

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA HJURP NA REDUÇÃO DO ESTRESSE  
REPLICATIVO DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA**

Barbara Colatto Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Valente

Araraquara

2018

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

**BARBARA COLATTO FERNANDES**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA HJURP NA REDUÇÃO DO ESTRESSE  
REPLICATIVO DE LINHAGENS 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: Valeria Valente

Araraquara

2018

### **Ficha Catalográfica**

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

**F363c** Fernandes, Barbara Colatto.  
Caracterização da atividade da HJURP na redução do estresse replicativo de linhagens de glioblastoma / Barbara Colatto Fernandes. – Araraquara, 2018.  
56 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. 3. Camptotecina. 4. Camptothecin. I. Valente, Valéria, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

AKT1	Protein kinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR Interacting Protein
CCND1	Cyclin D1
CDE	Cell cycle-dependent element
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CENP-A	Centromere Protein A AProtein A
Chk1	Checkpoint kinase 1
H2AX	H2A Histone Family Member X
Chk2	Checkpoint kinase 2
DREAM complex	The dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B
E2F4	E2F Transcription Factor 4
EME1	Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
ERCC1	ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit
ETAA1	Ewings tumor-associated antigen 1
hMSH5	MutS protein homolog 5
HUS1	HUS1 Checkpoint Clamp Component
KNL2	Kinetochores null2
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
M18BP1	MIS18 Binding Protein 1
MDM2	MDM2 Proto-Oncogene
MUS81	MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
NBS1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NF1	Neurofibromatosis type 1
NRAS	NRAS Proto-Oncogene, GTPase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
RAD1	RAD1 Checkpoint DNA Exonuclease
Rad17	RAD17 Checkpoint Clamp Loader Component
Rad51	RAD51 Recombinase
RAD9	RAD9 Checkpoint Clamp Component A
RB1	RB Transcriptional Corepressor 1
RFC	Replication Factor C Subunit
RPA	Replication protein A
SKP2	S-Phase Kinase Associated Protein 2
Ser	Serina
Snail	Snail Family Transcriptional Repressor

TP53	Tumor Protein 53
TOPBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1
Twist	Twist Family BHLH Transcription Factor
UV	Ultra violeta
<i>WNT</i>	Wingless and INT pathway
WT1	Wilms Tumor 1
Zeb	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox

---

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Hallmarks* do Câncer.

**Figura 2.** Desenvolvimento tumoral via indução de estresse replicativo.

**Figura 3.** Componentes da ativação da via de ATR.

**Figura 4.** Conseqüências do estresse replicativo.

**Figura 5.** Estrutura representativa da proteína HJURP com seus domínios e funções.

**Figura 6.** A superexpressão de HJURP induz aumento das taxas de proliferação e capacidade clonogênica para linhagens de GBM.

**Figura 7.** Indução de quebras de dupla fita com microlaser nas linhagens ACBRI371 e T98G.

**Figura 8.** Curva proliferação das linhagens superexpressoras U87MG frente ao estresse replicativo por camptotecina (CPT).

**Figura 9.** Curva de proliferação da linhagem U87MG sem e com a indução do estresse replicativo por camptotecina.

**Figura 10.** Curva de proliferação da linhagem U87MG após a indução de estresse replicativo por 6 e 12 horas.

**Figura 11.** Avaliação da capacidade de recuperação das linhagens U87MG frente ao estresse replicativo causado por CPT.

**Figura 12.** Distribuição da dinâmica do ciclo células das linhagens superexpressoras de HJURP frente ao tratamento com camptotecina (CPT).

**Figura 13.** Modelo representativo da função de HJURP nas células de carcinoma hepatocelular (HCC).

**Figura 14.** Correlação entre os níveis de expressão de HJURP e MKI67.

*“Os desafios que você enfrenta hoje são um treino  
para encarar algo maior no futuro.”*

