



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GEOVANA NAVEGANTE

**Investigação da função de HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) no controle
do estresse replicativo das células de glioblastoma multiforme**

ARARAQUARA, SP

2017

GEOVANA NAVEGANTE

**Investigação da função de HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) no controle
do estresse replicativo das células de glioblastoma multiforme**

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

2017

Ficha Catalográfica

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

N323i Navegante, Geovana
Investigação da função de HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) no controle do estresse replicativo das células de glioblastoma multiforme / Geovana Navegante. – Araraquara, 2018.
51 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 Celular.

Orientadora: Valéria Valente.

1. Glioblastoma. 2. HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*). 3. Estresse replicativo. 4. Reparo de DNA. I. Valente, Valéria, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 40300005

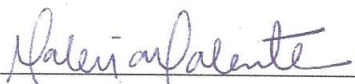
GEOVANA NAVEGANTE

Investigação da função de HJURP (Holliday Junction Recognition Protein) no controle do estresse replicativo das células de glioblastoma multiforme

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 25 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA


VALERIA VALENTE


JOSANE DE FREITAS SOUSA


CLESLEI FERNANDO ZANELLI

“O entusiasmo é a maior força da alma. Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas.”

Napoleon Hill

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e letal, e na maioria dos casos leva o paciente à morte em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. O tratamento é realizado com remoção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia. Entretanto, devido à alta resistência das células tumorais, frequentemente o tumor cresce novamente poucas semanas após a cirurgia. Recentemente demonstramos que HJURP (*Holliday Junction–Recognizing Protein*), uma nova proteína envolvida na montagem da cromatina centromérica e reparo de DNA, está altamente superexpressa nos GBMs. A HJURP está também superexpressa em outros tumores, como câncer de pulmão, mama e fígado, sendo que quanto maior é seu nível de expressão pior é o prognóstico de sobrevida dos pacientes, para todos os tipos tumorais estudados. Neste trabalho investigamos se a superexpressão de HJURP afeta a capacidade de proliferação e de manutenção da integridade genômica da células de GBM frente ao estresse replicativo. Observamos que a superexpressão da HJURP promove aumento na capacidade proliferativa e maior resistência ao estresse replicativo para as células ACBRI371 e U87MG, uma vez que ambas as linhagens apresentaram maiores taxas de proliferação quando superexpressando HJURP, mesmo em condições de estresse replicativo adicional. Além disso, estas células também mostraram menos fragmentação de DNA, após tratamento com hidroxiuréia, na condição superexpressora de HJURP. Portanto, o ganho de competências proliferativa e clonogênica, observado previamente na linhagem U87MG superexpressora de HJURP, pode estar relacionado à maior eficiência na atividade de reparo de DNA. Conjuntamente, nossos dados indicam que os níveis elevados de HJURP favorecem a atividade de reparo de quebras na dupla-fita de DNA e, assim, conferem maior capacidade proliferativa às células tumorais.

Palavras-chave: Glioblastoma. HJURP. Estresse replicativo. Reparo de DNA.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal type of primary brain tumor, and in most cases patient survival is approximately 14 months after diagnosis. Treatment is performed with surgical removal of the tumor mass, followed by radiotherapy and chemotherapy. However, due to the high resistance of tumor cells, recurrence is frequent. We recently demonstrated that HJURP (Holliday Junction-Recognition Protein), a novel protein involved in the assembly of centromeric chromatin and DNA repair, is highly overexpressed in GBM cells. This protein is also overexpressed in other types of tumors such as lung, breast and liver cancers. The higher levels of HJURP expression are also correlated with worse prognoses for all cancers studied. Here we investigated whether HJURP overexpression would affect proliferative capacity and the competence for genome integrity maintenance of GBM cells challenged with drugs for replicative stress induction. Our results demonstrated that ACBRI371 and U87MG cells increased their proliferative capacity after overexpression of HJURP and provided more resistance to replicative stress. Additionally, ACBRI371 and U87MG cells also showed less DNA fragmentation, after hydroxyurea treatment, when overexpressing HJURP. Thus, the gain of the proliferative and clonogenic capacity previously observed in U87MG cells overexpressing HJURP may be related with more efficiency in DNA repair activity. Altogether, our data indicate that the high levels of HJURP supports the repair of DNA double strand breaks and confers proliferative capacity to cancer cells.

Keywords: Glioblastoma; HJURP; Replicative stress; Repair of DNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência dos diferentes subtipos dos gliomas.

Figura 2: Representação dos caminhos genéticos que promovem o desenvolvimento dos glioblastomas primário e secundário.

Figura 3: Classificação molecular dos GBMs segundo padrões transcricionais globais.

Figura 4: Modelo de evolução tumoral a partir da indução de estresse replicativo promovido pela ativação de oncogenes.

Figura 5: Esquema representativo da cascata da fosforilação ativada pelas quinases ATR e ATM devido à presença de estresse replicativo ou ocorrência de dano no DNA.

Figura 6: Recrutamento de HJURP para região de dano ao DNA após irradiação com microlaser.

Figura 7: Ensaio de sobrevivência clonogênica após a superexpressão de HJURP na linhagem U87MG.

Figura 8: Níveis de proteína HJURP nas linhagens ACBRI371, U87MG e T98G selvagens e superexpressoras.

Figura 9: Quantidade de γ H2AX nos astrócitos não-tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras após o tratamento com hidroxiuréia.

Figura 10: Curva de crescimento das células T98G controles e superexpressoras de HJURP sem e com indução de estresse replicativo exógeno.

Figura 11: Curva de crescimento das linhagens ACBRI371 e U87MG controles e superexpressoras de HJURP.

Figura 12: Curva de crescimento da linhagem ACBRI371 controle e superexpressora de HJURP após indução de estresse replicativo exógeno.

Figura 13: Curva de crescimento da linhagem U87MG controle e superexpressora de HJURP após indução de estresse replicativo exógeno.

Figura 14: Quantificação da fragmentação de DNA após tratamento com hidroxiuréia.

Figura 15: Quantificação da ativação de RPA nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP.

Figura 16: Quantificação da ativação de ATR nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP.

Figura 17: Quantificação da ativação de ATRIP na linhagem de GBM U87MG selvagem e superexpressora de HJURP.

Figura 18: Quantificação de γ H2AX nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

9-1-1 – Rad9- Hus1-Rad1

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR – Ataxia Telangiectasia and RAD 3 Related

ATRIP – ATR – Interacting Protein

CDK4 - Cyclin-Dependent Kinase 4

CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CENP-A – Centromere protein A

CHK1 - Checkpoint Kinase 1

CHK2 - Checkpoint Kinase 2

CPT - Camptotecina

DDR – DNA damage response

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK –DNA Dependent Protein Kinase

DOX - Doxíciclina

DOX- Ausência de doxíciclina

DOX+ Acréscimo de doxíciclina

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

ETAA1 – Ewing’s Tumor Associated Antigen 1

GBM - Glioblastoma multiforme

HJURP - Holliday Junction Recognizing Protein

hMSHJ - mutS Homolog 5

HU - Hidroxiureia

IDH1 - Isocitrate Dehydrogenase 1

Kda - Kilodalton

KEL - Kell Blood Group

MDC1 - Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1

MDM2 - E3 Ubiquitin Protein Ligase

MRN- Complexo Mre11-Rad50-Nbs1

NBS1 - Nibrin

NF1 - Neurofibromin 1

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDGFRA - Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PI3K- Phosphoinositide 3 - Kinase

PRP19 – Pre- mRNA processing factor 19

PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog

QK1 - KH Domain Containing

Rb – Retinoblastoma protein

RNA – Ácido Ribonúcleico

RNA seq – Sequenciamento de Ácido Ribonúcleico

RPA – Replication Protein A

RTK- Receptor Tyrosine Kinase

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SNC – Sistema nervoso central

SPTA1 - Spectrin, Alpha, Erythrocytic 1

ssDNA – Single Stranded DNA

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TCHH- Trichohyalin

TMZ – Temozolamida

TopBP1 – Topoisomerase (DNA) II binding protein 1

TP – Tigh Puro

TP53 - Tumor Protein 53

WT - wild type

ZTR1 - Cytoplasmic Zinc Uptake Transporte

H2AX – Histona H2AX

γ H2AX – Variante de Histona H2AX fosforilada

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
1-Introdução	14
Aspectos gerais do glioblastoma.....	14
Caracterização molecular do glioblastoma	15
O estresse replicativo e a instabilidade genômica	17
Mecanismos de reparo de DNA.....	19
Ativação da quinase ATR	21
As vias de sinalização e reparo de DNA e a progressão do câncer	22
A proteína Holliday Junction-Recognition Protein (HJURP) e o câncer.....	23
2- Objetivo geral.....	27
3- Objetivos Específicos	27
4- Materiais e Métodos	28
Cultivo celular.....	28
Tratamento para indução do estresse replicativo	28
Camptotecina	Erro! Indicador não definido.
Hidroxiuréia.....	Erro! Indicador não definido.
Ensaio de proliferação através de coloração com violeta cristal.....	29
Quantificação da fragmentação de DNA – ENSAIO DO COMETA.....	29
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e western blot	29
5 - Resultados e Discussão	31
Estabelecimento da condição de estresse replicativo nos astrócitos e linhagens de GBM superexpressoras de HJURP	31
A superexpressão da HJURP não altera a capacidade de proliferação e resistência ao estresse replicativo da linhagem T98G	33
As linhagens ACBRI371 e U87MG ganham capacidade ploliferativa e resistência ao estresse replicativo com a superexpressão da HJURP	34
As linhagens ACBRI371 e U87MG superexpressoras de HJURP apresentam menos fragmentação de DNA após indução de estresse replicativo exógeno.....	37
Avaliação da ativação das proteínas que respondem ao estresse replicativo nas células superexpressoras de HJURP	39
6 - Conclusão	45
Referências	46

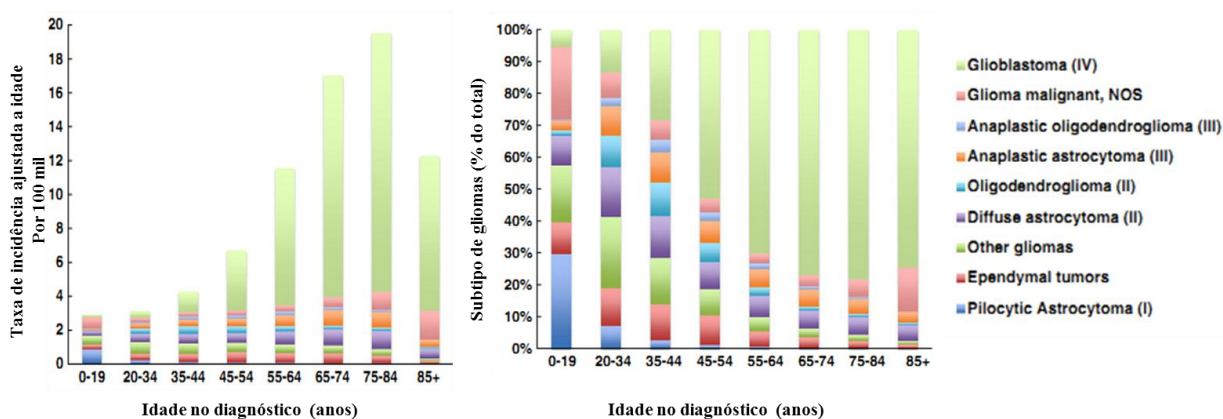
1-Introdução

Aspectos gerais do glioblastoma

Os gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) formados de células com características histológicas de astrócitos e oligodendrócitos. Estas células compõem o parênquima cerebral e suportam a função neuronal, regulam a concentração de diversas substâncias neurotransmissoras e íons oferecem sustentação aos neurônios e promovem a sua comunicação com os vasos sanguíneos, sendo fundamentais para a nutrição das células nervosas (MEIR *et al.*, 2010). A origem das células precursoras dos gliomas não é completamente compreendida e pode incluir células estaminais neurais, células progenitoras gliais ou desdiferenciação de células maduras. Células progenitoras podem também gerar tumores mistos, como os tumores glioneuronais (BATISTA *et al.*, 2014).

Os gliomas representam cerca de 80% de todos os tumores primários malignos do SNC. Dentre eles, os astrocitomas compreendem 75% dos casos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas são classificados em 4 graus de acordo com a taxa de proliferação, grau de diferenciação celular, e presença de necrose e angiogênese, sendo categorizados em astrocitomas pilocíticos (grau I), difusos (grau II), anaplásicos (grau III) e glioblastomas (GBM) (grau VI). O GBM é o subtipo mais agressivo e também mais frequente (**figura 1**) (OSTROM *et al.*, 2015).

Figura1: Incidência dos diferentes subtipos dos gliomas.



FERRIS *et al.*, 2017

(A) Eixo Y: representação da taxa de incidência de cada subtipo tumoral ajustada à idade, eixo X faixa etária no momento do diagnóstico. (B) Eixo Y: subtipos de gliomas dentro da porcentagem total de casos por idade ate o diagnóstico representado no eixo X.

A ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia administrada em conjunto com o agente alquilante temozolamida (TMZ), é a principal abordagem para o tratamento dessas lesões. A temozolamida, administrada normalmente por via oral, apresenta baixa toxicidade. Além disso, novas técnicas cirúrgicas, como endoscopia e ressecção guiadas por fluorescência, também se tornaram importantes para o tratamento. Além destas técnicas, são pesquisados fármacos que bloqueiam uma ou mais vias de proliferação alterada, por exemplo, bevacizumab, um anticorpo monoclonal que atua contra o crescimento endotelial vascular (BEHIN *et al.*, 2003).

Os tratamentos convencionais estão associados a uma alta reincidência tumoral e, portanto, são considerados paliativos. A formação de nova massa tumoral usualmente ocorre em até trinta dias, com características às da lesão inicial. 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 (MEIR, *et al.*, 2010).

