

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/01/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

RENATO PETITTO NETTO

**Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus*
HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de
glioblastoma**

ARARAQUARA, SP

2018

RENATO PETITTO NETTO

**Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus*
HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de
glioblastoma**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biologia Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Valente

ARARAQUARA, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- P491c** Petitto Netto, Renato
 Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus* HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de glioblastoma / Renato Petitto Netto. – Araraquara, 2018.
 57 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Biologia Molecular.
- Orientador: Valéria Valente.
1. Glioblastoma. 2. HJURP. 3. Transcritos. 4. Isoformas. I. Valente, Valeria, orient.
 II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo locus HJURP (Holliday Junction Recognizing-Protein) em células de glioblastoma

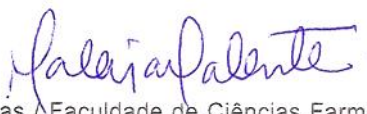
AUTOR: RENATO PETITTO NETTO

ORIENTADORA: VALERIA VALENTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA VALENTE

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, reading "Valeria Valente".

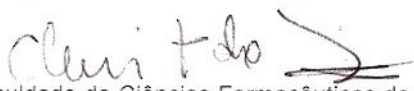
Profa. Dra. JOSANE DE FREITAS SOUSA

Departamento de Genética / Faculdade de Medicina do Câmpus de Ribeirão Preto da USP

A handwritten signature in blue ink, reading "Josane de Freitas Sousa".

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, reading "Cleslei Fernando Zanelli".

Araraquara, 30 de janeiro de 2018

*Dedico este trabalho à Deus e meus
familiares, que sempre estiveram
presentes dando suporte durante todo o
período de estudos.*

DEDICATÓRIA

A Deus, pela proteção, ensinamentos e realizações em minha vida.

Aos meus pais, Ednilson e Selma, pelo amor/apoio incondicional e confiança durante todos os momentos.

A minha irmã, Isabella, pelo apoio e amizade por todos os momentos da vida.

À meus avós, Vilma, Renato, Conceição e Silvio pelo imenso carinho e zelo.

A Bruna, pelo companheirismo e cumplicidade durante toda faculdade.

À professora Valeria, pelos ensinamentos e cuidados na tarefa de educar.