*Bruno Perini*

<b>Sumário</b>	
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>BIOLOGIA DO CÂNCER</b> .....	8
<i>Hallmarks</i> do Câncer .....	8
<b>O PAPEL DO ESTRESSE REPLICATIVO NO CÂNCER</b> .....	11
<b>ESTRESSE REPLICATIVO</b> .....	13
Aspectos gerais .....	13
Principais causas do estresse replicativo .....	14
Consequências do estresse replicativo .....	16
<b>HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein)</b> .....	22
Caracterização molecular da proteína HJURP .....	22
HJURP no câncer .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
Objetivo Geral .....	27
Objetivos específicos .....	27
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
Cultura de Células .....	28
Indução do estresse replicativo com Camptotecina (CPT) .....	28
Ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) .....	29
Ensaio de proliferação por coloração com cristal violeta .....	29
Análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	32
Avaliação do impacto da superexpressão de HJURP na capacidade proliferativa após tratamento com camptotecina (CPT) .....	32
Avaliação da capacidade de recuperação das células superexpressoras frente ao estresse replicativo causado por camptotecina (CPT) .....	37
Análise do impacto do estresse replicativo na dinâmica do ciclo celular das células superexpressoras de HJURP .....	38
<b>DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## RESUMO

O câncer é um conjunto de alterações celulares que favorecem a proliferação descontrolada e a aquisição de propriedades metastáticas. A ativação de oncogenes e/ou a perda de genes supressores tumorais leva a desbalanços nos mecanismos de controle do ciclo celular e/ou na inativação das vias apoptóticas, contribuindo para a instabilidade genômica presente em todos os tipos tumorais. Relatos na literatura têm sugerido que o estresse replicativo oriundo desse aumento proliferativo exacerbado é um fator importante na formação e progressão de muitos tipos de câncer. Dentro dessa perspectiva, é plausível pensar que as células tumorais tenham desenvolvido certas competências que as permitam lidar com o estresse replicativo para continuar se propagando. Resultados prévios de nosso laboratório sugerem que a proteína centromérica HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*) esteja envolvida nesse ganho de competência. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo a análise do papel dessa proteína frente ao estresse replicativo em linhagens de glioblastoma. Nossos resultados demonstraram que a superexpressão de HJURP confere um aumento na capacidade proliferativa celular da linhagem U87MG. Além disso, vimos que em baixas concentrações de camptotecina as células superexpressoras de HJURP possuíam um comportamento proliferativo muito semelhante à condição não tratada. Os ensaios de citotoxicidade revelaram uma maior capacidade de recuperação frente ao estresse replicativo exógeno nas situações em que HJURP estava superexpressa. Conjuntamente, esses dados sugerem que o incremento nos níveis celulares de HJURP parece conferir uma maior resistência ao estresse replicativo induzido por camptotecina nas células U87MG.

**Palavras-chave: estresse replicativo, HJURP, camptotecina**

## **ABSTRACT**

Cancer is characterized by a subset of features that supports uncontrolled cell proliferation and acquisition of metastatic properties. Oncogene activation and/or the deactivation of tumor suppressor genes lead to imbalances in cell cycle control progression and/or inactivation of apoptotic pathways, followed by genomic instability present in all types of tumors. According to the literature, replicative DNA stress arising from uncontrolled cell growth is the major driver in the development and progression of many cancers. In this perspective, it is believed that cancer cells have developed some skills in order to deal with high levels of endogenous replicative stress for their continued proliferation. Previous results from our group suggest that the centromeric protein HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) is involved in this mechanism. Thus, in this work, we aimed to analyze the role of this protein in the cellular response to the replicative stress in glioblastoma U87MG cell line. Our data showed that cells with high levels of HJURP had an increase in cell growth. Besides that, we also observed that at lower camptothecin concentrations the proliferation curve of overexpressed HJURP cells had a similar behavior as the control cells. The cytotoxicity results demonstrated that cells overexpressing HJURP had a better response to replicative induced stress when compared to the control cells. Together, this data suggests that high levels of HJURP might be responsible for resistance to camptothecin-induced replicative stress in U87MG cell line.