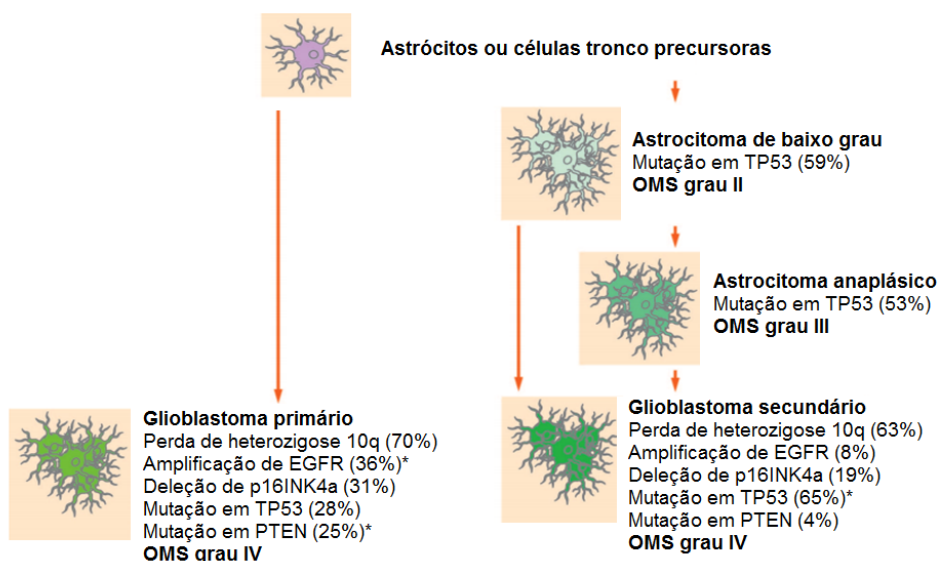
Caracterização molecular do glioblastoma

O glioblastoma pode manifestar-se em duas situações clínicas distintas, que caracterizam o tumor como primário ou secundário (**figura 2**). O GBM primário apresenta-se já na 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. Eles apresentam também alterações genéticas comuns como a perda de PTEN e CDKN2A e superexpressão de CDK4 e MDM2 (**figura 2**) (MAHER *et al.*, 2006). Apesar dos cursos de desenvolvimento distintos, os GBMs primário e secundário chegam a características patológicas semelhantes como: proliferação rápida, invasão do tecido adjacente e resistência às terapias.

O GBM foi o primeiro tipo de câncer a ser sistematicamente estudado pelo consórcio de sequenciamento internacional *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Inicialmente, foi realizada uma análise genômica e transcriptômica de 206 GBMs (TCGA, 2008) e, em seguida, o estudo foi expandindo para 543 amostras (TCGA, 2013). Essas análises genômicas globais disponibilizaram uma quantidade enorme de dados e

transformaram a capacidade de compreensão da biologia desse tumor (TCGA, 2013). Através da análise dos dados de RNAseq do TCGA foi possível identificar 4 subtipos moleculares de GBM que diferem no padrão global de expressão gênica (**Figura 3**) e apresentam alterações genéticas características (VERHAAK *et al.*, 2010).

Figura 2: Representação dos caminhos genéticos que promovem o desenvolvimento dos glioblastomas primário e secundário.



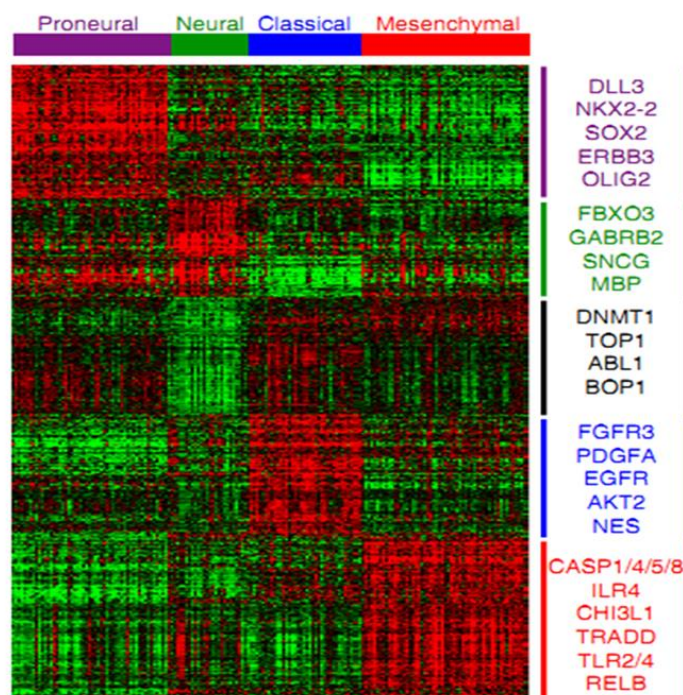
Ohgaki H and Kleihues P, 2007 The American Journal of Pathology **170** (5): 1445-51.

A perda de heterozigose 10q é frequente em ambos, amplificação de EGFR predomina no GBM primário e mutações em TP53 prevalecem no GBM secundário, o que potencialmente conduz à recidivas e promove o desenvolvimento do GBM secundário.

O subtipo clássico é caracterizado pela superexpressão de EGFR e ausência de mutações em TP53. O grupo de pacientes que apresenta este tipo de tumor sobrevive por períodos maiores em resposta ao tratamento. O subtipo proneural apresenta mutação em TP53 em 54% dos casos, frequentemente apresenta também mutação em IDH1, superexpressão de PDGFRA (VERHAAK *et al.*, 2010), e possui grande semelhança molecular a GBMs secundários (MEIR *et al.*, 2010). A hipermetilação de diversas ilhas CpG está presente em grande parte dos tumores proneurais, o que resulta em padrões de expressão gênica distintos para os GBM proneurais hipermetilados e não hipermetilados (NOUSHMEHR *et al.*, 2010). O subtipo proneural atinge pessoas mais jovens quando comparado aos outros subtipos e não responde bem ao tratamento. O subtipo mesenquimal geralmente apresenta mutações em NF1, PTEN e TP53 e os pacientes são mais responsivos

ao tratamento. Já o subtipo neural possui um padrão de expressão mais próximo do tecido normal e os pacientes acometidos geralmente são mais idosos (VERHAAK *et al.*, 2010).

Figura 3: Classificação molecular dos GBMs segundo padrões transcricionais globais.



Verhaak, RGW et al. 2010, Cancer Cell 17, 98-110

Heatmap dos níveis de expressão gênica de 840 genes (alguns destacados à direita) num conjunto de 173 amostras de GBM analisadas pelo TCGA. É possível observar quatro padrões de expressão gênica distintos nos quais os tumores agrupam-se: proneural, neural, clássico e mesenquimal.

Desse modo, alterações genéticas já previamente consideradas relevantes (p53, 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). Portanto, o melhor entendimento do impacto destas alterações genéticas na biologia dos GBMs é fundamental na busca por terapias personalizadas que promovam tratamentos mais eficientes e melhores prognósticos para os pacientes (JANSEN *et al.*, 2010).

O estresse replicativo e a instabilidade genômica

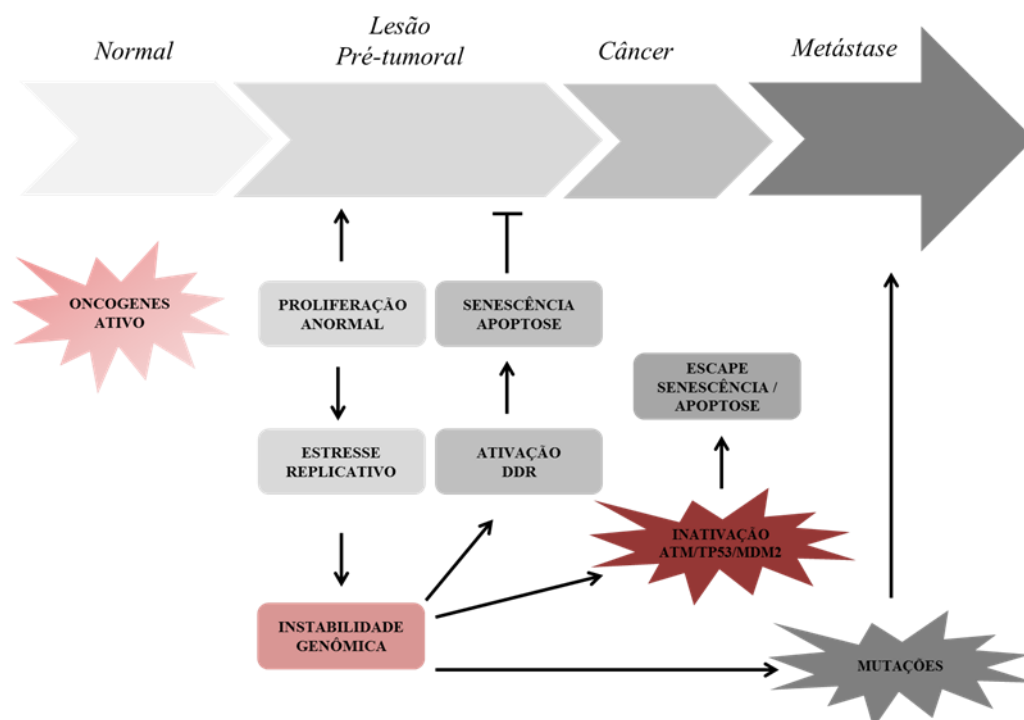
A instabilidade genômica instalada durante a progressão tumoral facilita a aquisição de novas alterações genéticas fundamentais para a progressão do câncer (**figura 4**). (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011). O fenótipo inicial responsável pela instabilidade

genômica é a proliferação descontrolada uma vez que a mesma origina um quadro de estresse replicativo. O aumento da proliferação e a presença do estresse replicativo são responsáveis pela geração de danos no DNA e, conseqüentemente, a ativação de um mecanismo robusto de resposta ao dano (*DNA damage response* - DDR), ainda em lesões pré-cancerosas. Proteínas responsáveis pelo controle do reparo do DNA e ciclo celular como ATM/ATR, CHK1/2 e TP53 são ativadas a fim de promover parada no ciclo celular e a restauração da lesão, porém, caso o reparo não ocorra adequadamente, a célula ativa processos de morte celular, através de apoptose ou senescência (TAYLOR & LINDSAYH, 2015). Desse modo, quando a DDR está funcionando apropriadamente a tumorigênese é bloqueada.

No entanto, muitas vezes esses mecanismos apresentam falhas e os danos continuamente gerados no DNA podem ser fixados e proporcionar uma vantagem proliferativa para as células, levando à progressão tumoral (**Figura 4**) (TAYLOR & LINDSAYH, 2015). Após o estabelecimento do câncer, porém, o desenvolvimento de competências para a manutenção do estresse replicativo se torna fundamental para a sobrevivência destas células. Neste contexto, os altos níveis de estresse replicativo podem também torná-las mais sensíveis a insultos genotóxicos exógenos, quando comparadas às células normais. Nesta visão uma janela terapêutica é sugerida visando o uso de agentes genotóxicos a fim de promover a morte seletiva das células tumorais. Existem diversas drogas que são utilizadas terapeuticamente pelo fato de causarem estresse replicativo, podemos citar a hidroxiuréia, camptotecina e gemcitabina, entre outros (TAYLOR & LINDSAYH, 2015; BOYER *et al.*, 2016).

Vários relatos indicam ainda que quando as células tumorais possuem maior eficácia em se recuperar do estresse replicativo, elas apresentam vantagem de sobrevivência, o que acarreta piores prognósticos para o paciente. Alguns estudos sugerem que o fenótipo de superexpressão de conjuntos de genes associados à sinalização do dano ou de reparo de lesões no DNA é correlacionado com a menor sobrevida dos pacientes. (TAYLOR & LINDSAYH, 2015; BOYER *et al.*, 2016; DE SOUSA *et al.*, 2017), o que evidencia a importância destas vias para a manutenção da viabilidade das células tumorais.

Figura 4. Modelo de evolução tumoral a partir da indução de estresse replicativo promovido pela ativação de oncogenes.



Adaptado de: TAYLOR, E. M.; LINDSAY H. D., 2015

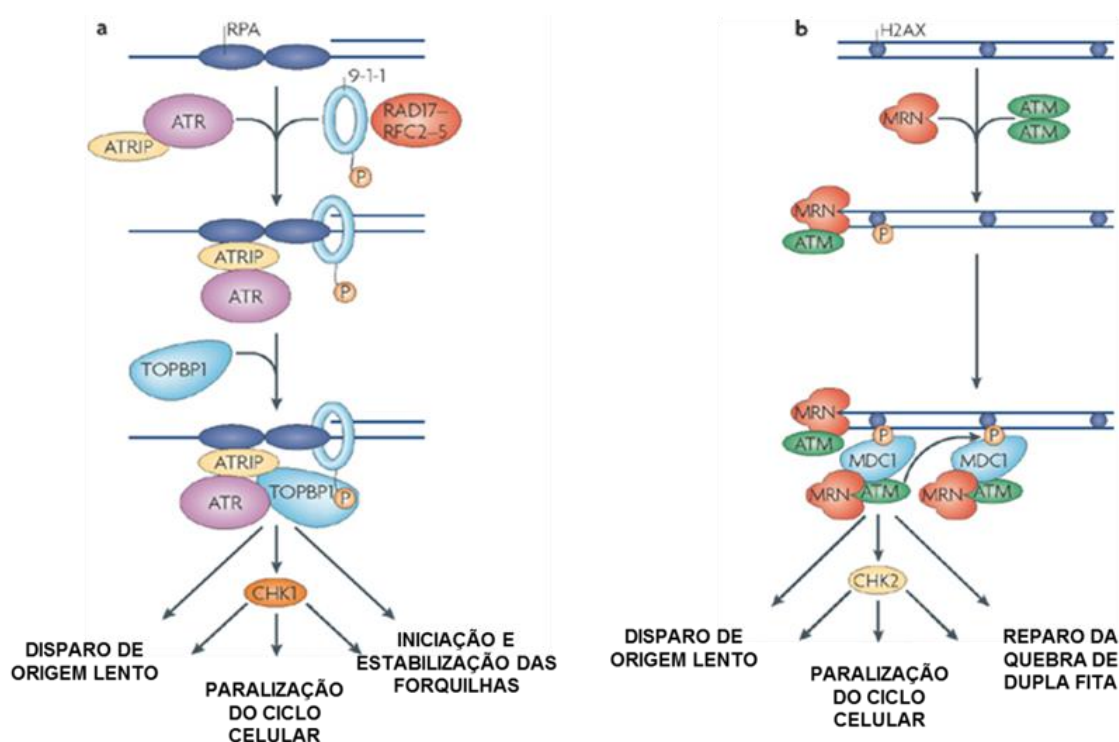
O aumento da proliferação celular, como consequência da ativação de oncogenes, é um evento inicial no desenvolvimento do câncer. A proliferação descontrolada por sua vez estabelece uma condição de estresse replicativo e instabilidade genômica. Em lesões pré-cancerosas, a DDR restringe a progressão do câncer promovendo a morte das células que acumulam danos. Entretanto, caso haja falhas nestes mecanismos, as células podem escapar da apoptose ou da senescência e completar a transição da lesão pré-tumoral para o câncer estabelecido.