Aos meus colegas de laboratório Rodolfo, Juliana F., Luis, Geovana, Barbara, Juliana S., Rodrigo, Felipe, Marcos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, FAPESP (2013/13465-1), CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum e mortal de tumor cerebral, sendo que os pacientes apresentam uma sobrevida média de apenas 14 meses. O tratamento é realizado com remoção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia, porém sua eficácia é muito reduzida devido a acelerada atividade proliferativa e elevada resistência das células tumorais aos agentes genotóxicos. Dados do nosso grupo sustentam a hipótese de que este quadro pode estar associado em parte ao ganho de competência na atividade de reparo de DNA. Demonstramos anteriormente que, a HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*), uma proteína envolvida em reparo de DNA e montagem da cromatina centromérica, está superexpressa nos astrocitomas e que seus altos níveis de expressão estão correlacionados com o pior prognóstico dos pacientes. Dados da literatura evidenciam a existência de três RNAs mensageiros para o *locus* HJURP. O maior deles, denominado *hjurp1*, apresenta 9 éxons e codifica a isoformaprotéica A, que contém 748 aminoácidos. Os transcritos 2 e 3 apresentam deleção de alguns éxons, codificando proteínas hipoteticamente menores. Embora existam vários cDNAs depositados no *GenBank* que corroboram a expressão destes três mRNAs, não há dados na literatura sobre seu padrão de expressão ou a funcionalidade destas isoformas. Sendo assim, neste projeto avaliamos a expressão dos diferentes transcritos do *locus* HJURP em células de GBM, amostras de diferentes graus de astrocitoma, pares de linhagens de diferentes tipos não tumorais/tumorais e amostra de diferentes tecidos não tumorais. Através de PCR convencional detectamos as três isoformas nos astrócitos não tumorais (ACBRI371) e nas linhagens tumorais U87MG, U138MG e U251MG. Porém, as linhagens T98G e U343MG apresentaram variações, sendo que nas células T98G foram detectadas somente as isoformas 1 e 3, e nas células U343MG apenas a isoforma 1. Através de análise por PCR quantitativo, observamos que as linhagens de GBM apresentam um aumento marcante na expressão dos três transcritos de HJURP quando comparados aos astrócitos não tumorais ACBRI371. Como esperado, as células T98G apresentaram os maiores níveis de HJURP, sendo que a expressão dos três transcritos está aumentada. Além disso, percebemos que o transcrito *hjurp1* é de fato bem mais abundante que as isoformas 2 e 3 nas linhagens celulares. Embora tenha sido observado um significativo aumento global para todas as isoformas nas amostras tumorais (tumores *versus* substância branca), percebemos que a isoforma 2 é mais abundante que a 1 no tecido não tumoral e astrocitomas de baixo grau (AST2), porém há um ganho de expressão da isoforma 1, que não é acompanhado pela isoforma 2, nas amostras de astrocitomas de grau 3 (AST3) e GBM, criando perfis de expressão característicos da progressão tumoral. Análises de expressão de um painel de tecidos não tumorais e pares de linhagens tumorais e não tumorais de outras origens, mostraram resultados similares, consolidando a existência de uma desregulação nos transcritos de HJURP que favorece a expressão da isoforma 1 nas células tumorais. Ensaios recentes demonstraram que o silenciamento dirigido ao transcrito 1 de HJURP nas linhagens U87MG e T98G, parece estimular a expressão da HJURP 2 e mostra um impacto reduzido sobre a viabilidade celular, quando comparado ao silenciamento da proteína HJURP total. Esses dados sugerem que as isoformas 2 e 3 estão ativas e auxiliam na manutenção da viabilidade celular em linhagens de GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma. HJURP. Transcritos. Isoformas.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal brain tumor in humans, with a median survival rate of ~ 14 months. Standard optimized treatment implies in surgery, followed by radiation and chemotherapy, but it has low efficacy due to tumor fast proliferative activity and high resistance against genotoxic agents. Preliminary data from our group showed that HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein), a protein which plays a central role in chromatin assembly and is related to take part in double-stranded DNA breaks (DSBs) repair, is overexpressed in astrocytomas. High levels of this protein have been associated with patient poor prognosis. According to the literature, three transcript variants are predicted to encode HJURP gene. The variant (2) and (3) differ from the main splice variant (1) by the exclusion of some exons, generated by exon skipping. Although many cDNA sequences have been deposited on GeneBank database, it is still unclear their functions and expression pattern among tumors. Thus, in this work, we aimed to evaluate the expression of the three variants of HJURP gene in GBM cells, patient samples of different grades of astrocytoma, and different tumor and non-tumor cell lines. Expression of all transcripts was confirmed by conventional PCR in non-tumoral astrocytes (ACBRI371) and GBM cell lines (U87MG, U138MG, and U251MG). However, T98G and U343MG showed a distinct pattern. The variant (1) was detected in both cell lines, but the variant (3) was only detectable in T98G cells. Using quantitative PCR (q-PCR) we demonstrated that all transcripts were expressed at higher levels in GBM cells than in non-tumoral astrocytes. As we expected, T98G showed the highest levels of HJURP expression (variants 1,2 and 3). We also observed that variant (1) is more abundant in the cell lines. Albeit, there was an overall increase of all variants in tumor samples when compared to the brain white matter. We demonstrated that variant (2) is more prevalent than variant (1) in non-tumoral tissues and low-grade astrocytomas (AST2). In contrast, anaplastic astrocytoma (AST3) and GBM showed a considerable increase in variant (1) levels, arising a characteristic profile of tumor progression. Expression analyses of a panel of tumor and non-tumoral cell lines from distinct origins confirmed our previously described finding. Recent data demonstrated that transcript (1) silencing of U87MG and T98G may stimulate transcript (2) expression and it shows the low impact on cell viability when compared to total HJURP silencing. These data suggest that variants (2) and (3) are functional and assist in GBM cell viability maintenance.

Keywords: Glioblastoma. HJURP. Transcripts.Isoforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recrutamento de HJURP para a região de dano ao DNA após irradiação com microlaser

Figura 2. Representação esquemática do padrão éxon/intron dos três diferentes mRNAs expressos pelo locus HJURP

Figura 3. Predição esquemática das isoformas proteicas hipotéticas de HJURP

Figura 4. Produtos de amplificação correspondentes às isoformas de HJURP obtidos em diferentes concentrações de íons magnésio

Figura 5. Produtos de amplificação correspondente às isoformas de HJURP em astrócitos não tumorais e linhagens

Figura 6. Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação dos primers para *HPRT*, *HJURP1*, *HJURP1#2*, *HJURP2*, *HJURP3*

Figura 7. A expressão relativa dos três transcritos de HJURP é aumentada nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371

Figura 8. Expressão relativa de cada transcrito em relação ao transcrito *HJURP1* nas linhagens celulares de GBM e astrócitos não tumorais

Figura 9. A expressão dos transcritos do locus *HJURP* é aumentada nas linhagens tumorais em relação ao sua linhagem não tumoral

Figura 10. Expressão relativa de cada transcrito do locus *HJURP* em relação a *HJURP1* em diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais

Figura 11. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tumores cerebrais (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito no grupo de tecido

Figura 12. Expressão relativa média dos transcritos de HJURP nos grupos tecido cerebral não tumoral (SB) e amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST3 e GBM) em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

Figura 13. Expressão relativa dos transcritos *HJURP2* e *HJURP3* em diferentes amostras de tecido não tumoral em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

Figura 14. Silenciamento dirigido aos transcritos *HJURP1*, *HJURP2* e *HJURP3* através da transfecção com siRNAs

Figura 15. Silenciamento dirigido a isoforma *HJURP1* através da transfecção com siRNA

Figura 16. Silenciamento dirigido a isoforma HJURP1 através da transfecção com siRNA