**Keywords:** glioblastoma, HJURP, camptothecin

## INTRODUÇÃO

### BIOLOGIA DO CÂNCER

#### *Hallmarks* do Câncer

Em meados dos anos 2000, Hanahan e Weinberg descreveram as primeiras alterações requeridas para que as células progridam para um estado neoplásico, as quais foram complementadas em outro trabalho posterior em 2011. Ao conjunto dessas características, as quais possibilitaram uma melhor compreensão da biologia tumoral, foi dado o nome de *Hallmarks* do Câncer (figura 1). Didaticamente, elas foram divididas em dez alterações essenciais que compreendiam: a capacidade ilimitada de multiplicação; a instabilidade genômica; a resistência à fatores antiproliferativos; a evasão à morte celular; a proliferação autônoma; as alterações metabólicas adaptativas; a evasão dos mecanismos de resposta do sistema imune; a indução de angiogênese e a metástase.

**Figura 1. *Hallmarks* do Câncer**



A imagem ilustra um conjunto de características que retratam a diversidade biológica encontrada nos mais diversos tipos de cânceres estudados até então. Elas compreendem as principais alterações adquiridas pelas células durante o processo de transformação maligna, as quais facilitaram a compreensão do crescimento e desenvolvimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011 modificada).

De maneira geral, a maioria das células do nosso organismo tem a capacidade de se dividir por um determinado número de vezes. Isso deve-se em parte ao encurtamento dos telômeros a cada mitose. Uma vez que as células humanas normais atingem seu limite de encurtamento máximo (limite de Hayflick), elas entram na fase G0 do ciclo, fenômeno conhecido como senescência celular (RUBEN; BIOLOGY, 2000).

Em contrapartida, as células tumorais são conhecidas por exceder esse limite e continuar se dividindo ilimitadamente. Em alguns tipos de câncer, isso se deve ao fato delas serem capazes de superexpressar uma enzima denominada telomerase, a qual é responsável pelo alongamento da região telomérica (BLACKBURN, 2005). Já em outras situações, a mutação ou perda de genes supressores tumorais (TP53, RB1, CDKN2A, APC, WT1, NF1), ou ainda, a superexpressão de oncogenes (PI3KCA, MYC, CCND1) provoca um descontrole no processo de replicação celular (CHIAL et al., 2018; MULLER, 2010).

O aumento na frequência de alterações genéticas a cada divisão celular resulta na instabilidade genômica, condição característica da maioria dos cânceres (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). É sabido que a manutenção da integridade genômica é monitorada por diversos mecanismos de sobrevivência celular, tais como os pontos de checagem de dano ao DNA; maquinaria de reparo ao DNA e pontos de checagem do processo de divisão celular. Dessa forma, desbalanços nesses mecanismos de regulação predispoem as células às transformações malignas (YIXIN, 2014).

Assim, condições elevadas de dano ao DNA e outros tipos de estresse celular, podem levar células normais a entrarem em processo de apoptose (morte celular). Já as células tumorais, por serem geralmente menos sensíveis a ocorrência de danos ao material genético, privação de fatores de crescimento e outros tipos de estresse, tendem a desenvolver mecanismos de evasão à apoptose (LETAI, 2016). Um exemplo disso é a superexpressão de BCL-2 (proteína anti-apoptótica) que favorece a sobrevivência celular (FRENZEL et al., 2012).

Além disso, as células tumorais precisam ajustar sua produção energética para manter seus níveis de proliferação elevados. Elas fazem isso utilizando

meios alternativos de obtenção de energia e vias metabólicas alternativas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Enquanto as células normais quebram a glicose em piruvato para fornecer energia (ATP), as tumorais convertem glicose em lactato independentemente da presença de oxigênio (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Para dar continuidade ao processo de transformação maligna, as células neoplásicas também passam a usufruir dos mecanismos de defesa do organismo. Em alguns casos, é observada a superexpressão do receptor transmembrana PDL-1 (*Programmed Death Ligand 1*) com o intuito de se proteger contra os efeitos citotóxicos dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e escapar da eliminação pelo sistema imune (ALSAAB et al., 2017).

A presença de células de defesa no microambiente tumoral recria as condições inflamatórias semelhantes aquelas encontradas nos tecidos normais (DVORAK, 1986), fornecendo fatores essenciais que permitem a sobrevivência, proliferação, angiogênese, transição epitélio-mesenquimal (EMT) e invasão dos tecidos adjacentes pelas células tumorais (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2011; KARNOUB et al., 2007; QIAN; POLLARD, 2010).