Mecanismos de reparo de DNA

As proteínas quinases ATM e ATR são as principais responsáveis pela manutenção da estabilidade genômica. Essas quinases, quando fosforiladas e ativadas, recrutam uma cascata de proteínas que terão como função principal a paralização do ciclo celular e ativação da maquinaria de reparo do DNA, como ilustrado na **figura 5** (MATSUOKA *et al.*, 2007; MARECHAL & ZOU, 2013). A quebra de dupla fita provocada por agentes exógenos é a marca de dano principal para a ativação da proteína ATM e fosforilação da variante de histona H2AX (γ H2AX), já a proteína ATR é fosforilada quando ocorre o acúmulo de DNA fita simples no genoma. Estas quinases fosforilam vários alvos que são então recrutados para o local da lesão e irão promover o reparo. Paralelamente, são ativadas também as proteínas de ponto de checagem que interrompem o ciclo celular para

que a célula possa restaurar o DNA apropriadamente. ATM tem como principal alvo a proteína de ponto de checagem 2 (CHK2), enquanto que a proteína de ponto de checagem 1 (CHK1) é fosforilada preferencialmente pela quinase ATR (**figura 5**). Caso o reparo não seja executado de modo eficiente, pode ainda ocorrer a indução de morte celular por apoptose ou senescência (MATSUOKA *et al.*, 2007; MARECHAL & ZOU, 2013).

Figura 5: Esquema representativo da cascata da fosforilação ativada pelas quinases ATR e ATM devido à presença de estresse replicativo ou ocorrência de dano no DNA.



Adaptado: CIMPRICH & CORTEZ 2008

(A) A proteína de replicação A (RPA) reconhece regiões de ssDNA e é responsável pelo recrutamento do complexo ATR-ATRIP, que por vez recruta Rad17-RFC que posiciona o complexo 9-1-1 na junção do trecho ssDNA com o DNA fita-dupla. O complexo 9-1-1 é responsável pelo recrutamento de TopBP1 que possui domínios ativadores de ATR, interação essa que envolve dois domínios de BRCT presentes em TopBP1 e a fosforilação da região C-terminal de Rad9 (complexo 9-1-1). TopBP1 se liga e ativa ATR de maneira dependente de ATRIP, levando a fosforilação e ativação completa da quinase. Assim, ATR e seus efetores acabam por bloquear os disparos de origem e induzem a parada do ciclo celular, bem como estabilizam e reiniciam as forquilha de replicação paralisadas.

(B) A presença de uma quebra na dupla fita de DNA leva ao recrutamento do complexo MRN. Em seguida, ATM liga-se ao complexo de MRN, é ativada por auto-fosforilação, e promove a fosforilação da cauda carboxi terminal da variante de histona H2AX. H2AX fosforilado (γ H2AX) recruta a proteína MDC1 que dispara o recrutamento de complexos ATM/MRN adicionais. ATM ativada fosforila vários alvos *downstream* que irão promover a paralização do ciclo celular, inibição dos disparos de novas origens e o reparo da lesão.

Ativação da quinase ATR

O papel de ATR na manutenção da integridade do genoma, através de suas funções na promoção de estabilidade das forquilhas de replicação e reparo do DNA, tem sido extensivamente estudado (ZEMAN & CIMPRICH, 2014). A quinase ATR reconhece especificamente DNA fita-simples (*single strand DNA* - ssDNA), que são revestidas pela proteína de replicação A (RPA- *replication protein A*). A presença de DNA fita simples decorre da atividade de replicação do DNA ou do reparo de quebras de fita dupla através de recombinação homóloga (ZEMAN & CIMPRICH, 2014). Desse modo, a função de ATR é muito importante para o controle do estresse replicativo, que é caracterizado pelo excesso de DNA na forma de fita simples, proveniente da lentidão ou paralização das forquilhas de replicação.

A ativação inicial de ATR é dependente da sua ligação com a proteína ATRIP (*ATR interacting protein*) (CORTEZ, *et al.*, 2001). Longos trechos de ssDNA são primeiramente revestidos por RPA, revestimento este que servirá de substrato para ATR juntamente com ATRIP. (ZOU & ELLEDGE, 2003; LUCCA, *et al.* 2004) A completa fosforilação de ATR ocorre após a sua heterodimerização com ATRIP e subseqüentes associações com o complexo 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) e a proteína TopBP1. O complexo 9-1-1 é acoplado nos trechos de interface de DNA fita simples/fita dupla e, então, a proteína Rad9 é fosforilada e promove o recrutamento de TopBP1 através dos seus domínios BRCT (**figura 5**) (ZOU & ELLEDGE, 2003; DELACROIX *et al.*, 2007). TopBP1 possui domínios ativadores de ATR imprescindíveis para a estimulação direta desta quinase (LINDAHL & BARNES, 2000). Uma vez recrutada e ativada, ATR fosforila uma cascata de proteínas, que incluiu CHK1, desencadeando a nível celular a resposta ao dano (MATSUOKA *et al.*, 2007).

A ativação de ATR é influenciada também por modificações pós-traducionais, como a ubiquitinação de RPA, pela proteína PRP19 (MARECHAL *et al.*, 2014), e a sumoilação de ATRIP (WU & ZOU, 2015). A inibição da ubiquitinação de RPA32 através do silenciamento de PRP19 gera a diminuição da fosforilação do complexo de RPA e resulta no recrutamento e ativação limitada de ATR nos trechos de ssDNA (MARECHAL *et al.*, 2014). Além disso, o bloqueio da sumoilação de ATRIP reduz a sua interação com ATR assim como RPA e TopBP1.

Recentemente, foi também caracterizada a proteína ETAA1 (antígeno associado ao tumor de Ewing 1), como um fator de ligação a RPA que abriga domínios ativadores de

ATR potentes e trabalha em paralelo e, independentemente, ao complexo 9-1-1/TopBP1. Desse modo, a perda de ETAA1 perturba a manutenção da integridade do DNA durante a replicação e torna as células mais sensíveis ao estresse replicativo. Além disso, quando combinada com a depleção de TopBP1, a falta de ETAA1 demonstrou letalidade sintética (HAAHR *et al.*, 2016; BASS *et al.*, 2016). Assim, a ativação de ATR em células humanas é mediada por duas vias diferentes e complementares, através de TopBP1 e ETAA1, cuja ação combinada é essencial para suportar estresse replicativo.

As vias de sinalização e reparo de DNA e a progressão do câncer

A participação dos mecanismos de reparo do DNA na progressão do câncer e ainda na resposta das células tumorais aos agentes genotóxicos tem sido bastante estudada. Bartkova e colaboradores (2010) demonstraram, através da análise imuno-histoquímica, que as vias de DDR estão comumente ativas em GBMs mesmo antes do início do tratamento. Nas amostras normais nenhuma ativação de DDR foi detectada. Observaram ainda que a ativação das proteínas que respondem ao dano é mais expressiva em astrocitomas de grau II, que são muito menos proliferativos que os GBMs. Estes dados sugerem que uma maior eficiência das maquinarias de reparo é desenvolvida durante a progressão tumoral (BARTKOVA *et al.*, 2010).

Quando comparado a outros tipo tumorais, os gliomas mostram uma ativação mais robusta dos mecanismos de DDR (BARTKOVA *et al.*, 2010; 2005; 2007). Foi observado aumento na fosforilação de vários marcadores como: ATM, Chk2, Chk1e H2AX. Através de experimentos com linhagens celulares em cultura, foi observado que apesar da hiperativação intrínseca destas vias, quando as células são submetidas a insultos genotóxicos, há ainda uma maior ativação da DDR, o que corrobora com a falta de respostas desses pacientes frente aos tratamentos (BARTKOVA *et al.*, 2010).

No tratamento atual dos GBMs, o fármaco temozolamida (TMZ) é o mais comumente utilizado. O TMZ tem como principal atividade promover a metilação do DNA em nucleotídeos de guanina (metilguanina-O6), causando danos primários que são convertidos em lesões secundárias e bloqueiam a replicação, o que culmina na geração de quebras na dupla fita. Estas lesões são responsáveis pela ativação dos mecanismos de sinalização de dano e reparo. Como relatado anteriormente, as quinases ATM e ATR mostram-se hiperativas nestes tumores, o que possibilita o reparo de lesões promovidas pelo estresse replicativo de maneira eficiente. Desse modo, acredita-se que estas células

tenham uma maior competência intrínseca para lidar com as lesões geradas no tratamento. Corroborando essa hipótese, Eich e colaboradores (2013) demonstraram que o silenciamento das quinases ATM ou ATR promove aumento nas taxas de morte celular das linhagens de GBM quando as mesmas são expostas a TMZ, com resposta mais acentuada com o silenciamento de ATR (EICH *et al.*, 2013). Tais observações estão de acordo com relatos anteriores que demonstraram que a inibição de CHK1 aumenta a citotoxicidade do TMZ em células de GBM (QUIROS *et al.*, 2011). Desse modo, entende-se que a inibição de ATR ou alvos *downstream* da via pode ser uma boa estratégia de tratamento adjuvante a TMZ.

A proteína Holliday Junction-Recognition Protein (HJURP) e o câncer

Dados anteriores de nosso laboratório revelaram que a HJURP, uma proteína envolvida em reparo de DNA e montagem da cromatina centromérica (KATO *et al.*, 2007; FOLTZ *et al.*, 2009), é altamente superexpressa em astrocitomas e que seus níveis de expressão mostram forte correlação com o prognóstico de sobrevida dos pacientes (Valente *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2013). A superexpressão de HJURP também já foi relatada em outros tipos tumorais como: pulmão (KATO *et al.*, 2007), mama (HU *et al.*, 2010) e fígado (BAOHONG *et al.*, 2017). Nos casos de câncer de pulmão, mama, e fígado, os pacientes que apresentaram superexpressão da proteína HJURP também mostraram menor expectativa de vida (KATO *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2010; BAOHONG *et al.*, 2017).

Observamos ainda 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. Quando HJURP é silenciada a linhagem U87MG se torna prematuramente senescente e ativa apoptose, mostrando aumento significativo nos níveis de morte celular a partir do quinto dia após o silenciamento. Já a linhagem T98G não apresenta sinais de senescência, mas sofre uma abrupta parada no ciclo celular em G2/M, além de grande aumento nas taxas de morte a partir do terceiro dia após o silenciamento. Interessantemente, fibroblastos não tumorais não foram significativamente afetados pelo silenciamento (VALENTE *et al.*, 2013). Em acordo com os fenótipos observados após o silenciamento, as células T98G têm mutação no gene de TP53, enquanto que a linhagem U87MG tem o gene selvagem (ISHII *et al.*, 1999), o que explica o disparo de senescência ocorrer apenas na linhagem U87MG. Conjuntamente, estes dados sugerem uma função

particular para HJURP na manutenção da estabilidade genômica das células altamente proliferativas de GBM.

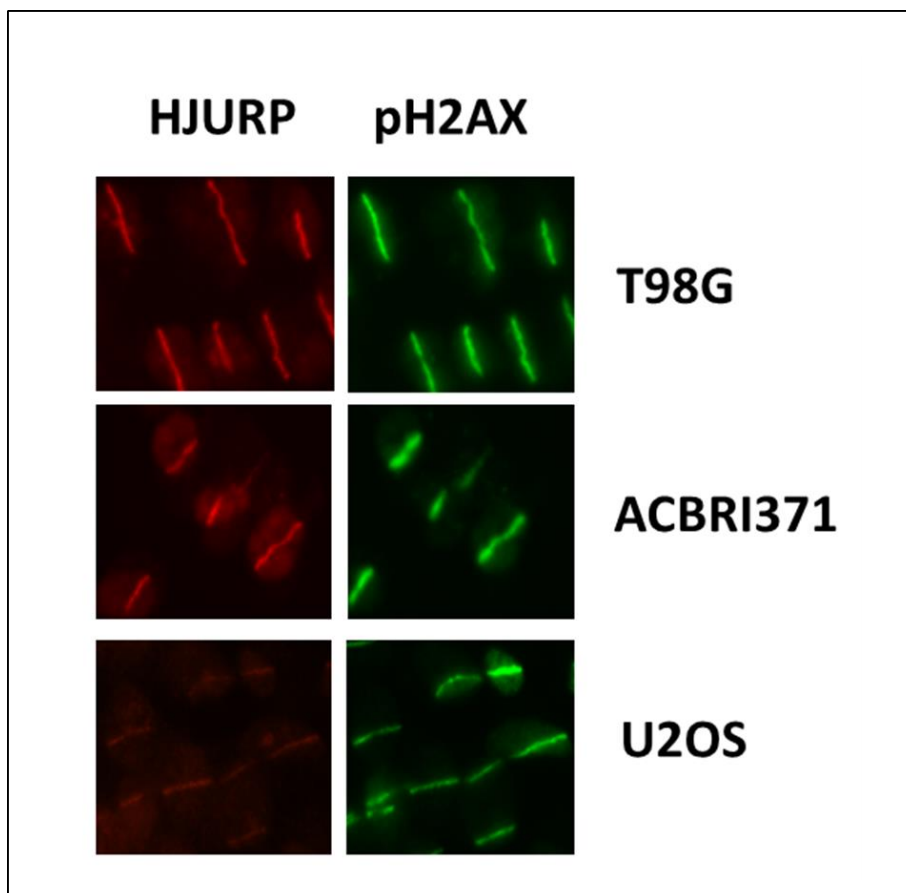
HJURP foi inicialmente descrita como uma proteína potencialmente envolvida em reparo de DNA. Através de experimentos de imuno-precipitação, observou-se interação entre HJURP e as proteínas hMSH5 e NBS1, que atuam ao reparo de quebras de fita dupla no DNA através do mecanismo de recombinação homóloga. Neste trabalho foi visto ainda, que a expressão de HJURP é induzida quando células HeLa são expostas aos agentes genotóxicos (KATO *et al.*, 2007). Porém, sua possível função no reparo ainda não foi bem caracterizada e não houve relatos adicionais da atuação de HJURP nestas vias.