Figura 17. A manutenção da expressão das isoformas HJURP2 e HJURP3 impede a ativação de senescência em células U87MG

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de origem e caracterização genética das linhagens utilizadas

Tabela 2. Classificação das amostras tumorais e dados clínicos dos pacientes

Tabela 3. Primers utilizados para RT-PCR convencional

Tabela 4. Primers utilizados para RT-qPCR quantitativo

Tabela 5. Oligonucleotídeos de RNA utilizados para silenciamento de mRNA

Tabela 6. Padronização da concentração ótima dos primers para *HPRT*

Tabela 7. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP1*

Tabela 8. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP1#2*

Tabela 9. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP2*

Tabela 10. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP3*

Tabela 11. Expressão relativa média dos transcritos de *HJURP* nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371

Tabela 12. Expressão relativa de cada transcrito do locus *HJURP* nos grupos de tecido cerebral não tumoral (SB) e tumores de diferentes graus (AST 2, AST3 e GBM)

Tabela 13. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito do grupo de tecido cerebral não tumoral (SB)

Tabela 14. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* nos grupos tecido cerebral não tumoral (SB) e amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST3 e GBM) em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBRI371 – Astrócitos não tumorais

AST2 – Astrocitoma de grau 2

AST3 – Astrocitoma de grau 3

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR - Ataxia Telangiectasia and RAD 3 Related

A549 – Linhagem tumoral de pulmão

cDNA – complementary DNA

CDK1/2 - Cyclin-Dependent Kinase 1/2

CDK4 - Cyclin-Dependent Kinase 4

CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CENP-A – Centromereprotein A

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGFR - EpidermalGrowthFactor Receptor

G2/M – Fases do ciclo celular

GBM - Glioblastoma

HACAT – Linhagem não tumoral de colo de útero

HELA – Linhagem de adenocarcinoma cervical

HJURP - Holliday Junction Recognizing Protein

hMSHJ- mutS Homolog 5

HPRT - HypoxanthinePhosphoribosyltransferase

IDH1 - IsocitrateDehydrogenase 1

MCF10-2A – Linhagem não tumoral de mama

MDM2 - E3 Ubiquitin Protein Ligase

MRC-5 – Linhagem não tumoral de pulmão

mRNA - Messenger RNA

NBS1 - Nibrin

NF1 - Neurofibromin 1

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDGFRA - Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PI3K- Phosphoinositide 3 - Kinase

PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction

Rb – Retinoblastoma protein

RNA – Ácido Ribonúcleico

RNA seq– Sequenciamento de Ácido Ribonúcleico

RTK- Receptor Tyrosine Kinase

SIHA – Linhagem tumoral de colo de útero

SK-BR-3 - Linhagem tumoral de mama

SW1088 – Linhagem tumoral de astrocitoma grau 3

TCGA - The Cancer Genome Atlas Research Network

TP53 - Tumor Protein 53

U2OS – Linhagem de osteosarcoma

U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG – Linhagens tumorais de GBM

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
<i>Conceitos Iniciais – Tumores Cerebrais/Glioblastoma</i>	<i>2</i>
<i>Perfil molecular - Glioblastoma</i>	<i>3</i>
<i>A proteína HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) e o câncer cerebral.....</i>	<i>4</i>
<i>RNA's mensageiros de HJURP</i>	<i>7</i>
2. OBJETIVOS	9
<i>Objetivo Geral</i>	<i>9</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>9</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
<i>Cultura de Células.....</i>	<i>10</i>
<i>Amostras de tecido não tumoral e tumoral.....</i>	<i>10</i>
<i>Extração de RNA e síntese de cDNA.....</i>	<i>13</i>
<i>PCR Convencional.....</i>	<i>14</i>
<i>PCR Quantitativo</i>	<i>15</i>
<i>Silenciamento dirigido através da transfecção com siRNAs</i>	<i>16</i>
<i>Ensaio de Apoptose e Morte Celular.....</i>	<i>17</i>
<i>Ensaio de Senescência celular</i>	<i>18</i>
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	19
<i>PCR Convencional.....</i>	<i>19</i>
<i>Padronização da concentração de magnésio</i>	<i>19</i>
<i>Deteção dos transcritos de HJURP nas diferentes linhagens celulares</i>	<i>20</i>
<i>PCR Quantitativo</i>	<i>20</i>
<i>Definição da concentração ótima dos primers</i>	<i>20</i>
<i>Avaliação da eficiência de amplificação dos primers</i>	<i>22</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP nas linhagens celulares de GBM</i>	<i>23</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP em linhagens tumorais / não tumorais de origens distintas</i>	<i>26</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP em astrocitomas de diferentes graus.....</i>	<i>29</i>
<i>Quantificação dos diferentes transcritos do locus HJURP em diferentes tecidos não tumorais</i>	<i>32</i>
<i>Silenciamento dirigido aos diferentes transcritos do locus HJURP.....</i>	<i>33</i>
<i>Quantificação de apoptose e morte celular efetiva após o silenciamento dirigido ao transcrito HJURP1</i>	<i>35</i>
<i>Senescência celular na ausência de HJURP.....</i>	<i>36</i>
5. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS*	41

1. INTRODUÇÃO

Conceitos Iniciais – Tumores Cerebrais/Glioblastoma

Neoplasias malignas primárias localizadas no Sistema Nervoso Central (SNC) são a causa de aproximadamente 2,5% dos novos casos de câncer no Brasil e 2% no mundo todo ano (INCA 2016). Apesar de baixa incidência, esses tipos tumorais apresentam elevada letalidade, sendo que a maior parte dos casos resulta em óbito.