A difusão dessas células para tecidos saudáveis envolve a ativação do programa de transição epitélio-mesenquimal (EMT) de maneira estável ou transitória e em diferentes graus (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Fatores de transcrição como Snail, Slug, Twist e Zeb1/2 são expressos em diferentes níveis e combinações nos mais diversos tipos de câncer e são extremamente importantes no processo de invasão (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010; TAUBE et al., 2010). Além disso, é observada a perda de proteínas de adesão célula-célula (integrinas), expressão de enzimas que degradam a matriz celular, a ocorrência de motilidade e resistência à apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O câncer é, portanto, um reflexo de modificações fenotípicas derivadas de mutações e alterações epigenéticas que conferem a uma massa de células habilidades de disseminação através de ganhos de competência em proliferação, autorenovação, migração e invasão.

## O PAPEL DO ESTRESSE REPLICATIVO NO CÂNCER

Apesar das diversidades encontradas entre os tipos de câncer, estudos de análise genômica identificaram certas alterações mais frequentes à maioria das neoplasias humanas (BIGNELL et al., 2010; LUDMIL B. ALEXANDROV et al., 2013). Dentre os todos os *hallmarks* do câncer, acredita-se que a instabilidade genômica seja a principal via do desenvolvimento tumoral. Tal suposição se deve ao fato da instabilidade ser capaz de facilitar a aquisição das demais características e, ainda por cima, ser um evento observado já no início de lesões pré-cancerosas (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

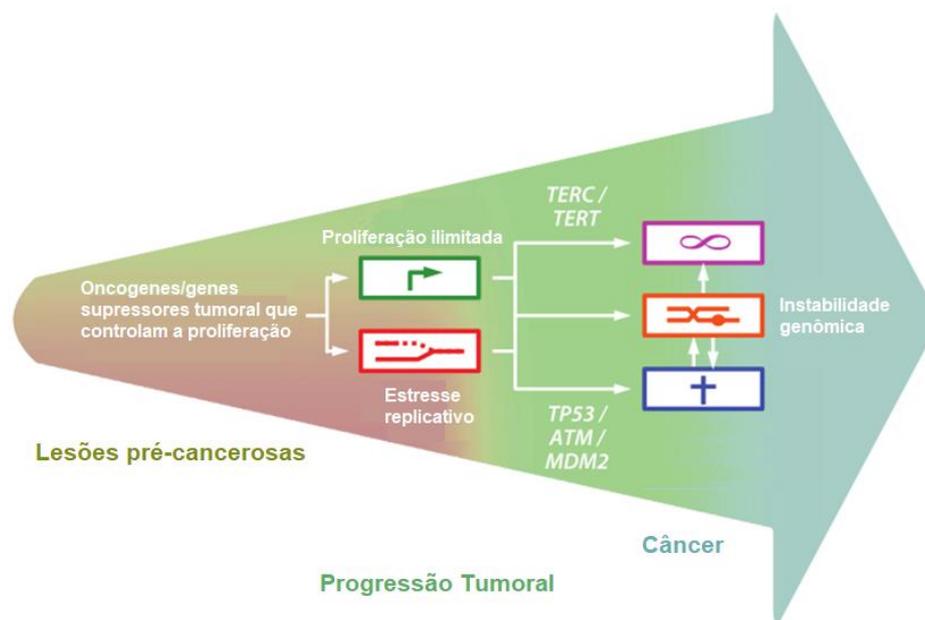
Anteriormente a popularização da análise molecular, pensava-se que a instabilidade genômica era resultado de alterações em genes de reparo do DNA, oriundos da ação de agentes genotóxicos tais como metabólitos intracelulares, irradiação UV e irradiação ionizante (GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). No entanto, a descoberta de que esse tipo de modificação era incomum, especialmente em lesões mais iniciais (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010), levantou novos questionamentos sobre a sua origem.

Nesse sentido, trabalhos recentes têm mostrado uma relação entre a instabilidade genômica e a mutação em genes envolvidos com o potencial replicativo celular ilimitado e com a capacidade de evasão à apoptose (MACHERET; HALAZONETIS, 2015; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). Em carcinomas de cólon esse panorama é bem evidente, onde as etapas de progressão tumoral estão atreladas principalmente com a inativação do gene APC, regulador negativo da via *WNT* de sinalização; seguidas de mutações em outros genes controladores do crescimento celular (KRAS, NRAS e AKT1) e inativação de genes supressores de tumor como o TP53 (CLEVERS; NUSSE, 2012; FEARON; VOGELSTEIN, 1990; POWELL SM, ZILZ N, BEAZER-BARCLAY Y, BRYAN TM, HAMILTON SR, THIBODEAU SN, VOGELSTEIN B, 1992).