Outra função molecular descrita para HJURP é sua atividade na montagem da cromatina da região centromérica, atuando no recrutamento de CENP-A para os nucleossomos do centrômero de cromossomos recém-replicados (FOLTZ *et al.*, 2009; DUNLEAVY *et al.*, 2009). HJURP também é capaz de promover a formação de centrômeros ectópicos pelo recrutamento de CENP-A para regiões genômicas não centroméricas, quando 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. Brevemente, já foi demonstrado que HJURP atua na forma dimérica (ZASADZINSKA *et al.*, 2013), liga-se à CENP-A através de sua região N-terminal (NARDI *et al.*, 2016), e é recrutada para o centrômero através do complexo Mis18 (WANG *et al.*, 2014; SUBRAMANIAN *et al.*, 2016) de forma regulada no ciclo celular pela atividade das quinases CDK1/2 (MULLER *et al.*, 2014; FALK *et al.*, 2015; STANKOVIC *et al.*, 2017). Além disso, recentemente foi demonstrado que a perda de p53 promove o aumento da expressão de HJURP e CENP-A durante o desenvolvimento do câncer (FILIPESCU *et al.*, 2016).

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, revelaram que a HJURP é recrutada para o local da lesão (**figura 6**). Vimos ainda que o recrutamento ocorre em estágios bem iniciais da resposta ao dano e de forma independente da ativação de ATM. 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 6. Recrutamento de HJURP para região de dano ao DNA após irradiação com microlaser.



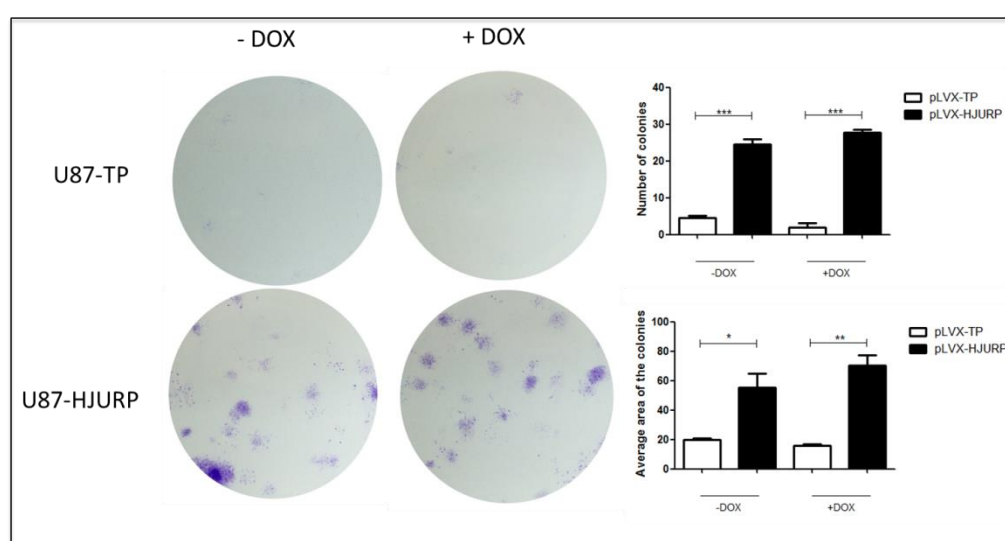
(Retirado de: Serafim *et al.*, 2017 em preparação)

Células T98G, ACBRI371 E U2OS foram plaqueadas e cultivadas por 24 horas e, então, irradiadas com microlaser, fixadas após 10 minutos para realização do ensaio imunocitoquímica utilizando anticorpo específico anti-HJURP e anti- γ H2AX. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal.

A fim de avançar na caracterização das funções de HJURP nas linhagens de GBM, nosso grupo gerou células de GBM (U87MG e T98G) e astrócitos não-tumorais (ACBRI371) superexpressoras de HJURP. A superexpressão de HJURP promoveu aumento nas taxas de proliferação da linhagem U87MG, mas não das células ACBRI371 e T98G. Interessantemente, a linhagem U87MG selvagem apresenta menores níveis de expressão de HJURP quando comparada às células T98G. Além do aumento na proliferação celular, a linhagem U87MG superexpressora de HJURP mostrou também ganho de capacidade clonogênica (**figura 7**). A partir destes resultados levantamos a

hipótese do potencial envolvimento da proteína HJURP na manutenção do estresse replicativo, sabidamente presente em células tumorais, e especialmente nas linhagens altamente proliferativas de GBM. Esta suposição também é corroborada pela observação de incremento gradativamente maior nos níveis de expressão de HJURP durante a progressão dos astrocitomas (Valente *et al.*, 2013). Neste sentido, neste trabalho investigamos se a superexpressão de HJURP afeta a capacidade proliferativa das células de GBM e sua competência para manter o genoma íntegro frente a estresse replicativo adicional e se interfere na ativação das proteínas da via de resposta ao estresse replicativo.

Figura 7. Ensaio de sobrevivência clonogênica após a superexpressão de HJURP na linhagem U87MG.



(Retirado de: Serafim *et al.*, 2017 em preparação)

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com uma densidade de 200 células / poço. Após treze dias, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (pH = 7,5). Em seguida, adicionou-se 2 mL de violeta de cristal a 0,5% e o excesso de corante foi lavado com água. As colônias foram fotografadas e analisadas com o software ImageJ.

2- *Objetivo geral*

Investigar se a superexpressão de HJURP afeta a competência das células de GBM quanto à atividade proliferativa e a manutenção da integridade genômica frente a drogas que induzem estresse replicativo adicional.

3- *Objetivos Específicos*

- 1- Determinação das taxas de proliferação celular das linhagens ACBRI371 (astrócitos não tumorais), T98G (glioblastoma) e U87MG (glioblastoma) selvagens e superexpressoras de HJURP, sem e com indução de estresse replicativo adicional (hidroxiuréia e camptotecina).
- 2- Quantificação da fragmentação de DNA nas linhagens ACBRI371, T98G e U87MG selvagens e superexpressoras de HJURP após indução de estresse replicativo.
- 3- Determinação dos níveis de expressão e ativação das proteínas RPA32/2, ATR, ATRIP e H2AX nas linhagens ACBRI371, T98G e U87MG selvagens e superexpressoras de HJURP sem e com indução de estresse replicativo.

4- Materiais e Métodos

Cultivo celular

As linhagens de GBM U87MG (HTB-14™) e T98G (CRL-1690™) foram obtidas da coleção da ATCC. A linhagem ACBRI371 utilizada como controle, foi obtida no laboratório da Professora Elza Tiemi Sakamoto Hojo da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Para esse trabalho utilizamos as linhagens ACBRI371, T98G e U87MG carregando uma construção para superexpressão da proteína HJURP. As células foram geradas durante o doutorado do aluno Rodolfo Bortolozo Serafim. O gene HJURP foi subclonado do vetor POTB7 no vetor pLVX-Tigh-Puro (Lenti-X Tet-on Advandec Inducible Expression, Clontech). Para a produção dos vírus células HEK293T foram transfectadas com o vetor de interesse e o sistema de empacotamento lentiviral, de acordo com as instruções do fabricante. Após 72 horas, foi coletado o meio contendo o vírus e então as linhagens ACBRI371, T98G e U87MG foram infectadas. Para a indução de HJURP as células foram cultivadas com doxiciclina 0,1µg/mL. Então as linhagens foram nomeadas da seguinte maneira, ACBRI371-TP (vetor Tigh-Puro vazio), ACBRI371-H (construção para superexpressão de HJURP), T98G-TP (vetor Tigh-Puro vazio), T98-H (construção para superexpressão de HJURP), U87MG-TP (vetor Tigh-Puro vazio) e U87MG-H (construção para superexpressão de HJURP).

Todas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100U/mL de penicilina, estreptomicina 0.1mg/mL e anfotericina B 0.25mg/mL (Sigma Aldrich) mantidas em incubadoras a 5% de CO₂ a 37°C, até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Quando atingida a confluência adequada, as células foram descoladas da garrafa de cultura através do uso de tripsina e transferidas para microplacas adequadas para cada ensaio.

Tratamento para indução do estresse replicativo

Para avaliar o comportamento das linhagens frente ao estresse replicativo as células foram tratadas por 24 horas com 200µM de hidroxiuréia (HU) solubilizada em meio meio Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM, Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). Outra condição utilizada foi a de 24 horas de tratamento na concentração de 0,1046µg de Camptotecina (CPT)

(Sigma Aldrich), solubilizada em NaOH 1M e diluída em meio DMEM *high-glicose* suplementado com 10% SFB.

Ensaio de proliferação através de coloração com violeta cristal

Foram plaqueadas 2.000 células por poço em placas de 24 poços. Nos tempos indicado, o meio foi removido e as células fixadas em álcool 70% (Sigma-Aldrich). Então, foi adicionado 300ul de violeta cristal 0.5% (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 30 minutos. Após a incubação, o excesso de corante foi removido com água deionizada e então incubado com 300ul de ácido acético 10% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. A leitura foi realizada logo após em espectrofotômetro (BioRad) no comprimento de onda de 540nm.

Quantificação da fragmentação de DNA – ENSAIO DO COMETA

O ensaio do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988). A suspensão células de 6×10^4 células por poço cultivadas em placas de 24 poços e com um volume final de 500uL/poço. Após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas por 24 horas com 200uM de Hidroxiuréia (Sigma-Aldrich), utilizando as mesmas concentrações do ensaio de proliferação celular. Como controle negativo (CN) foram utilizadas células sem tratamento e como controle positivo (CP) as células foram tratadas por 10 minutos com 0,001M de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Após 24 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e centrifugadas e então resuspendidas em agarose baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich) à 37 graus e colocadas em lâminas previamente revestidas com agarose (Life-Technologies). A lise celular foi realizada em condição alcalina por 18 horas a 8 graus e protegida da luz. A corrida de eletroforese ocorreu por 25 minutos a 25 volts. Então as lamina foram mergulhadas em tampão de neutralização (Tris-HCl) por 10 minutos e em seguida fixadas com álcool etílico.

Para a análise em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse) as lamina foram coradas com brometo de etídio, fotografadas 50 células por lamina, totalizando 100 células por condição. As imagens adquiridas foram analisadas no software CometScore, e a porcentagem de DNA na cauda foi o parâmetro utilizado para análise.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e western blot

A quantificação das proteínas estudadas nesse projeto tratadas e não tratadas com hidroxiuréia foi realizada por *western blot*. Inicialmente as amostras protéicas foram

separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com tampão TBS-T (TBS 1X, 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado (Molico), *overnight* em câmara fria sob agitação. Ainda em agitação as membranas foram lavadas com tampão TBS-T 1X. Após a lavagem as membranas foram incubadas por 1 hora e meia a temperatura ambiente na presença de anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas, diluídos adequadamente. Posteriormente, após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi tratada com reagentes para revelação através de quimioluminescência e exposta a filme autorradiográfico.

Tabela1. Relação dos anticorpos utilizados no projeto.

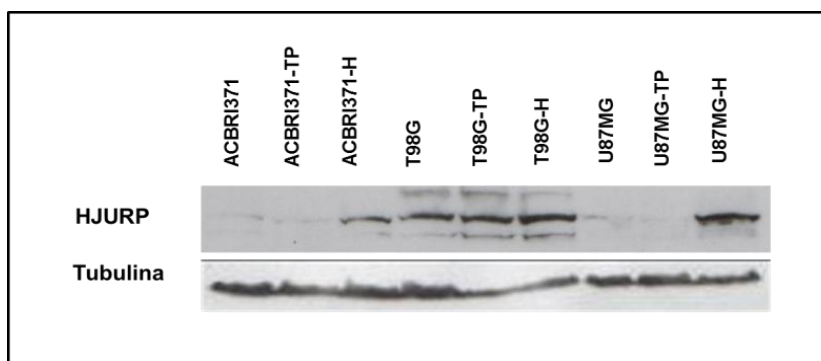
Proteínas	Marca/ Código/Diluição		
RPA 32/RPA2	ABCAM	ab2175	1/1000
RPA 32/RPA 2 FOSF. Ser33	ABCAM	ab87278	1/500
ATRIP FOSF.Ser68	ABCAM	ab192192	1/500
ATR	ABCAM	ab10312	1/1000
ATR FOSF.Ser428	ABCAM	ab178407	1/1000
γ H2AX FOSF. Ser139	ABCAM	ab184520	1/2000.

5 - Resultados e Discussão

Estabelecimento da condição de estresse replicativo nos astrócitos e linhagens de GBM superexpressoras de HJURP

As linhagens superexpressoras de HJURP utilizadas neste projeto foram geradas previamente pelo estudante de doutorado Rodolfo Bortolozo Serafim, conforme descrito nos materiais e métodos. Foram utilizados os astrócitos não tumorais ACBRI371 e as linhagens de glioblastoma T98G e U87MG transformadas com o vetor vazio ou o vetor carregando a construção para superexpressão da HJURP de forma induzível. Inicialmente, verificamos o nível de expressão de HJURP nestas células (**figura 8**). Pode-se observar que as três linhagens que carregam a construção para indução de HJURP (**figura 8 raias 3, 6 e 9**) apresentam maior quantidade da proteína, porém o incremento é bem mais relevante nas células ACBRI371 e U87MG, nas quais a expressão de HJURP é muito menor originalmente.

Figura 8. Níveis de proteína HJURP nas linhagens ACBRI371, U87MG e T98G selvagens e superexpressoras.