Os tumores cerebrais que tem sua origem definida a partir de astrócitos são classificados como astrocitomas. Estes tumores são divididos em três categorias, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com seu potencial de malignidade, diferenciação celular, presença de necrose e angiogênese. São categorizados em: Astrocitomas Difusos (grau 2), Astrocitomas Anaplásicos (grau 3) e Glioblastoma (GBM) (grau 4). O GBM é o tipo mais agressivo de astrocitoma e é classificado como de grau IV na progressão deste tipo tumoral. Dentre os tumores cerebrais, os gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC. Além disso, são os mais letais, levando o paciente a óbito em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. Eles possuem baixa capacidade de metástase, porém grande capacidade de infiltração no tecido cerebral (MEIR *et al.*, 2010).

Para o tratamento destas lesões a radioterapia tem se mostrado uma abordagem importante, pois avanços técnicos como, por exemplo, focar o feixe e adaptá-lo aos contornos irregulares dos tumores cerebrais permite minimizar a dose para as estruturas vizinhas e modular a intensidade desses feixes (MEIR *et al.*, 2010). Juntamente com a radioterapia vem sendo utilizado o agente alquilante temozolamida que usualmente apresenta um perfil de eficácia favorável e é administrado por via oral. Novas técnicas cirúrgicas, como a neuroendoscopia e a ressecção guiada por fluorescência têm também se tornado importante para o tratamento dos gliomas (MEIR *et al.*, 2010). A cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia combinadas tem sido amplamente usadas atualmente, porém são tratamentos paliativos pois sua eficácia é muito baixa (BEHIN *et al.*, 2003). A baixa eficiência deve-se à elevada resistência das células tumorais e o grande problema é a recidiva e o rápido crescimento de nova massa tumoral, que pode voltar ao tamanho inicial em até 30 dias (MEIR *et al.*, 2010). Por isso, a identificação de novos

alvos terapêuticos é imprescindível para favorecer o desenvolvimento de novos fármacos e propiciar melhor qualidade de vida dos pacientes com GBM.

Perfil molecular - Glioblastoma

A fim de aprimorar o diagnóstico e estimar o prognóstico dos pacientes a caracterização dos perfis moleculares dos tumores vem sendo muito utilizada (JANSEN *et al.*, 2010). O glioblastoma pode desenvolver-se ao longo de duas situações clínicas distintas, caracterizando este tumor como primário ou secundário. O GBM primário apresenta-se já em sua primeira manifestação clínica como um tumor de alto grau, enquanto o GBM secundário desenvolve-se ao longo de 5 a 10 anos a partir de um astrocitoma de menor grau (MAHER *et al.*, 2006). Análises moleculares revelaram que a amplificação do gene para o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é predominante em GBMs primários, enquanto que a perda de TP53 (proteína tumoral p53) é uma característica genética frequente em astrocitomas dos GBMs secundários (MAHER *et al.*, 2006). Apesar de cursos distintos, os GBMs primário e secundário chegam a características patológicas semelhantes como invasão do tecido adjacente, resistência à terapia e apresentam também alterações genéticas comuns como a perda de PTEN e CDKN2A e superexpressão de CDK4 e MDM2 (MAHER *et al.*, 2006). Novas classes de GBM estão sendo identificadas, onde já foi demonstrado que sua patogênese molecular é bastante heterogênea (TCGA, 2008 e 2013). Análises de parâmetros moleculares recentemente demonstraram a importância do gene IDH (Isocitratodesidrogenase), envolvido no metabolismo oxidativo celular, como novo parâmetro para auxílio da classificação dos tumores. Astrocitomas difusos e anaplásicos apresentam mutações em IDH, não vista para glioblastomas (DAVID, *et al.*, 2016).

