagnostic value but this is likely highly tumour specific and even then, may only apply to sub-types of the particular tumour and/or to particular therapeutic regimes.

## 6. Concluding Remarks and Perspectives

Further validation of the role of FOXK2 in different cancers will be necessary to establish whether FOXK2 staining or gene expression analysis might be of clinical utility as a prognostic or predictive biomarker. Likewise, the observation concerning FOXK2 differential roles in specific types of cancer is an intriguing finding, and further work on why this might be the case is needed. The recent contribution on the role of FOXK2 in the upregulation of aerobic glycolysis and glucose uptake not only in adipocytes and myocytes, but also in neuroblastoma and hypopharynx cancer cells [29], gives us insights into its function as an oncogene, particularly considering the importance of this metabolic pathway for tumour growth and metabolism. Also, the functional link between FOXK2 and autophagy [15] might potentially explain some of these findings, in face of the emerging and paradoxical roles of autophagy as either a type of cell death or a survival route in cancer, in a cell-type specific manner [56]. However, we generally lack data on the biological effects resulting from the complex interactions that FOXK2 establishes at the chromatin level. It would be noteworthy to assess, for example, classical autophagic features, such as vacuolization, LC3 lipidation and p62 staining,

following disruption of FOXK2 protein interactions and binding to promoters of genes involved in autophagy. This would also apply to interactions of FOXK2 with AP-1 and BAP1, whose resultant cellular effects have not been further explored, despite unquestionable involvement in the regulation of critical gene networks [12,14]. Clearly, the confusing picture concerning the role of FOXK2 as either an oncogene or a tumour suppressor might be closely dependent on the molecular role that FOXK2 plays in each cell type and the signaling pathways with which it connects. Therefore, distinct functions may result in divergent effects in cancer, which might tip the balance according to which molecular role is dominant in a certain context. Also, FOXK2 can act as both a repressor and an activator of gene transcription depending mainly on the interaction partners and the regulated genes. Thus, a better understanding of FOXK2 upstream regulatory mechanisms as well as the identification of FOXK2 binding partners at the chromatin level and target genes regulated in each cell type might shed some light upon this issue. Also important is the assessment of similar signaling pathways across studies with different cancer types and their relationship with FOXK2 activity would be useful for direct comparison. It is reasonable to highlight that FOXK2 mRNA undergoes alternative splicing, generating three isoforms with unknown expression patterns in tissues from different origins. Therefore, it is reasonable to speculate that FOXK2 isoforms might possibly have distinct functions in different tissues, which could explain, at least in part, the dichotomous cell-dependent functions in tumorigenesis. Finally, we should not exclude the existence of as yet undiscovered potential amplifications or chromosomal translocations involving the *FOXK2* gene. Similarly, it is possible that the *FOXK2* gene is mutated in cancer, encoding either gain or loss-of-function mutant protein forms with further implications for the biology and opposing outcomes observed in different cancers.

Although there is much to be deciphered on FOXK2 biology, emerging evidence clearly links the deregulation of FOXK2 expression and function to tumorigenesis, in a cell-type specific manner. Moreover, FOXK2 has been increasingly implicated in the regulation of gene networks associated with the hallmarks of cancer, particularly those involved in cell fate decisions. Future research should attempt to uncover the missing links associated with FOXK2 roles in cancer. A better elucidation on the mechanisms of regulation of FOXK2 and how it regulates gene transcription to suppress or sustain carcinogenesis could potentially make FOXK2 an attractive target for future antineoplastic intervention.

**Author Contributions:** All authors have contributed to writing, revised and approved the final form of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by L'óreal-ABC-UNESCO Para Mulheres na Ciência: N/A.

**Acknowledgments:** Work currently conducted by G.N. is supported by grants from L'óreal-UNESCO-ABC Para Mulheres na Ciência. R.C.M. is supported by CNPq Produtividade (304565/2016-4) and Programa de Oncobiologia (2018). Lam's work is supported by MRC (MR/N012097/1), CRUK (C37/A12011; C37/A18784), Breast Cancer Now (2012MayPR070; 2012NovPhD016), the Cancer Research UK Imperial Centre, Imperial ECMC and NIHR Imperial BRC. Work in the A.D.S. lab was supported by the BBSRC and Wellcome Trust. L.d.T.C. is supported by a CNPq fellowship.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AP-1	activator protein-1
BAP-1	BRCA1-associated protein 1
BARD-1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BRCA-1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
ChIP	chromatin immunoprecipitation
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ER $\alpha$	estrogen receptor alpha
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FOX	forkhead BOX
FOXK1	forkhead box K1
FOXK2	forkhead box K2