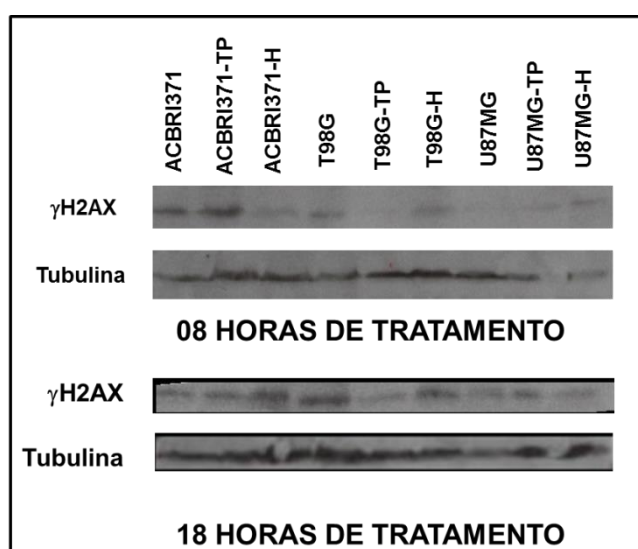
Foram plaqueadas 2×10^5 células por poço, cultivadas em placas de 6 poços, com meio contendo 0,1µg/ml de doxiciclina para a ativação do vetor de expressão, conforme determinado previamente. Após 48 horas realizadas foi realizada a lise, eletroforese em gel de SDS-PAGE e western blot. A linhagem contendo o vetor vazio (controle) utilizou a sigla TP (Tigh Puro), à sigla HJURP corresponde ao vetor que carrega a superexpressão da proteína.

A fosforilação da variante de histona H2AX é considerada a principal marca de existência de dano no DNA ou presença de estresse replicativo. A fosforilação pode ocorrer em resposta à quebra de dupla fita e consequente ativação de ATM, ou ainda a presença de DNA fita simples que promove ativação de ATR, ambas as quinases que têm entre seus alvos a histona H2AX (ZEMAN & CIMPRICH, 2014). Portanto, utilizamos este

parâmetro para definir qual condição seria empregada na indução de estresse replicativo exógeno e, posteriormente, aplicada em todos os outros experimentos.

Para a definição da concentração de hidroxiuréia a ser utilizada na indução do estresse replicativo, nos baseamos em dados prévios do nosso grupo e escolhemos 200 $\mu\text{g/mL}$, que promove apenas cerca de 15% de perda de viabilidade nas células de GBM selvagens (Sousa JF, nosso grupo). Essa concentração é amplamente citada na literatura para indução de estresse replicativo em estudos que utilizam ensaios de *western blot*. Então, realizamos a quantificação de histona H2AX fosforilada (γH2AX) para mensurar a ocorrência de danos no DNA em células tratadas com hidroxiuréia. Inicialmente, realizamos o ensaio com diferentes tempos de tratamento (8, 18, 24 e 48 horas) a fim de avaliar qual deles era mais adequado para detecção de condição de estresse. O primeiro tempo no qual detectamos a presença de γH2AX para todas as linhagens analisadas foi 18 horas (**figura 9**), a qual permaneceu ativada nos tempos mais longos. Portanto, para obter lisados protéicos de melhor qualidade estabelecemos 18 horas de tratamento como nosso tempo de análise.

Figura 9. Quantidade de γH2AX nos astrócitos não-tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras após o tratamento com hidroxiuréia.



Foram plaqueadas 2×10^5 células por poço, cultivadas em placas de 6 poços, com meio contendo 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de doxíciclina para a ativação do vetor de expressão, conforme determinado previamente. Após 24 horas realizadas foi realizado o tratamento nos tempos indicados utilizando hidroxiureia e então a lise, eletroforese em gel de SDS-PAGE e western blot. A linhagem contendo o vetor vazio (controle) utilizou a sigla TP (Tigh Puro), à sigla HJURP corresponde ao vetor que carrega a superexpressão da proteína.

A superexpressão da HJURP não altera a capacidade de proliferação e resistência ao estresse replicativo da linhagem T98G

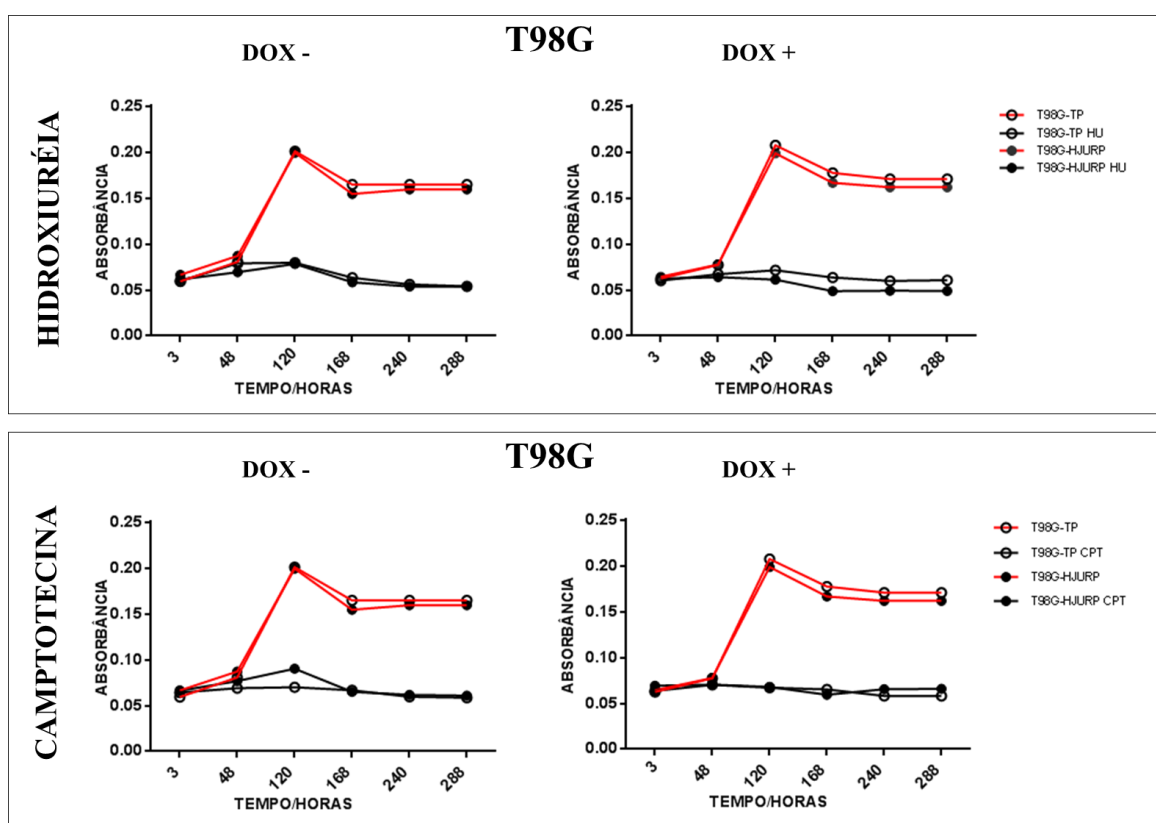
Para determinar as taxas de proliferação celular das diferentes linhagens aqui estudadas, em condições normais e de estresse replicativo, determinamos a curva de crescimento das mesmas através do ensaio de violeta cristal na ausência e presença de hidroxiuréia (HU) ou camptotecina (CPT). Primeiramente, observamos que as células T98G-HJURP não apresentam alterações em suas taxas proliferativas após a indução de HJURP (DOX+), quando comparadas com as células T98G-TP (**figura 10**). Na presença de estresse replicativo induzido exogenamente, observamos claramente que tanto as células T98G-TP quanto as células T98G-HJURP são muito sensíveis a ambos os tratamentos utilizados, e mostram bloqueio da atividade proliferativa na condição de estresse mesmo quando a expressão de HJURP é induzida (**figura 10**). Portanto, nesta linhagem, a indução de superexpressão de HJURP não promoveu fenótipo de ganho proliferativo em condições normais ou sob estresse replicativo exógeno.

Dentre as linhagens de GBM que utilizamos como modelo, a T98G é a que apresenta a maior taxa de proliferação e os mais altos níveis de expressão de HJURP endógena (Serafim RB nosso grupo). Desse modo, as células T98G selvagens apresentam um quadro de alto estresse replicativo já instalado. Estas características provavelmente contribuem para a alta sensibilidade destas células ao estresse replicativo exógeno e o fato da superexpressão de HJURP não proporcionar resistência ao estresse adicional. Adicionalmente, no projeto de doutorado de outra estudante do nosso grupo, onde avaliamos a sensibilidade de diferentes linhagens de GBM frente ao tratamento com drogas promotoras de estresse replicativo, a linhagem T98G mostrou-se mais sensível quando comparada com a U87MG (Sousa JF, nosso grupo). Conjuntamente, estes dados sugerem que as células T98G estão proliferando em condições limítrofes de estresse replicativo e saturadas na expressão de HJURP.

Esse resultado corrobora com dados da literatura que relatam a possibilidade de dois comportamentos muito distintos, frente ao estresse replicativo exógeno, para células com altas taxas proliferativas e consequente instalação de altos níveis de estresse replicativo endógeno. Estas células podem reparar mais eficientemente as lesões adicionais geradas no DNA ou entrar em colapso de replicação, uma vez que a maquinaria de sinalização e reparo pode estar exaurida devido ao seu comprometimento com a manutenção do estresse endógeno decorrente da proliferação acelerada (TAYLOR &

LINDSAY, 2015; BOYER *et al.*, 2016). Neste sentido, vários estudos tem buscado explorar a potencial ação seletiva das drogas que promovem estresse replicativo para o tratamento do câncer, pois acredita-se que as células normais possam controlar o estresse replicativo induzido exogenamente de modo mais eficiente devido a maior disponibilidade da maquinaria de reparo.

Figura 10. Curva de crescimento das células T98G controles e superexpressoras de HJURP sem e com indução de estresse replicativo exógeno



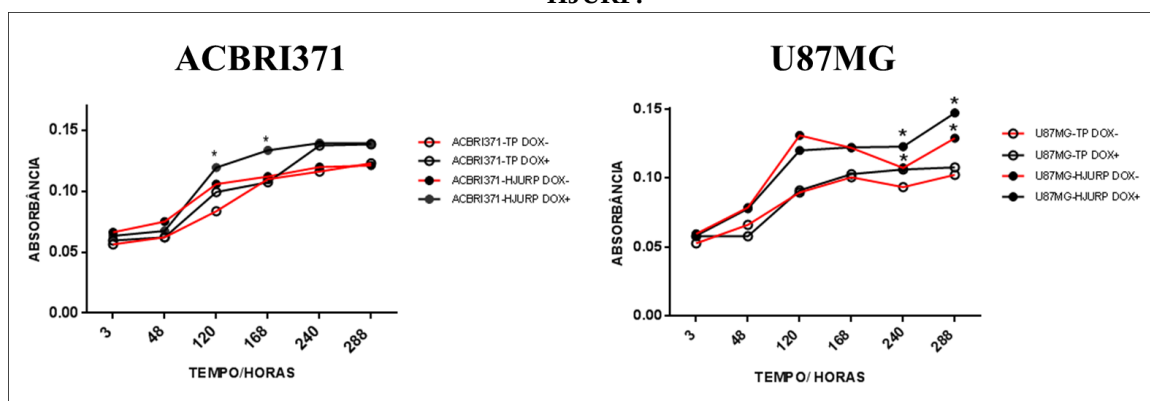
Quantificação da proliferação celular das células T98G-TP e T98G-HJURP. 2.000 células por poço foram plaqueadas em placas de 24 poços, incubadas para crescimento pelos tempos indicados com e sem tratamento com hidroxuréia (HU) e camptotecina (CPT) e, então, coradas com violeta cristal à 0,05%. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 540nm. O experimento foi realizado em triplicata e o teste estatístico t não pareado foi aplicado com intervalo de confiança $p < 0,05$ utilizando o software Prisma. As células superexpressoras de HJURP foram comparadas com as células carregando o vetor vazio (TP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

As linhagens ACBRI371 e U87MG ganham capacidade ploliferativa e resistência ao estresse replicativo com a superexpressão da HJURP

Através do ensaio de proliferação observamos que as células ACBRI371 e U87MG aumentam sua capacidade proliferativa após a superexpressão da HJURP. A linhagem

ACBRI371 mostrou crescimento significativamente maior quando superexpressando HJURP (ACBRI-HJURP-DOX+) nos tempos de 120 e 168 horas, e a linhagem U87MG superexpressora apresentou maiores taxas de crescimento nos tempos de 240 e 288 horas (U87-HJURP-DOX+) (**figura 11**).

Figura 11. Curva de crescimento das linhagens ACBRI371 e U87MG controle e superexpressoras de HJURP.