Os glioblastomas atualmente são divididos em quatro subtipos moleculares distintos (proneural, neural, clássico e mesenquimal) de acordo com seu perfil genético (VERHAAK, *et al.*, 2010). O subtipo proneural apresenta em sua maior parte mutação em TP53 e IDH1, superexpressão de PDGFR, além de possuir grande semelhança molecular a GBMs secundários (VERHAAK *et al.*, 2010). Atinge pessoas mais jovens quando comparado aos outros subtipos, e não responde bem ao tratamento (MEIR *et al.*, 2010). O subtipo neural possui um padrão de expressão próximo do tecido normal e os pacientes acometidos geralmente são idosos (VERHAAK *et al.*, 2010). O subtipo clássico é caracterizado pela superexpressão de

EGFR e ausência de mutações em TP53, sendo que seus portadores sobrevivem por períodos maiores devido a boa resposta ao tratamento. O subtipo mesenquimal geralmente apresenta mutações em NF1, PTEN e TP53 e os pacientes são mais responsivos ao tratamento (VERHAAK *et al.*, 2010). Desse modo, alterações genéticas já previamente consideradas relevantes (TP53, Rb, RTK e PI3K) foram vinculadas aos subtipos transcricionais e epigenéticos de GBM, revelando que combinações coordenadas podem afetar o desfecho clínico e a sensibilidade individual dos tumores à terapia. (NOUSHMEHR *et al.*, 2010; VERHAAK *et al.*, 2010).

Muitos esforços estão sendo feitos para se entender as bases moleculares do surgimento e progressão dos astrocitomas, sendo o GBM o primeiro tipo tumoral a ser sistematicamente estudado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA). Estes trabalhos visam a identificação de novas alterações moleculares que possam ajudar a entender o comportamento agressivo e resistente dos GBM e auxiliar na busca de novas drogas. Desse modo, a exploração destes dados e a caracterização funcional das alterações genéticas presentes nos GBM é urgente, para a melhor compreensão da biologia deste tipo de tumor e busca de terapias personalizadas que promovam tratamentos mais eficientes (JANSEN *et al.*, 2010).

A proteína HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) e o câncer cerebral

Há alguns anos demonstramos que a proteína HJURP total é altamente superexpressa em glioblastomas (VALENTE *et al.*, 2009) e que seus altos níveis de expressão são fundamentais para a sobrevivência das células de GBM (VALENTE *et al.*, 2013). A superexpressão de HJURP total também foi relatada para outros tipos de tumores, como mama (HU *et al.*, 2010), pulmão (KATO *et al.*, 2007) e fígado (HU *et al.*, 2017), onde sua superexpressão também foi relacionada apior prognóstico dos pacientes. Além disso, sabe-se que a supressão de HJURP total induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007).

HJURP foi inicialmente caracterizada como uma proteína potencialmente envolvida em reparo de DNA (KATO *et al.*, 2007) e montagem da cromatina da região centromérica, onde tem função de recrutamento de CENP-A no nucleossomo dos centrômeros de cromossomos recém-replicados (FOLTZ *et al.*, 2009). Através de experimentos de imuno-precipitação, observou-se a interação física entre HJURP

e hMSH5 e NBS1, que são proteínas associadas ao reparo de quebras de fita dupla no DNA através do mecanismo de recombinação homóloga. Neste trabalho foi visto ainda que a expressão de HJURP é induzida quando células HeLa são expostas a agentes genotóxicos e que sua supressão induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007), o que corrobora que HJURP atue no reparo de DNA.

Além da montagem da cromatina na região centromérica (FOLTZ *et al.*, 2009), sabe-se que HJURP também é capaz de provocar a formação de novos centrômeros pelo recrutamento de CENP-A para regiões genômicas não centroméricas. Esse ancoramento forma cinetócoros funcionais ectópicos quando HJURP é artificialmente ancorada em regiões específicas do genoma (BARNHART *et al.*, 2011). A atividade de HJURP como chaperona da variante de histona CENP-A foi bastante estudada nos últimos anos e sua atuação no controle da incorporação desta variante nos centrômeros está bem caracterizada. Foi demonstrado que HJURP atua na forma dimérica (ZASADZINSKA *et al.*, 2013), sendo que CENP-A se liga a sua região N-terminal (NARDI *et al.*, 2016). Essa ligação favorece o recrutamento de CENP-A para centrômeros com auxílio do complexo Mis 18, o qual interage com porção medial de HJURP e serve como regulador da localização de CENP-A (WANG *et al.*, 2014; SUBRAMANIAN *et al.*, 2016). O processo de ancoramento de CENP-A na região centromérica é regulado durante o ciclo celular pela atividade das quinases CDK1/2 (MULLER *et al.*, 2014; FALK *et al.* 2015; STANKOVIC. A., *et al.* 2017). Foi também recentemente descrito, que a perda de p53 promove aumento na transcrição de HJURP e CENP-A (FILIPESCU *et al.*, 2016), o que explica o ganho de expressão consistentemente observado para estes genes durante o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer.