Descompassos nos mecanismos de controle proliferativo implicam direta ou indiretamente na ocorrência de danos ao DNA e, conseqüentemente, na

ativação das vias de resposta a esses danos (MACHERET; HALAZONETIS, 2015). Diversos modelos experimentais demonstram que a ocorrência de lesões induzidas pela ativação de oncogenes é o fator primordial da tumorigênese (DENKO; GIACCIAT; STRINGER, 1994; GORGOULIS et al., 2005; ISHOP, 1999). De acordo com essa hipótese (figura 2), a proliferação exacerbada é capaz de induzir o estresse replicativo (MICCO et al., 2006; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010), resultando em danos ao material genético e ativação da via ATM/TP53/MDM2, parada do ciclo celular, senescência ou apoptose. No entanto, a persistência da instabilidade genômica pode desestabilizar os checkpoints que servem de barreira à tumorigênese, conferindo as células vantagens proliferativas e, conseqüentemente, contribuindo para a progressão tumoral (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

**Figura 2. Desenvolvimento tumoral via indução de estresse replicativo.**



O processo de progressão tumoral baseada na indução da ativação de oncogenes/ inativação de genes supressores de tumor acredita que mutações em genes que regulam a proliferação são responsáveis pela aquisição de dois hallmarks: a proliferação ilimitada e o estresse replicativo. O aumento na taxa de proliferação celular leva ao encurtamento dos telômeros e na manutenção do estresse replicativo. Esse por sua vez, é responsável pela ocorrência da instabilidade genômica e na habilidade das células escaparem dos mecanismos de senescência e morte celular (Macheret e Halazonetis, 2015 modificada).

## **ESTRESSE REPLICATIVO**

### **Aspectos gerais**

O processo de duplicação do DNA conta com o auxílio de inúmeros complexos proteicos, fatores de regulação e vias de sinalização que garantem a transmissão completa das informações genéticas às próximas gerações. Erros nesse processo podem ocasionar mutações ou bloqueio da replicação que podem resultar em quebras, rearranjos e falhas na separação dos cromossomos (GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015).

Diversos fatores podem atrapalhar o progresso de replicação do material genético e ocasionar o que chamamos de estresse replicativo, isto é, um fenômeno caracterizado por um descompasso no processo de duplicação do DNA que leva a diminuição ou a parada das forquilhas de replicação (BURHANS; WEINBERGER, 2007; MUÑOZ; MÉNDEZ, 2017; TAYLOR; LINDSAY, 2016; ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

Durante a fase S do ciclo celular algumas regiões com sequências de DNA pré-definidas, conhecidas como origens de replicação, são ativadas e dão o início ao processo de duplicação do material genético (ERRICO; COSTANZO, 2010). Nesse momento, um conjunto de proteínas organiza-se para formar o que chamamos de forquilha de replicação, uma estrutura proteica responsável pelo processo de síntese do DNA (LANGSTON; INDIANI; O'DONNELL, 2009).

Essa estrutura é encarregada pela coordenação da abertura da molécula de DNA e da síntese propriamente dita. A abertura da fita é realizada pelas helicases, um complexo enzimático capaz de modificar a estrutura da alfa hélice e promover a separação entre as duas fitas. Já a síntese, conta com a participação de um outro conjunto de enzimas responsáveis pela elongação da fita de DNA, denominadas DNA polimerases (SABATINOS, 2010).