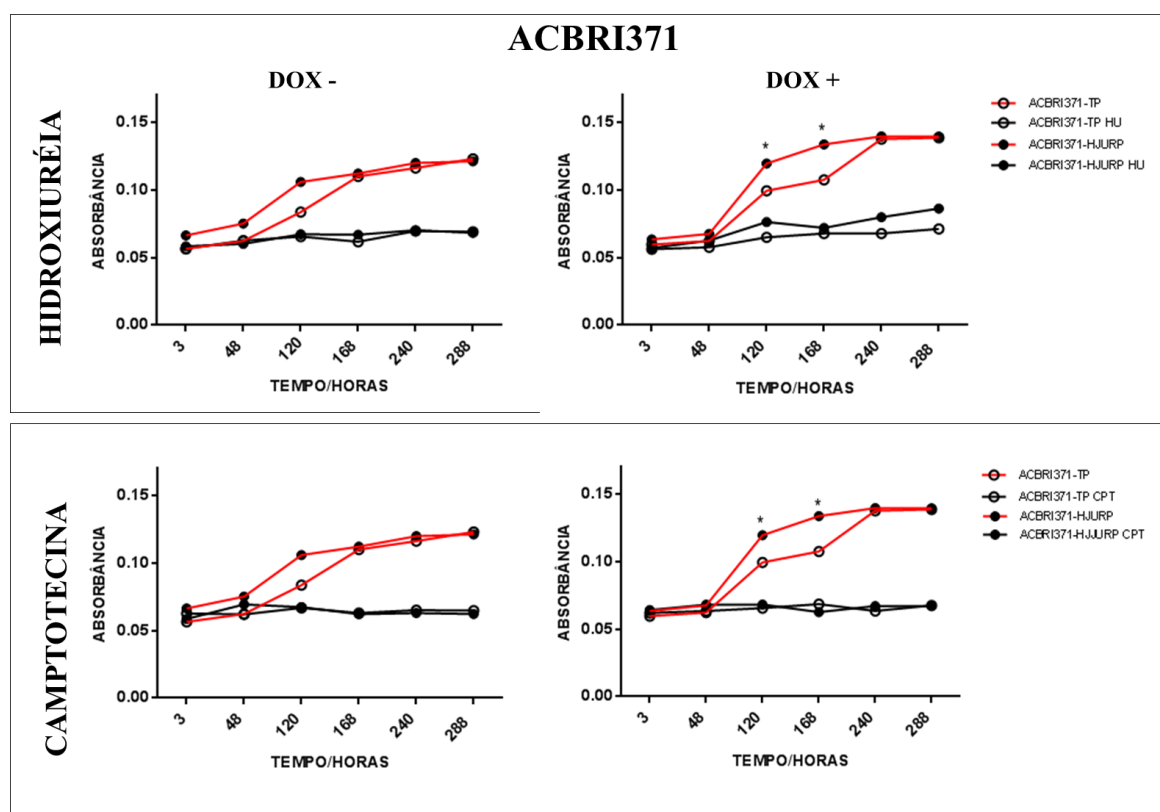


Quantificação da proliferação celular das células ACBRI371-TP e ACBRI371-HJURP, U87MG-TP e U87MG-HJURP. 2.000 células por poço foram plaqueadas em placas de 24 poços, incubadas para crescimento pelos tempos indicados sem tratamento e, então, coradas com violeta cristal à 0,05%. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 540nm. O experimento foi realizado em triplicata e o teste estatístico t não pareado foi aplicado com intervalo de confiança $p < 0,05$ utilizando o software Prisma. As células superexpressoras de HJURP foram comparadas com as células carregando o vetor vazio (TP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Para investigar se a superexpressão da HJURP poderia contribuir para a manutenção do estresse replicativo, determinamos a curva de crescimento destas células também na presença das drogas HU e CPT para promover estresse replicativo exogenamente. Na **figura 12** podemos observar que a linhagem ACBRI371 é bastante sensível às drogas promotoras de estresse replicativo que utilizamos, sendo que nas condições tratadas a proliferação foi praticamente bloqueada tanto para células controle quanto para células superexpressoras da HJURP. No caso da linhagem U87MG, observamos maiores taxas de proliferação nas células superexpressoras (U87MG-HJURP) do que nas células controle (U87MG-TP) mesmo sob estresse replicativo adicional (**figura 13**). Adicionalmente, pode-se notar que as células U87MG-HJURP apresentam maiores taxas de proliferação do que as células U87MG-TP, quando tratadas com camptotecina, mesmo sem a indução de HJURP (sem doxociclina). Isto se deve ao vazamento de expressão do vetor utilizado, que possibilita a superexpressão de HJURP mesmo sem a presença de doxociclina (Serafim RB, nosso grupo).

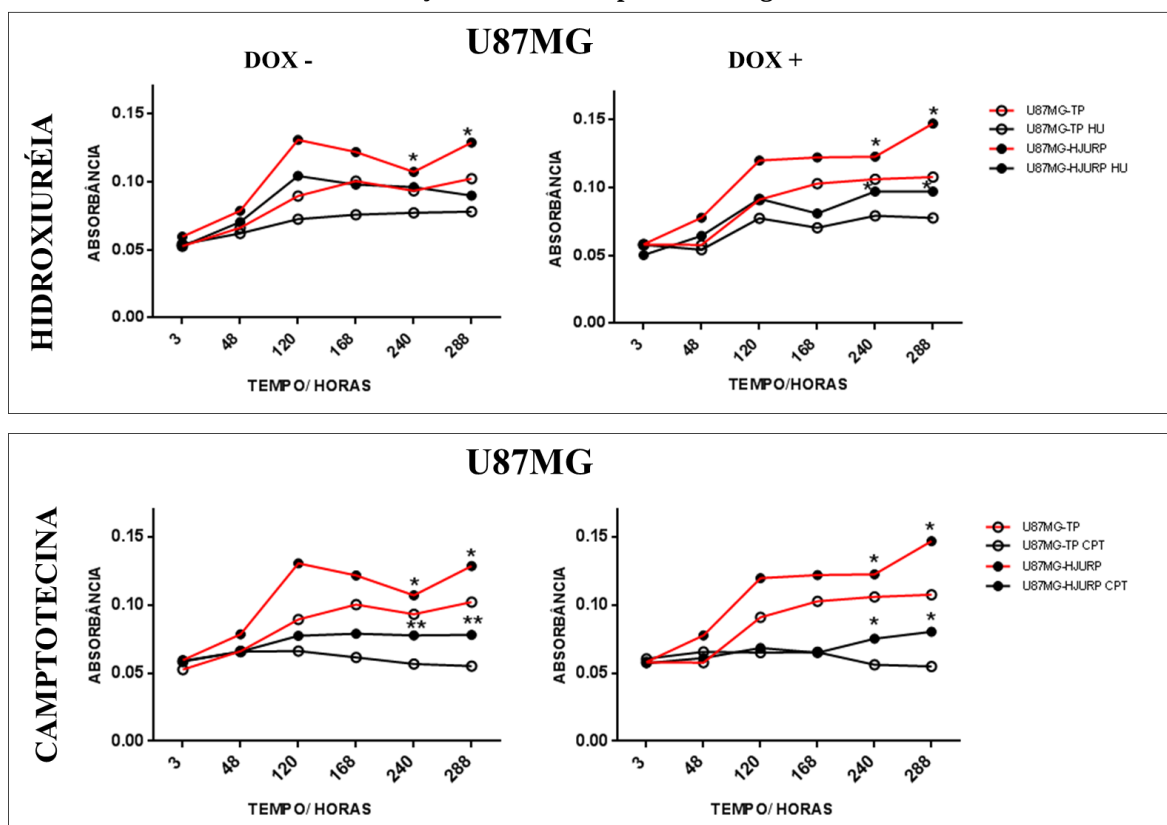
Estes dados revelam que o incremento na expressão da HJURP proporciona maior resistência ao estresse replicativo para as células U87MG, possibilitando maior atividade proliferativa mesmo em condições de estresse adicional promovido exogenamente. Estes dados sugerem que o ganho de competência proliferativa e clonogênica das células superexpressoras, que observamos previamente, possa estar relacionado a maior eficiência na atividade de reparo de DNA de potenciais danos induzidos pelo estresse.

Figura 12. Curva de crescimento da linhagem ACBRI371 controle e superexpressora de HJURP após indução de estresse replicativo exógeno.



Quantificação da proliferação celular das células ACBRI371-TP e ACBRI371-HJURP. 2.000 células por poço foram plaqueadas em placas de 24 poços, incubadas para crescimento pelos tempos indicados com e sem tratamento com hidroxuréia (HU) e camptotecina (CPT) e, então, coradas com violeta cristal à 0,05%. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 540nm. O experimento foi realizado em triplicata e o teste estatístico t não pareado foi aplicado com intervalo de confiança $p < 0,05$ utilizando o software Prisma. As células superexpressoras de HJURP foram comparadas com as células carregando o vetor vazio (TP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Figura 13. Curva de crescimento da linhagem U87MG controle e superexpressora de HJURP após indução de estresse replicativo exógeno.



Quantificação da proliferação celular das células U87MG-TP e U87MG-HJURP. 2.000 células por poço foram plaqueadas em placas de 24 poços, incubadas para crescimento pelos tempos indicados com e sem tratamento com hidroxauréia (HU) e camptotecina (CPT) e, então, coradas com violeta cristal à 0,05%. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 540nm. O experimento foi realizado em triplicata e o teste estatístico t não pareado foi aplicado com intervalo de confiança $p < 0,05$ utilizando o software Prisma. As células superexpressoras de HJURP foram comparadas com as células carregando o vetor vazio (TP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

As linhagens ACBRI371 e U87MG superexpressoras de HJURP apresentam menos fragmentação de DNA após indução de estresse replicativo exógeno

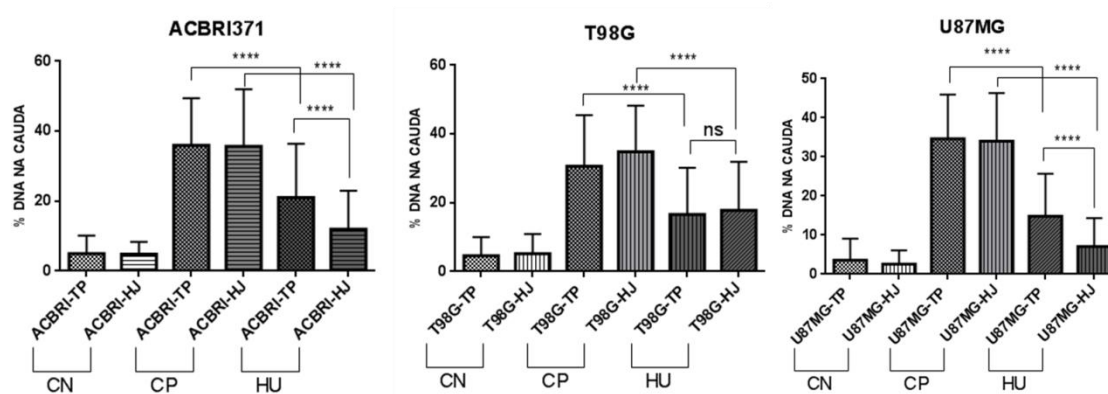
Para investigar se a superexpressão da HJURP de fato confere maior competência de reparo de quebras nas dupla-fita de DNA provenientes do estresse replicativo, realizamos o ensaio do cometa nas células controle e superexpressoras após tratamento com hidroxauréia. Como esperado a linhagem T98G, com ou sem indução de HJURP, não mostrou diferenças na porcentagem de DNA fragmentado quando tratada com hidroxauréia. Já as células ACBRI371 e U87MG apresentaram menor fragmentação de DNA quando a superexpressão da HJURP foi induzida (**figura 14**). Consistentemente, estas duas linhagens mostraram maior capacidade proliferativa mesmo em contato com

drogas que induzem o estresse replicativo exógeno. Uma vez que dados recentes do nosso grupo revelaram a participação efetiva da HJURP no reparo de danos induzidos por irradiação ionizante, podemos supor que a superexpressão de HJURP, no contexto de células com alto estresse replicativo, pode conferir capacidade de reparar as lesões de modo mais eficiente e assim permitir a proliferação mais acelerada. Dada a função de HJURP pressupor a incorporação de CENPA na cromatina, podemos especular que o controle do estresse replicativo mediado pela HJURP possa envolver o recrutamento de CENPA os locais de lesão provenientes de colapso de forquilhas de replicação, uma hipótese que pretendemos verificar futuramente.

No ensaio do cometa que realizamos, onde foi feita a lise alcalina das células, foram quantificadas quebras de dupla-fita (DSB) e também a presença de DNA fita simples (ssDNA). Em nosso experimento, inicialmente, ocorrerá um acúmulo de ssDNA devido ao contato com HU. Em seguida, ocorrem as quebras de dupla fita de DNA devido à não processividade das forquilhas. Pretendemos também realizar este experimento em condições de lise neutra para quantificar separadamente as DSB e ssDNA. No entanto, na literatura está bem descrito que a presença de estresse replicativo, ou seja, grandes extensões de ssDNA, promove maiores taxas de quebras no DNA nas células tumorais (STIFF T. *et al.*, 2006). Assim, durante a progressão do câncer é também descrito que as células tumorais desenvolvem mecanismos que permitem reparar mais eficientemente essas lesões e assim continuar sua proliferação (TAYLOR & LINDSAY 2015; BOYER *et al.*, 2016). Desse modo, nossos dados indicam que a HJURP atua justamente nesta via, promovendo a maior capacidade de reparo de quebras e a proliferação mais acelerada que observamos nas linhagens ACBRI371 e U87MG superexpressoras.

Conjuntamente, estes dados revelam que a aquisição de competências exacerbadas nas vias de sinalização e reparo de danos no DNA têm papel fundamental na evolução tumoral, permitindo que células com capacidade proliferativa progressivamente maior possam lidar com os altos níveis de estresse replicativo e sobreviver. Recentemente, foi relatado que a indução da superexpressão do gene E1a na linhagem de GBM U87MG promoveu maior proliferação e aumento de estresse replicativo, e também maior sensibilidade à inibição de CHK1. Além disso, observaram ainda que, quando expostas à radiação ionizante, as células U87MG superexpressoras de E1a apresentam aumento de morte celular, com parada G2/M e acúmulo de ciclina B1 (HOGLUND *et al.*, 2011) (VALERO 2014). Estes dados evidenciam a importância das vias de sinalização de ATR para células altamente proliferativas e apoiam a nossa hipótese.

Figura 14. Quantificação da fragmentação de DNA após tratamento com hidroxiuréia.



A porcentagem de fragmentação do DNA foi mensurada através do ensaio do cometa com lise alcalina. Após o tratamento por 24 horas com HU, 6×10^4 células foram colocadas em laminais contendo agarose, após a lise e eletroforese as células foram fixadas e marcadas com brometo de etídio, as células foram fotografadas utilizando microscópio de fluorescência. A quantificação do DNA fragmentado foi realizada utilizando o software *CometScore*. A porcentagem de DNA na cauda foi utilizada como parâmetro e os valores plotados correspondem a média de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pela análise de variância One way ANOVA, com pós-teste de Dunts. * $P < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Outro relato da literatura que apoia a nossa interpretação aborda o estudo do gene DMC1 em células U87MG. A superexpressão de DMC1 foi demonstrada em diferentes tipos tumorais como melanoma, linfoma, mama e cólon. Além disso, foi observado que após irradiação ionizante essas células apresentam aumento na expressão de DMC1. DMC1 é uma proteína de recombinação meiótica que normalmente não atua em células somáticas. DMC1 tem atividade redundante com RAD51, que liga-se aos trechos de ssDNA revestidos por RPA e, assim, permite a ressecção e o reparo através de recombinação homóloga. Quando realizado o silenciamento de DMC1 na linhagem U87MG, as células tornaram-se mais sensíveis à irradiação ionizante e houve aumento de morte celular (RIVERA *et al.*, 2015). Estes dados reforçam a ideia de que o ganho de competências na atividade de reparo de DNA é fundamental para a sobrevivência de células com proliferação acelerada e revelam potenciais alvos terapêuticos.