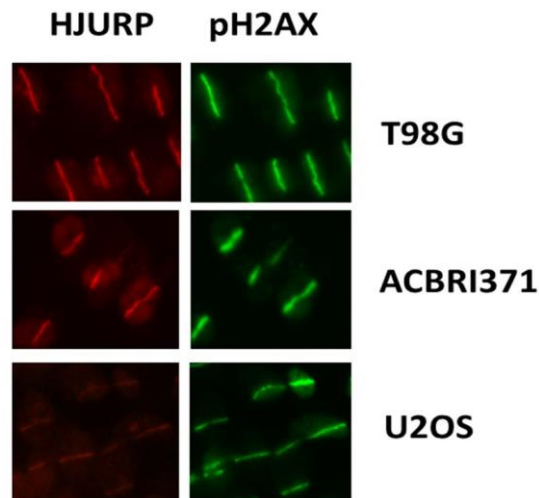
Dados anteriores de nosso grupo mostraram que o silenciamento de HJURP afeta a viabilidade de células de GBM e que os mecanismos de morte celular ativados são distintos em diferentes linhagens celulares (VALENTE *et al.*, 2013). Quando HJURP é silenciada na linhagem U87MG, esta torna-se prematuramente senescente a partir do quinto dia após o silenciamento. Já a linhagem T98G não mostra sinais de senescência, apresenta uma abrupta parada no ciclo celular em G2/M e grande aumento nas taxas de morte a partir do terceiro dia após o silenciamento (VALENTE *et al.*, 2013). Interessantemente, as células T98G possuem mutação no gene de p53, enquanto que a linhagem U87MG tem o gene

selvagem (ISHII *et al.*, 1999), o que indica que nas células de GBM a ocorrência de senescência prematura também depende de p53.

Vimos também que o silenciamento de HJURP combinado ao uso de radiação ionizante, embora não afete significativamente a atividade de reparo dos danos induzidos, apresenta um efeito sinérgico no aumento de morte celular para linhagens selvagens para p53, mas não para linhagens mutantes para p53. Estes dados indicam que a resposta das células de GBM à modulação dos níveis de HJURP depende do *status* de p53. Além disso, observamos que o silenciamento de HJURP isoladamente promove aumento nos níveis morte celular de outras linhagens de GBM (SERAFIM *et al.*, em preparação). Estes resultados sugerem que as células de GBM têm uma dependência dos altos níveis de HJURP por características intrínsecas, possivelmente relacionadas com a alta atividade de proliferação. Além disso, observamos recentemente que a indução de HJURP nas células de GBM U87MG, que originalmente expressam níveis baixos desta proteína, promove maior capacidade proliferativa e clonogênica, sugerindo uma potencial função na manutenção do estresse replicativo. Conjuntamente, estes dados sugeriram uma importante função para HJURP na manutenção da estabilidade genômica das células altamente proliferativas de GBM.

Dados recentes do nosso grupo confirmam a participação de HJURP no reparo de quebras de dupla fita de DNA induzidas através de radiação ionizante. Experimentos de irradiação com microlaser em astrócitos não tumorais (ACBRI371) e nas linhagens tumorais T98G e U2OS (Osteosarcoma), revelaram que a HJURP é recrutada para o local da lesão (Figura 1). Vimos ainda que o recrutamento ocorre em estágios bem iniciais da resposta ao dano. Além disso, observamos que o silenciamento de HJURP prejudica a atividade de reparo através das vias de recombinação homóloga e junção de pontas não homólogas. Estes dados revelam que de fato a HJURP está diretamente envolvida com reparo de quebras de dupla fita de DNA (SERAFIM *et. al.* 2017, em preparação).

Figura 1. Recrutamento de HJURP para a região de dano ao DNA após irradiação com microlaser



Células T98G (GBM), ACBRI371 (Astrócito não tumoral) e U2OS (osteosarcoma) foram plaqueadas, cultivadas por 24 horas. Em seguida, foram irradiadas com microlaser e fixadas após 10 minutos para realização do ensaio imunofluorescência utilizando anticorpos específicos anti-HJURP e anti- γ H2AX. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal. (Retirado de: Serafim et.al. 2017 em preparação)

RNA's mensageiros de HJURP

Dados da literatura evidenciam a existência de três RNAs mensageiros diferentes para o *locus HJURP*. O maior deles, denominado transcrito 1, apresenta 9 éxons e codifica a isoforma proteica A, que contém 748 aminoácidos. No transcrito 2 os éxons 4 e 5 estão ausentes e, portanto, este variante apresenta 7 éxons e codifica uma proteína hipotética menor, a isoforma proteica B que contém 694 aminoácidos. O transcrito 3 apresenta apenas 6 éxons (“*skipping*” dos éxons 4, 5 e 6) e codifica uma proteína hipotética de 663 aminoácidos, a isoforma C (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do padrão éxon/intron dos três diferentes mRNAs expressos pelo locus HJURP