FOXO3a	forkhead box O3
FHA	forkhead associated domain
Gsk3	glycogen synthase kinase 3
HCC	hepatocellular carcinoma
HIF1 $\alpha$	hypoxia-inducing factor 1 alpha
HIV	human immunodeficiency virus
HDAC	histone deacetylase
HPV	human papillomavirus
IL-2	interleukin-2
ILF	interleukin-enhancer binding factor
MBD	methyl binding domain protein
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCoR/SMRT	nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors
NFAT	nuclear factor of activating cells
NLS	nuclear localization signal
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase
NURD	nucleosome remodeling deacetylase
PR-DUB	Polycomb repressive deubiquitinase
REST	RE1-silencing transcription factor
SOX9	Sex-determining region Y box 9
TCGA	The Cancer Genome Atlas

## References

1. Kaestner, K.H.; Knochel, W.; Martinez, D.E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 142–146. [[PubMed](#)]
2. Lam, E.W.; Brosens, J.J.; Gomes, A.R.; Koo, C.Y. Forkhead box proteins: Tuning forks for transcriptional harmony. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 482–495. [[CrossRef](#)]
3. Li, C.; Lai, C.F.; Sigman, D.S.; Gaynor, R.B. Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7739–7743. [[CrossRef](#)]
4. Nirula, A.; Moore, D.J.; Gaynor, R.B. Constitutive binding of the transcription factor interleukin-2 (IL-2) enhancer binding factor to the IL-2 promoter. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7736–7745. [[CrossRef](#)]
5. Li, C.; Lusic, A.J.; Sparkes, R.; Nirula, A.; Gaynor, R. Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein ILF. *Genomics* **1992**, *13*, 665–671. [[CrossRef](#)]
6. Hackmann, K.; Stadler, A.; Schallner, J.; Franke, K.; Gerlach, E.M.; Schrock, E.; Rump, A.; Fauth, C.; Tinschert, S.; Oexle, K. Severe intellectual disability, West syndrome, Dandy-Walker malformation, and syndactyly in a patient with partial tetrasomy 17q25.3. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2013**, *161*, 3144–3149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Crujeiras, A.B.; Pissios, P.; Moreno-Navarrete, J.M.; Diaz-Lagares, A.; Sandoval, J.; Gomez, A.; Ricart, W.; Esteller, M.; Casanueva, F.F.; Fernandez-Real, J.M. An Epigenetic Signature in Adipose Tissue Is Linked to Nicotinamide N-Methyltransferase Gene Expression. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, e1700933. [[CrossRef](#)]
8. Reinhardt, H.C.; Yaffe, M.B. Phospho-Ser/Thr-binding domains: Navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 563–580. [[CrossRef](#)]
9. Almawi, A.W.; Matthews, L.A.; Guarne, A. FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2017**, *127*, 105–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Katoh, M.; Katoh, M. Identification and characterization of human FOXK1 gene in silico. *Int. J. Mol. Med.* **2004**, *14*, 127–132. [[CrossRef](#)]
11. Chen, X.; Ji, Z.; Webber, A.; Sharrocks, A.D. Genome-wide binding studies reveal DNA binding specificity mechanisms and functional interplay amongst Forkhead transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1566–1578. [[CrossRef](#)]
12. Ji, Z.; Donaldson, I.J.; Liu, J.; Hayes, A.; Zeef, L.A.; Sharrocks, A.D. The forkhead transcription factor FOXK2 promotes AP-1-mediated transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 385–398. [[CrossRef](#)]