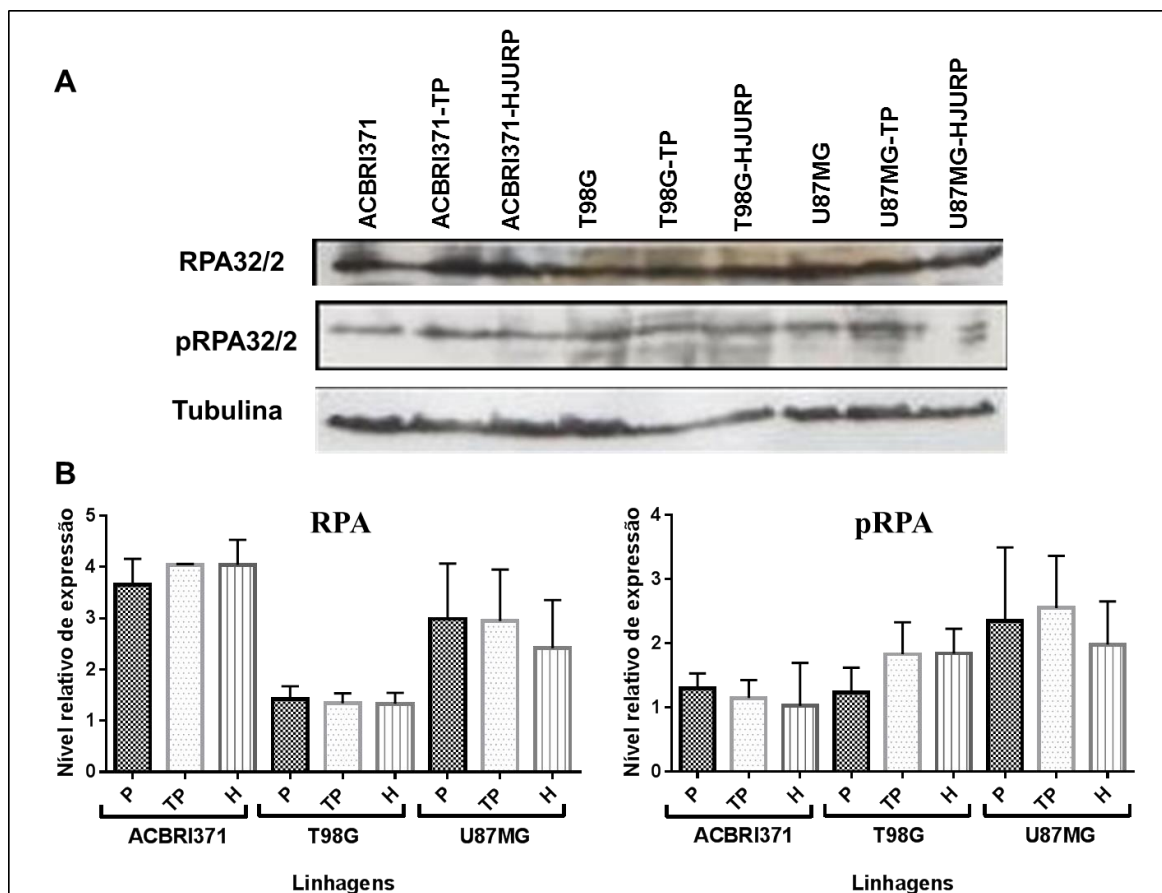
Avaliação da ativação das proteínas que respondem ao estresse replicativo nas células superexpressoras de HJURP

Sabe-se que a alteração da estrutura da cromatina é fundamental para o controle de modificações pós-traducionais que poderiam afetar a atividade de proteínas iniciais da via

de reconhecimento e sinalização de danos ao DNA (BRENDAN & D'ANDREA, 2013). Uma vez que a HJURP atua potencialmente no remodelamento da cromatina promovendo a incorporação da variante de histona CENPA, investigamos aqui o impacto da superexpressão de HJURP nos níveis de ativação (fosforilação) de proteínas que respondem ao estresse replicativo: RPA, ATR/ATRIP e H2AX. Como descrito anteriormente o recrutamento da proteína RPA ao local com presença de DNA fita simples, é considerado a primeira marca de reconhecimento do fenótipo de estresse replicativo, e sua fosforilação promove em seguida o recrutamento de ATR/ATRIP. ATRIP é parceira obrigatória da quinase ATR, em conjunto as duas são recrutadas para o local do estresse replicativo, logo após a fosforilação da proteína RPA. A histona H2AX é um dos alvos de ATR e, quando fosforilada (γ H2AX), permite o prosseguimento da sinalização (CORTEZ *et al.*, 2001). Não observamos diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das proteínas analisadas (**figuras 15, 16, 17 e 18**). Entretanto, estes resultados ainda não são conclusivos e podem estar relacionados com problemas técnicos na confecção do *western blots*, pois tivemos baixa reprodutibilidade nos diferentes experimentos realizados. Estamos trabalhando para otimização das condições deste método e pretendemos repetir estas análises para inclusão dos resultados na publicação.

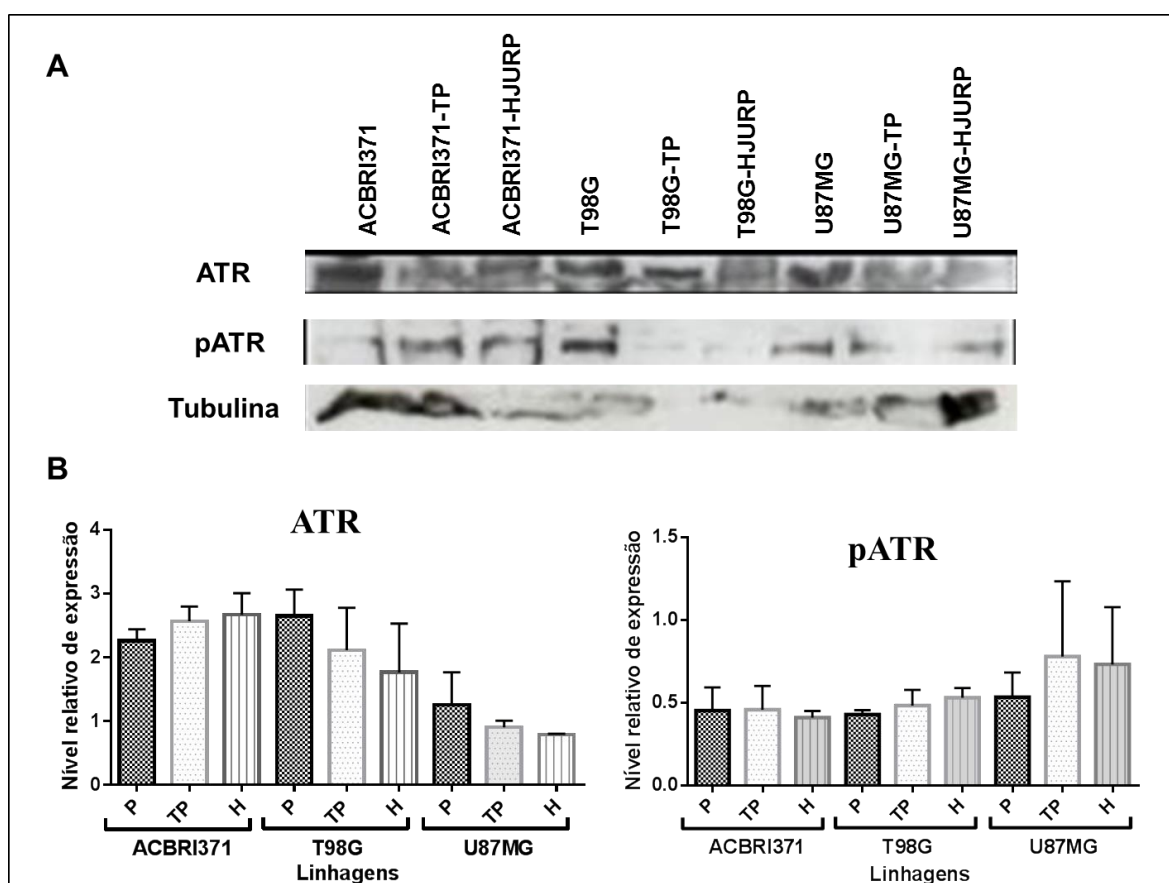
Embora os resultados de quantificação das proteínas fosforiladas ainda não sejam conclusivos, observamos uma tendência à redução de γ H2AX nas células U87MG superexpressoras submetidas ao estresse replicativo (**figura 18**). Esta observação é apoiada por resultados de experimentos de detecção de *focus* de γ H2AX, através imunofluorescência, realizados em outro projeto do laboratório. Essa resposta estaria em acordo com os dados de menor porcentagem de fragmentação de DNA e ainda aumento da proliferação celular frente ao estresse replicativo, corroborando a hipótese de que HJURP colabora para a eficiência de reparo de lesões provenientes do estresse replicativo.

Figura 15. Quantificação da ativação de RPA nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP.



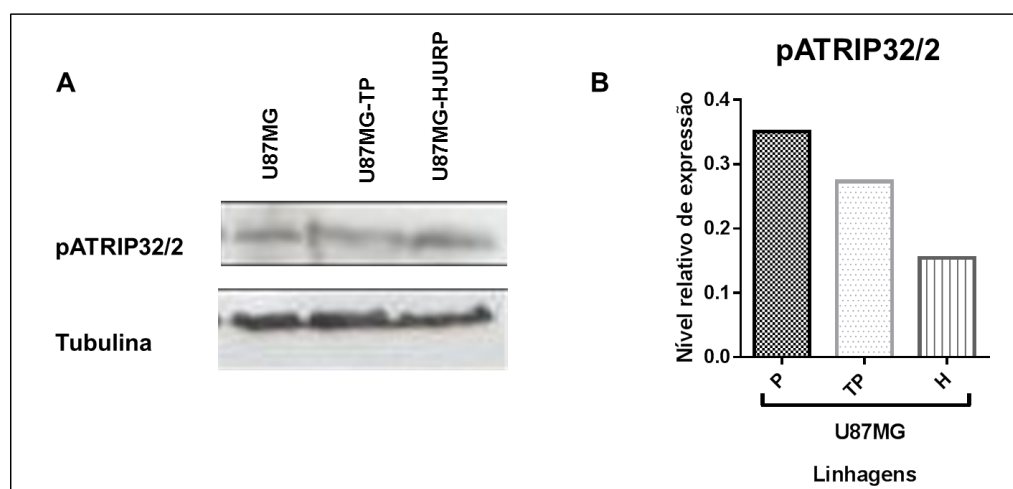
A. As células indicadas foram cultivadas na presença de hidroxiuréia e doxíciclina, para indução da expressão da HJURP, durante 18 horas. Em seguida, os lisados protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blotting*. Foi utilizado anticorpo contra a proteína RPA e RPA fosforilada (pRPA). **B.** As bandas do *western blot* mostrado na parte A da figura foram quantificadas com o software image J e os valores da densitometria foram plotados com o software Prisma.

Figura 16. Quantificação da ativação de ATR nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP.



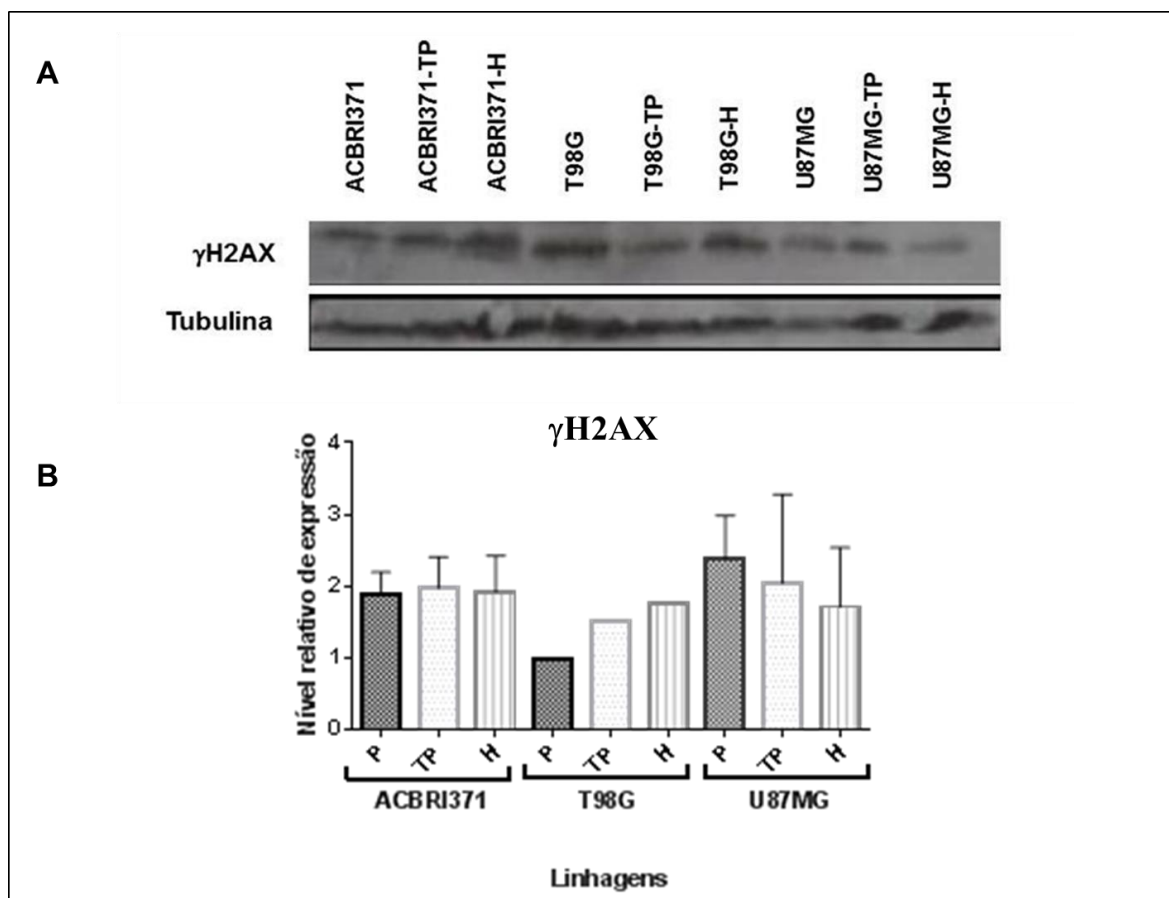
A. As células indicadas foram cultivadas na presença de hidroxiuréia e doxíciclina, para indução da expressão da HJURP, durante 18 horas. Em seguida, os lisados protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blotting*. Foi utilizado anticorpo contra a proteína ATR e ATR fosforilada (pATR). **B.** As bandas do *western blot* mostrado na parte A da figura foram quantificadas com o software image J e os valores da densitometria foram plotados com o software Prisma.