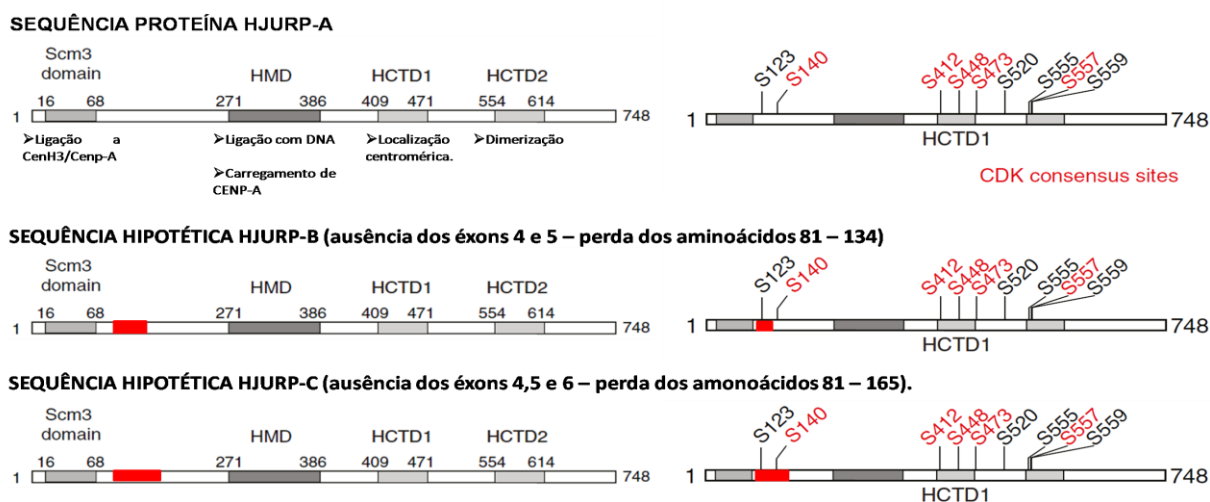


Sequência de mensageiros para as isoformas de HJURP: Alinhamento com a sequência do genoma humano usando a ferramenta BLAT (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). A figura ilustra o padrão de éxons e introns de cada uma delas.

Através da análise comparativa com a sequência produtora da maior isoforma (proteína HJURP A), percebemos que as isoformas hipotéticas B e C perdem trechos próximos ao domínio de interação com CENPA, porém ainda não

relacionados a uma função específica. A sequência produzida pelo transcrito 2 não contém aminoácidos de 81-134 presentes na isoforma A, perdendo assim o sítio de fosforilação S123. O transcrito 3 perde um fragmento maior, que compreende os aminoácidos de 81-165 de isoforma A, perdendo os potenciais sítios de fosforilação S123 e S140, e o domínio de interação com CDK. Estas modificações estruturais e perda de pontos de fosforilação certamente afetam a função das isoformas proteicas de HJURP, porém ainda não há relatos ou predição do potencial impacto da ausência desses trechos especificamente (Figura 3).

Figura 3. Predição esquemática das isoformas proteicas hipotéticas de HJURP



(Retirado e modificado de: Muller, *et al.*, - Cell Reports 8, 2014 - Fig1A e 2B) – Representação esquemática das proteínas hipotéticas HJURP B e C comparativamente a estrutura da proteína HJURP A (748aa) já descrita. Quadros vermelhos representam regiões hipoteticamente perdidas para cada isoforma.

Embora existam vários cDNAs depositados no *GenBank* que corroboram a expressão destes três mRNAs, não há dados na literatura sobre o padrão de expressão ou a funcionalidade de cada uma destas isoformas. Sendo assim, neste projeto avaliamos o padrão de expressão de cada um dos transcritos do *locus HJURP* em linhagens celulares de diferentes tipos tumorais, linhagens celulares de GBM e amostras de diferentes tecidos tumorais e não tumorais. Além disso, avaliamos o impacto do silenciamento dirigido a isoforma 1 em linhagens celulares de GBM, para assim investigar se a alteração na viabilidade celular, observada anteriormente pelo silenciamento da proteína HJURP total, depende majoritariamente da isoforma HJURP1 ou estaria relacionada a ação conjunta com as demais isoformas de HJURP.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que os três transcritos do locus HJURP são de fato expressos e apresentam maiores níveis nas linhagens celulares de GBM quando comparados aos astrócitos não tumorais. O aumento na expressão dos diferentes mRNAs de HJURP é similar em cada linhagem tumoral, embora o transcrito HJURP1 seja bem mais abundante do que os outros dois. A linhagem T98G se destacou na superexpressão (8 a 10 vezes o observado nas células controle) dos três mensageiros expressos pelo locus HJURP. Estes dados estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo, onde observamos maiores quantidades de mRNA e proteína HJURP total nestas células (VALENTE V *et al.*, 2013).

Assim como nas linhagens, os tecidos tumorais de pacientes (AST 2, AST3 e GBM) apresentaram maior expressão dos transcritos de HJURP quando comparados ao grupo controle não tumoral (SB). Porém, claramente as isoformas 1 e 3 se destacam quanto ao incremento na superexpressão, apresentado cerca de 25 (HJURP1) e 40 (HJURP3) vezes os níveis observados no grupo SB. Além disso, a isoforma 3 mostra um aumento progressivo que correlaciona-se com a malignidade dos tumores, sendo que os maiores níveis são encontrados nas amostras de GBM. Curiosamente, analisando isoladamente cada amostra, o transcrito 2 apresenta maiores níveis nos grupos não tumoral (SB) e astrocitoma de baixo grau (AST2), quando comparado com a expressão do transcrito 1. Já nos grupos de AST3 e GBM, o transcrito 1 se mostra mais abundante. A análise do painel de amostras de diferentes tecidos normais revelou resultado heterogêneo quanto a expressão dos transcritos de HJURP. As amostras de tecido prostático e cerebral do painel mostraram padrão semelhante ao observado para substância branca, onde o transcrito 2 é o predominante.