13. Hess, J.; Angel, P.; Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: Quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 5965–5973. [[CrossRef](#)]
14. Ji, Z.; Mohammed, H.; Webber, A.; Ridsdale, J.; Han, N.; Carroll, J.S.; Sharrocks, A.D. The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6232–6242. [[CrossRef](#)]
15. Bowman, C.J.; Ayer, D.E.; Dynlacht, B.D. Foxk proteins repress the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs. *Nat. Cell Boil.* **2014**, *16*, 1202–1214. [[CrossRef](#)]
16. Baymaz, H.I.; Fournier, A.; Laget, S.; Ji, Z.; Jansen, P.W.; Smits, A.H.; Ferry, L.; Mensinga, A.; Poser, I.; Sharrocks, A.; et al. MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. *Proteomics* **2014**, *14*, 2179–2189. [[CrossRef](#)]
17. Marais, A.; Ji, Z.; Child, E.S.; Krause, E.; Mann, D.J.; Sharrocks, A.D. Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK.cyclin complexes. *J. Boil. Chem.* **2010**, *285*, 35728–35739. [[CrossRef](#)]
18. Komorek, J.; Kuppuswamy, M.; Subramanian, T.; Vijayalingam, S.; Lomonosova, E.; Zhao, L.J.; Mymryk, J.S.; Schmitt, K.; Chinnadurai, G. Adenovirus type 5 E1A and E6 proteins of low-risk cutaneous beta-human papillomaviruses suppress cell transformation through interaction with FOXK1/K2 transcription factors. *J. Virol.* **2010**, *84*, 2719–2731. [[CrossRef](#)]
19. Liu, Y.; Ao, X.; Jia, Z.; Bai, X.Y.; Xu, Z.; Hu, G.; Jiang, X.; Chen, M.; Wu, H. FOXK2 transcription factor suppresses ERalpha-positive breast cancer cell growth through down-regulating the stability of ERalpha via mechanism involving BRCA1/BARD1. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8796. [[CrossRef](#)]
20. Shan, L.; Zhou, X.; Liu, X.; Wang, Y.; Su, D.; Hou, Y.; Yu, N.; Yang, C.; Liu, B.; Gao, J.; et al. FOXK2 Elicits Massive Transcription Repression and Suppresses the Hypoxic Response and Breast Cancer Carcinogenesis. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 708–722. [[CrossRef](#)]
21. Wang, W.; Li, X.; Lee, M.; Jun, S.; Aziz, K.E.; Feng, L.; Tran, M.K.; Li, N.; McCrea, P.D.; Park, J.I.; et al. FOXKs promote Wnt/beta-catenin signaling by translocating DVL into the nucleus. *Dev. Cell* **2015**, *32*, 707–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Carbone, M.; Yang, H.; Pass, H.I.; Krausz, T.; Testa, J.R.; Gaudino, G. BAP1 and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chittock, E.C.; Latwiel, S.; Miller, T.C.; Muller, C.W. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 193–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Okino, Y.; Machida, Y.; Frankland-Searby, S.; Machida, Y.J. BRCA1-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase antagonizes the ubiquitin-mediated activation of FoxK2 target genes. *J. Boil. Chem.* **2015**, *290*, 1580–1591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhao, J.; Brault, J.J.; Schild, A.; Cao, P.; Sandri, M.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. FoxO<sub>3</sub> coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 472–483. [[CrossRef](#)]
26. Shi, X.; Garry, D.J. Sin<sub>3</sub> interacts with Foxk<sub>1</sub> and regulates myogenic progenitors. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *366*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yang, Q.; Kong, Y.; Rothermel, B.; Garry, D.J.; Bassel-Duby, R.; Williams, R.S. The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian sin3B. *Biochem. J.* **2000**, *345 Pt 2*, 335–343. [[CrossRef](#)]
28. He, L.; Gomes, A.P.; Wang, X.; Yoon, S.O.; Lee, G.; Nagiec, M.J.; Cho, S.; Chavez, A.; Islam, T.; Yu, Y.; et al. mTORC<sub>1</sub> Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 949–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sukonina, V.; Ma, H.; Zhang, W.; Bartesaghi, S.; Subhash, S.; Heglind, M.; Foy, H.; Betz, M.J.; Nilsson, D.; Lidell, M.E.; et al. FOXK1 and FOXK2 regulate aerobic glycolysis. *Nature* **2019**, *566*, 279–283. [[CrossRef](#)]
30. Spruijt, C.G.; Gnerlich, F.; Smits, A.H.; Pfaffeneder, T.; Jansen, P.W.; Bauer, C.; Munzel, M.; Wagner, M.; Muller, M.; Khan, F.; et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **2013**, *152*, 1146–1159. [[CrossRef](#)]
31. Iurlaro, M.; Ficuz, G.; Oxley, D.; Raiber, E.A.; Bachman, M.; Booth, M.J.; Andrews, S.; Balasubramanian, S.; Reik, W. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Boil.* **2013**, *14*, R119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Du, Q.; Luu, P.L.; Stirzaker, C.; Clark, S.J. Methyl-CpG-binding domain proteins: Readers of the epigenome. *Epigenomics* **2015**, *7*, 1051–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fujii, Y.; Nakamura, M. FOXK2 transcription factor is a novel G/T-mismatch DNA binding protein. *J. Biochem.* **2010**, *147*, 705–709. [[CrossRef](#)]