Diversos fatores podem contribuir com o processamento incorreto da forquilha e a resposta da célula em relação a esse fenômeno depende da quantidade de forquilhas paralisadas e da magnitude dessa paralisação (LABIB; HODGSON, 2007; LUCCA et al., 2004; MEISTER et al., 2005; SABATINOS, 2010). Didaticamente eles podem ser agrupados em três classes que

compreendem estruturas inibidoras da forquilha, desbalanços nos mecanismos reguladores das origens de disparo e estado de compactação da cromatina (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

### **Principais causas do estresse replicativo**

#### **Inibidores da forquilha de replicação**

Incisões e aberturas em regiões do DNA decorrentes do reparo, ou ainda, do próprio processo de manipulação do material genético (diminuição do estresse topológico) podem paralisar a forquilha e gerar quebras de dupla fita (ZEMAN; CIMPRICH, 2015). A incorporação de ribonucleotídeos no lugar dos desoxirribonucleotídeos durante a síntese de DNA (DALGAARD, 2012), assim como a formação de complexos proteína-DNA (TAYLOR; LINDSAY, 2016), também dificultam a passagem da forquilha de replicação e, portanto, podem causar o estresse replicativo.

A presença de estruturas secundárias como *hairpins*, G-quadruplexes, tripletos, podem provocar o desacoplamento da maquinaria de replicação, diminuição da velocidade de síntese do DNA e aumento na formação de quebras de dupla fita (ZEMAN; CIMPRICH, 2015). Lesões no DNA que não foram reparadas adequadamente (DALGAARD, 2012) também se enquadram nesse conjunto de fatores físicos que dificultam a progressão da forquilha de replicação e que podem ser ignorados pelos mecanismos de tolerância ao dano do DNA (DDT).

Apesar da existência de mecanismos de regulação das atividades de replicação e transcrição, o encontro entre as maquinarias é um evento inevitável e que pode atrapalhar o desempenho dos dois processos, já que ambos utilizam a molécula de DNA como molde. A descoberta de regiões do genoma susceptíveis à quebra, denominadas sítios frágeis de replicação precoce, resgatou a importância do fenômeno citado anteriormente como fonte de estresse replicativo (ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

Embora o motivo dessas regiões serem mais propensas a quebras de dupla-fita (DSBs) não esteja ainda esclarecido, acreditava-se que o surgimento

dessas lesões poderia estar associado com o colapso entre a maquinaria de replicação e transcrição. No entanto, estudos mais recentes tem mostrado que o estresse replicativo é um evento anterior a esse encontro e que se deve ao estresse topológico gerado pela formação de R-loops (estrutura híbrida de RNA-DNA associada a um molde de simples fita de DNA) que interfere no processamento da forquilha de replicação (AGUILERA; GARCÍA-MUSE, 2012).

Além disso, a disponibilidade de recursos é um fator que também contribui para a diminuição/ parada da atividade da forquilha. Por exemplo, a inibição da atividade das enzimas polimerases  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$  pela ação da afidicolina (APH) ou, ainda, a depleção na quantidade de dNTPs disponíveis para a síntese pela hidroxioureia (HU) é capaz de bloquear a duplicação do material genético e causar o estresse replicativo (TAYLOR; LINDSAY, 2016; VESELA et al., 2017).

### **Desbalanços nos mecanismos reguladores das origens de disparo**

O controle refinado dos mecanismos de regulação de disparo das origens tem velocidade controlada e garante que um número suficiente de origens seja ativado para completar a duplicação do material genético como um todo; e que a ativação de cada origem ocorra apenas uma vez durante um ciclo celular, com o intuito de evitar a ocorrência de replicação de trechos do genoma que já foram copiados (HILLS; DIFFLEY, 2014). Nesse sentido, a ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores de tumor tem grande impacto no desenvolvimento tumoral.

Estudos recentes mostraram que diferentes oncogenes podem induzir o estresse replicativo através de diversos mecanismos e que um único oncogene pode atuar por mais de uma via (TAYLOR; LINDSAY, 2016). O aumento do estresse replicativo em função da proliferação exacerbada decorre da sobreposição dos mecanismos de controle da fase S (ALMASAN et al., 1995; LIU et al., 1995). Nem sempre esse aumento é acompanhado pela capacidade metabólica celular e, nesses casos, o estresse replicativo é consequência da falta de disponibilidade de recursos (enzimas, nucleotídeos) (TAYLOR; LINDSAY, 2016; ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

Além disso, o aumento na proliferação pode aumentar as chances de colisão entre as maquinarias de transcrição e replicação, licenciamento e

ativação de novas origens de replicação e, conseqüentemente, provocar a instabilidade genômica (ZIMMERMAN et al., 2013).