Figura 17: Quantificação da ativação de ATRIP na linhagem de GBM U87MG selvagem e superexpressora de HJURP.



A. As células indicadas foram cultivadas na presença de hidroxiuréia e doxíciclina, para indução da expressão da HJURP, durante 18 horas. Em seguida, os lisados protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blotting*. Foi utilizado anticorpo contra a proteína ATRIP fosforilada (pATR). **B.** As bandas do *western blot* mostrado na parte A da figura foram quantificadas com o software image J e os valores da densitometria foram plotados com o software Prisma.

Figura 18: Quantificação de γ H2AX nos astrócitos não tumorais e nas linhagens de GBM selvagens e superexpressoras de HJURP



A. As células indicadas foram cultivadas na presença de hidroxiuréia e doxíciclina, para indução da expressão da HJURP, durante 18 horas. Em seguida, os lisados protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blotting*. Foi utilizado anticorpo contra a proteína H2AX fosforilada (γ H2AX). **B.** As bandas do *western blot* mostrado na parte A da figura foram quantificadas com o software image J e os valores da densitometria foram plotados com o software Prisma.

6 - Conclusão

Foi possível concluir que as linhagens ACBRI371 e U87MG superexpressoras de HJURP apresentam maior capacidade proliferativa devido a um incremento na sua competência de reparar quebras na dupla-fita de DNA provenientes de estresse replicativo. Concluímos também que nas células T98G o incremento na quantidade de HJURP não proporciona aumento na atividade de proliferação ou competência para o reparo de lesões induzidas por estresse replicativo adicional, o que sugere que estas células estão proliferando no limite de sua capacidade e com alto nível de estresse já instalado. Como esta linhagem apresenta expressão endógena de HJURP já bastante aumentada, em relação às células ACBRI371 e U87MG, podemos também supor que estas células teriam um excesso de proteína HJURP já disponível, o que explicaria a ausência de fenótipos com a superexpressão.

Os resultados de quantificação da ativação das proteínas que respondem ao estresse replicativo não foram conclusivos devido a falta de reprodutibilidade, porém sugerem uma redução de γ H2AX nas células U87MG superexpressoras submetidas ao estresse replicativo, o que apoia a suposição de que HJURP contribui para a eficiência de reparo de lesões provenientes do estresse replicativo.

Conjuntamente, estes dados corroboram a hipótese de que a aquisição de competências nas vias de sinalização e reparo de danos no DNA têm papel fundamental na evolução tumoral, permitindo que células com capacidade proliferativa progressivamente maior possam lidar com os altos níveis de estresse replicativo e sobreviver. Estas observações estão de acordo com dados anteriores do nosso grupo que revelaram que a expressão de HJURP é crescente nos casos de astrocitomas de maior grau.

Referências

- BOYER, A.S.; WALTER, D.; SORENSE, C.S. DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol.**v.37-38, p. 16-25, 2016.
- BALL, H.L.; CORTEZ, D. ATRIP oligomerization is required for ATR dependent checkpoint signaling. **J Biol Chem**, v.280, n.36, p. 31390-31396, 2005.
- BARTKOVA, J.; BAKKENIST, C.J.; RAJPERT-DE MEYTS, E. *et al.*, ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. **Cell Cycle** v.4, p. 838–845, 2005.
- BARTKOVA, J.; HOREJSI, Z.; KOED, K. *et al.*, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**. v.434. p. 864–870, 2005.
- BARTKOVA, J.; HOREJSI, Z.; SEHESTED, M. *et al.*, DNA damage response mediators MDC1 and 53 BP1: constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours. **Oncogene**. v.26, p. 7414–7422, 2007.
- BASS, T. E.; LUZWICK, J. W.; KAVANAUGH, G. *et al.* ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. **Nature Cell Biol.** v.18, p. 1185–1195, 2016
- BATISTA, C.M.; MARIANO, E.D.; BARBOSA, B.J.A.P. *et al.*, Adult neurogenesis and glial oncogenesis: when the process fails. **Biomed Res Int.** volume 2014, Article ID 438639. DOI: <http://10.1155/2014/438639>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971505/pdf/BMRI2014-438639.pdf>.
- BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A. F. *et al.*, Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-31, 25 jan, 2003.
- BOCHMAN, M.L.; PAESCHKE, K.; ZAKIAN, V.A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. **Nat. Rev.** v.13, n.11, p. 770–780, 2012.
- BRENNAN, W.C.; VERHAAK, W.G.R.; MCKENNA, A. *et al.*, The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell.**, v.155, n.2, p. 462-477, 2013.
- BROWN, E.J.; BALTIMORE, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. **Genes Dev**, v.14, n.4, p. 397- 402, 2000.
- CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol. Cell**. v.40, 179–204, 2010.
- CIMPRICH, K.A.; SHIN, T.B.; KEITH, C.T. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. **Proc Natl Acad Sci.** v.7. p.2850-2855, 1996.

CIMPRICH, K.A.; CORTEZ, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 9: p. 616-627, 2008.

DE CICCIO, M.; RAHIM, M.S.; DAMES, S.A. Regulation of the Target of Rapamycin and Other Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases by Membrane Targeting. **Membranes (Basel).** v.5. p. 553-575, 2015.

DE SOUSA, J.F; TORRIERI, R.; SERAFIM, B.R. *et al.*, Expression signatures of DNA repair genes correlate with survival prognosis of astrocytoma patients. **Tumor Biology.** v.39, p.1–11, 2017.

DELACROIX, S.; WAGNER, J. M.; KOBAYASHI, M. *et al.*, The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. **Genes Dev.** v.21, p.1472–1477, 2007.

DUNLEAVY, E.M.; ROCHE, D.; TAGAMI, H. *et al.*, HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. **Cell.** v.137 p.485-497, 2009.

EICH, M.; ROOS, W. P.; NIKOLOVA, T. *et al.*, Contribution of ATM and ATR to the Resistance of Glioblastoma and Malignant Melanoma Cells to the Methylating Anticancer Drug Temozolomide. **Mol Cancer Ther.** v.12, p.2529–40, 2013.

FALK, S.J.; GUO, L.Y.; SEKULIC, N. *et al.*, CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. **Science.** v.348, p. 699-703, 2015.

FERRIS, P. S.; HOFMANN, W.J.; SOLOMON, D.A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. **Springer.** v.471, p. 257- 269

FILIPESCU, D.; NAUGHTIN, M.; PODSYPANINA, K. *et al.*, Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. **Genes & Development.** v. 31, p.1-18, 2017.

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, p. 472-84, 2009.

FOOTE, M.B.; PAPADOPOULOS, N., DIAZ LA J.R. Genetic classification of gliomas: refining histopathology. **Cancer Cell.** v. 28, p.9–11, 2015.

KIDIYOOR, G. R.; KUMAR, A.; FOIANI, M., ATR-mediated regulation of nuclear and cellular plasticity. **DNA Repair.** v. 24, p.143-150, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** v.144, p.646–674, 2011.

HILTON, B.A.; LI, Z.; MUSICH, P.R. *et al.*, ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. **Mol Cell,** v.60, p. 35-46, 2015.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**. v.411, p. 366–374, 2001.

HÖGLUND, A.; NILSSON, L.M.; MURALIDHARAN, S.V. *et al.*, Therapeutic implications for the induced levels of Chk1 in Myc-expressing cancer cells. **Clin Cancer**. v.17, p.7067-7079, 2011.

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, p.1-15, 2010.

HUSE, J.T.; HOLLAND, E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nat Rev Cancer**. v.10, p. 319–331, 2010.

ISHII, N.; MAIER, D.; MERLO, A. *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.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**. v. 461, p.1071–1078, 2009.

JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet neurology**, v. 9, p. 717-26, 2010.

JONES, R.M.; MORTUSEWICZ, O., AFZAL, I. *et al.*, Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie cyclin E-induced replication stress. **Oncogene** v.32, p. 3744–3753, 2013.

KAINA, B.; NAUMANN. C.; ROOSWP. S., MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair**. v.6, p.1079–1099, 2007.

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, p. 8544-8553, 2007.

KUMAR, A.;MAZZANTI, M.; MISTRIK, M. *et al.*, ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress. **Cell**. v.158, p. 633-646, 2014.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring**. v.65, p. 127–133, 2000.

LUCCA, C.; VANOLI, F.; COTTA-RAMUSINO, C. *et al.*, Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. **Oncogene**. v. 23, p. 1206-13, 2004.

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 Res.** v. 66, p.11502-11513, 2017.

MARECHAL, A.; LI, J.M.; JI, X.Y. *et al.*, PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-ssDNA after DNA Damage and Drives ATR Activation via a Ubiquitin-Mediated Circuitry. **Molecular Cell.** v.53, p.1–12, 2014.

MARECHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** v.5, p.1-17, 2013.

MATSUOKA, S.; BALLIF, B.A.; SMORGORZEWSKA, A. *et al.*, ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science.** v. 316, p. 1160–1166, 2007.

MEIR, E. G. V.; HADJIPANAYIS. C. G.; NORDEN, A. D. *et al.*, Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-193, 2010.

MULLER, S.; MONTES DE OCA, R.; LACOSTE, N. *et al.*, Phosphorylation and DNA binding of HJURP determine its centromeric recruitment and function in CenH3(CENP-A) loading. **Cell Rep.** v.8, p. 190-203, 2014.

NARDI, I.K.K.; ZASADZINSKA E.; STELLFOX M.E. *et al.*, Licensing of Centromeric Chomatin Assembly trough the Mis18a-Mis18b Heterotetramer. **Moll Cell.** v. 61, p. 774-787, 2016.

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, 2010.

OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; FULOP J. *et al.*, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008 – 2012. **Neuro-Oncology.** v.17, p.1-62, 2015.

QUIROS, S.; ROOS, W.P.; KAINA, B. Rad51 and BRCA2–New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. **PLoS ONE** v. 6, p. 1-10, 2011.

ROY, K.; WANG, L.; MAKRIGIORGOS, G. M. *et al.*, Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 344, p. 821-826, 2006.

SERAFIM R. B. Investigação do papel de HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) na resistência de células de glioblastoma multiforme à radiação ionizante. 47f. 2014. Dissertação de mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada a farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara –UNESP, Araraquara, 2014

SHANSKE, A.; CARIDE, D.G.; MENASSE-PALMER, L. *et al.*, Central nervous system anomalies in Seckel syndrome: report of a new family and review of the literature. **Am J Med Genet.** v.70, p. 155-158, 1997.

STANKOVIC, A.; GUO, L. Y.; MATA, J.F. *et al.*, A Dual Inhibitory Mechanism Sufficient to Maintain Cell-Cycle-Restricted CENP-A Assembly. **Molecular Cell.** v. 65, p. 231-246, 2017.

STIFF, T.; WALKER, S.A.; CEROSALETTI, K.; *et al.* ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. **EMBOJ.** v.25, p. 5775–5782, 2006.

SUBRAMANIAN, L.; TODA, N.R.; RAPPSILBER, J. *et al.*, Eic1 links Mis18 with the CCAN/Mis6/Ctf19 complex to promote CENP-A assembly. **Open Biol.** v.4, p.1-15, 2014.

TAYLOR, E. M.; LINDSAY H. D. DNA replication stress and cancer: cause or cure? **Future Medicine.** v.12, 2015.

THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell.** v. 155, p. 472-477, 2013.

THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature.** v.455, p. 1061- 1068, 2008.

THORNE, A. H.; ZANCA, C.; FURNARI, F. Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. **Nat Genet.** v.33, p. 497-501, 2003.

VALENTE, V.; SERAFIM R. B.; DE OLIVEIRA, L. C. *et al.*, Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PLOS One.** v.8, p.1-10, 2013.

VALENTE, V.; TEIXEIRA, S. A.; NEDER, L. *et al.* Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **Annals of Neurosciences;** v. 21, p. 1-11, 2014.

VERHAAK, R. G. W.; HOADLEY, K. A.; 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, 2010.

WANG, J.; LIU, X.; DOU, Z. *et al.*, Mitotic Regulator Mis18B interacts with and specifies the centromeric assembly of molecular chaperone holliday junction recognition protein (HJURP). **J. Biol. Chem.** v.289, p. 8326-8336, 2014.

WU, C.S.; ZOU, L. The SUMO Ligase PIAS3 Primes ATR for Checkpoint Activation. **J Biol Chem.** v.291, p. 279-290, 2015.

ZASADZINSKA, E.; BARNHART-DAILEY, M.C.; KUICH, P.H. *et al.*, Dimerization of the CCENP-A assembly factor HJURP is required for centromeric nucleosome deposition. **EMBO J.** v. 32, p. 2113-2124, 2013.

ZEMAN, M.K. ; CIMPRICH, K. A. Causes and consequences of replication stress. **Nat. Cell Biol.** v.16, p. 2–9, 2014.

ZOU, L.; ELLEDGE S.J.; Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science**, v.300, p. 1542-1548, 2003.