De forma geral, a expressão global de HJURP é inferior tanto em linhagens quanto em tecidos não tumorais. Além disso, a expressão do transcrito HJURP2 se destaca nos tecidos não tumorais, enquanto o transcrito HJURP1 predomina em linhagens de diferentes tipos tumorais e em astrocitomas de alto grau. Esses dados sugerem que, durante a progressão tumoral dos astrocitomas, a alta expressão do transcrito 2 é gradativamente sobreposta por um grande incremento na expressão do transcrito 1, o que parece ser fundamental para a alta atividade proliferativa das

células tumorais. Além disso, observamos que a ausência do transcrito 1 não afeta tão drasticamente a viabilidade celular e a promoção de senescência, quando comparado ao silenciamento de HJURP total. Desta forma, podemos concluir que o produto dos transcritos 2 e 3 de HJURP são ativos e apresentam importante função na manutenção da viabilidade celular de linhagens de GBM.

REFERÊNCIAS*

1. ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010.
2. BARNHART, M. C.; KUICH, P. H. J. L.; STELLFOX, M. E. *et al.* HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. **The Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 229-243, 18 jul 2011.
3. BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A. F.; DELATTRE, J.-Y. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-31, 25 jan 2003.
4. DAVID N. L.; PERRY, A.; REIFENBERGER, A. *et al.*, - The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **ActaNeuropathologica**, v.131, p. 803–820, 2016. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1, fev 2016.
5. FALK, S.J., *et al.*, CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. **Science** v.348, p.699-703, 2015.
6. FILIPESCU, D., *et al.*, Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. **Genes & Development**, v.31, p.1-18, 2017.
7. FOLTZ, D. R.; JANSEN, L. E. T.; BAILEY, A. O. *et al.* Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 472-84, 1 maio 2009.
8. HU, Z.; HUANG, G.; SADANANDAM, A. *et al.* The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 2, p. R18, jan 2010.
9. HU, B.; WANG, Q.; WANG, Y. *et al.* Holliday junction–recognizing protein promotes cell proliferation and correlates with unfavorable clinical outcome of hepatocellular carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 2601–2607, maio 2017.
10. INCA – Instituto nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde:INCA, 2016.
11. ISHII, N. *et al.* Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathology**, v.9, p.469-479, 1999.
12. JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-26, jul 2010.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

13. KATO, T.; SATO, N.; HAYAMA, S. et al. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8544-53, 15 set 2007.
14. MAHER, E. A; BRENNAN, C.; WEN, P. Y. et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11502-13, 1 dez 2006.
15. MEIR, E. G. VAN.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, 2010.
16. MULLER, S.; MONTES, R. O.; LACOSTE, N. *et al.* Phosphorylation and DNA Binding of HJURP Determine Its Centromeric Recruitment and Function in CenH3CENP-A Loading. **Cell Reports**, v.8, n.1, p. 190-193, July 10, 2014.
17. NARDI, I. K.; ZASADZIŃSKA E.; STELLFOX, M. E. *et al.* Licensing of Centromeric Chromatin Assembly through the Mis18a-Mis18b Heterotetramer". **Molecular Cell**, v. 61, n.5, p. 774–787, 2016. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.014.
18. NOUSHMEHR, H.; WEISENBERGER, D. J.; DIESFES, K. et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. **Cancer Cell**, v. 17, n. 5, p. 510-522, 18 mai 2010.
19. SERAFIM R. B. **Investigação do papel de HJURP (HollidayJunctionRecognizing Protein) na resistência de células de glioblastoma multiforme à radiação ionizante.** 2014. 47f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada a farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2014.
20. SUBRAMANIAN L, MEDINA-PRITCHARD B, BARTON R, et al. Centromere localization and function of Mis18 requires Yippee-like domain-mediated oligomerization.**EMBO Reports**. v.17, n.4, p. 496-507, 2016. doi:10.15252/embr.201541520. Abril 2016.
21. STANKOVIC et al., A Dual Inhibitory Mechanism Sufficient to Maintain Cell-Cycle-Restricted CENP-A Assembly; **Molecular Cell**, v. 65, p.231-246, Janeiro, 2017.
22. VERHAAK, R. G. ROEL.; HOAL, A. K.; PURDOM, E. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, p. 98–110, January 19, 2010.
23. VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S. et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PLOS One**, v.8, n.4, e62200. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062200>. 25 abr 2013.

24. VALENTE, V.; TEIXEIRA, S. A; NEDER, L. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 17, jan 2009.
25. WANG, J., et al., Mitotic Regulator Mis18B interacts with and specifies the centromeric assembly of molecular chaperone holliday junction recognition protein (HJURP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 8326-8336, 2014.
26. ZASADZINSKA, E. et al., Dimerization of the CCENP-A assembly factor HJURP is required for centromeric nucleosome deposition., **EMBO Journal**, v.32, p. 2113-2124., 2013.