34. Liu, J.; Lee, J.B.; Fishel, R. Stochastic Processes and Component Plasticity Governing DNA Mismatch Repair. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4456–4468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yu, H.; Pak, H.; Hammond-Martel, I.; Ghram, M.; Rodrigue, A.; Daou, S.; Barbour, H.; Corbeil, L.; Hebert, J.; Drobetsky, E.; et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, J.; Coic, E.; Lee, K.; Lee, C.S.; Kim, J.A.; Wu, Q.; Haber, J.E. Regulation of budding yeast mating-type switching donor preference by the FHA domain of Fkh1. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhu, G.; Spellman, P.T.; Volpe, T.; Brown, P.O.; Botstein, D.; Davis, T.N.; Futcher, B. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* **2000**, *406*, 90–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pic-Taylor, A.; Darieva, Z.; Morgan, B.A.; Sharrocks, A.D. Regulation of cell cycle-specific gene expression through cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of the forkhead transcription factor Fkh2p. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 10036–10046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Darieva, Z.; Bulmer, R.; Pic-Taylor, A.; Doris, K.S.; Geymonat, M.; Sedgwick, S.G.; Morgan, B.A.; Sharrocks, A.D. Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature* **2006**, *444*, 494–498. [[CrossRef](#)]
40. Garry, D.J.; Meeson, A.; Elterman, J.; Zhao, Y.; Yang, P.; Bassel-Duby, R.; Williams, R.S. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5416–5421. [[CrossRef](#)]
41. Petrie, M.A.; Kimball, A.L.; McHenry, C.L.; Suneja, M.; Yen, C.L.; Sharma, A.; Shields, R.K. Distinct Skeletal Muscle Gene Regulation from Active Contraction, Passive Vibration, and Whole Body Heat Stress in Humans. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. van der Heide, L.P.; Wijchers, P.J.; von Oerthel, L.; Burbach, J.P.; Hoekman, M.F.; Smidt, M.P. FoxK2 is required for cellular proliferation and survival. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 1013–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Nestal de Moraes, G.; Khongkow, P.; Gong, C.; Yao, S.; Gomes, A.R.; Ji, Z.; Kandola, N.; Delbue, D.; Man, E.P.; Khoo, U.S.; et al. Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer. *Oncogenesis* **2015**, *4*, e167. [[CrossRef](#)]
44. Chen, S.; Jiang, S.; Hu, F.; Xu, Y.; Wang, T.; Mei, Q. Foxk2 inhibits non-small cell lung cancer epithelial-mesenchymal transition and proliferation through the repression of different key target genes. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 2335–2347. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, F.; Ma, X.; Li, H.; Zhang, Y.; Li, X.; Chen, L.; Guo, G.; Gao, Y.; Gu, L.; Xie, Y.; et al. FOXK2 suppresses the malignant phenotype and induces apoptosis through inhibition of EGFR in clear-cell renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **2018**, *142*, 2543–2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liu, X.; Wei, X.; Niu, W.; Wang, D.; Wang, B.; Zhuang, H. Downregulation of FOXK2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 4356–4364. [[CrossRef](#)]
47. Wang, B.; Zhang, X.; Wang, W.; Zhu, Z.; Tang, F.; Wang, D.; Liu, X.; Zhuang, H.; Yan, X. Forkhead box K2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of human glioma cells and predicts a favorable prognosis. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 1067–1075. [[CrossRef](#)]
48. Qian, Y.; Xia, S.; Feng, Z. Sox9 mediated transcriptional activation of FOXK2 is critical for colorectal cancer cells proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 475–481. [[CrossRef](#)]
49. Lin, M.F.; Yang, Y.F.; Peng, Z.P.; Zhang, M.F.; Liang, J.Y.; Chen, W.; Liu, X.H.; Zheng, Y.L. FOXK2, regulated by miR-1271-5p, promotes cell growth and indicates unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *88*, 155–161. [[CrossRef](#)]
50. Jia, Z.; Wan, F.; Zhu, Y.; Shi, G.; Zhang, H.; Dai, B.; Ye, D. Forkhead-box series expression network is associated with outcome of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 8669–8680. [[CrossRef](#)]
51. Nestal de Moraes, G.; Ji, Z.; Fan, L.Y.; Yao, S.; Zona, S.; Sharrocks, A.D.; Lam, E.W. SUMOylation modulates FOXK2-mediated paclitaxel sensitivity in breast cancer cells. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Sun, T.; Wang, H.; Li, Q.; Qian, Z.; Shen, C. Forkhead box protein k1 recruits TET1 to act as a tumor suppressor and is associated with MRI detection. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2016**, *46*, 209–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Park, S.L.; Patel, Y.M.; Loo, L.W.M.; Mullen, D.J.; Offringa, I.A.; Maunakea, A.; Stram, D.O.; Siegmund, K.; Murphy, S.E.; Tiirikainen, M.; et al. Association of internal smoking dose with blood DNA methylation in three racial/ethnic populations. *Clin. Epigenet.* **2018**, *10*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wu, M.; Wang, J.; Tang, W.; Zhan, X.; Li, Y.; Peng, Y.; Huang, X.; Bai, Y.; Zhao, J.; Li, A.; et al. FOXP1 interaction with FHL2 promotes proliferation, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Myatt, S.S.; Lam, E.W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 847–859. [[CrossRef](#)]
56. Onorati, A.V.; Dyczynski, M.; Ojha, R.; Amaravadi, R.K. Targeting autophagy in cancer. *Cancer* **2018**, *124*, 3307–3318. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).