### **Compactação da cromatina**

A eficiência de processos como duplicação, transcrição e mecanismos de resposta ao dano do DNA é dependente da integridade estrutural da cromatina. O grau de compactação dela influencia no acesso das maquinarias ao DNA, dessa forma quaisquer fatores que interfiram na estrutura da cromatina podem considerados fontes de estresse replicativo. Por exemplo, a perda de marcações epigenéticas como a trimetilação da histona H3K9 ou da histona H4K20 tem a capacidade de induzir a replicação de maneiras distintas. A primeira ao promover o afrouxamento da cromatina, enquanto que a segunda, ao aumentar a quantidade de origens que são licenciadas (BECK et al., 2012; BLACK et al., 2010, 2013).

### **Consequências do estresse replicativo**

Embora o estresse replicativo possa ser causado por diversas fontes, ele normalmente resulta na formação de fitas simples de DNA (ssDNA). Essas estruturas geralmente são formadas durante a contínua abertura do DNA parental quando já houve a interrupção da atividade das polimerases (BYUN et al., 2005; ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

A parada da forquilha de replicação é capaz de desencadear uma cascata de sinalização responsável pelo direcionamento de outras proteínas de resposta ao estresse à essa região. Grande parte dessas proteínas são marcadores do estresse replicativo e da ativação da via de ATR. Dentre elas, a fosforilação de RPA (Ser33) e a fosforilação de Chk1 (Ser345) (MARÉCHAL; ZOU, 2017; NAM; CORTEZ, 2013). Embora a fosforilação da variante de histona H2AX seja amplamente utilizada na sinalização de ativação dessas vias, ela é inespecífica em comparação aos marcadores citados anteriormente. Isso se deve ao fato dela ser gerada também por outras quinases, as quais detectam diferentes tipos de dano ao DNA ao longo do ciclo celular (ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

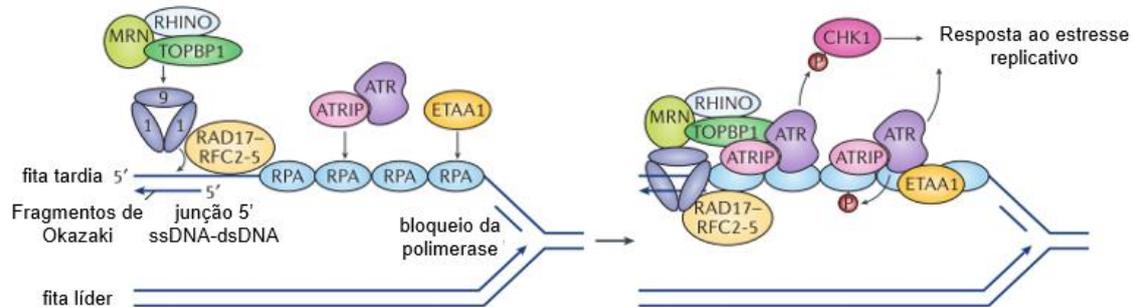
Nesse contexto, a presença de fita simples de DNA estimula o recrutamento de diversas proteínas, dentre elas a proteína de replicação A (figura 3). RPA reconhece a região de ssDNA e se liga a ela para criar uma plataforma necessária para ativação de ATR, quinase central frente ao estresse replicativo (ZEMAN; CIMPRICH, 2015).

Ao se ligar a porção 5' do DNA de fita simples que é formada no fragmento de Okazaki, RPA promove o recrutamento do complexo ATR-ATRIP. Esse, por sua vez, recruta Rad17-RFC, o qual é responsável pelo posicionamento do complexo 9-1-1 (RAD9, RAD1 e HUS1) na junção do trecho de ssDNA com o DNA de fita-dupla. Juntamente com outros dois complexos (RHINO e MRN), 9-1-1 é capaz de atrair TOPBP1, um ativador canônico de ATR. No local da parada, TOPBP1 interage com ATR-ATRIP para estimular a ativação de ATR e a fosforilação de outras proteínas *downstream* da via, incluindo a quinase CDK1.

Embora esse mecanismo indireto de ativação seja o mais conhecido, dados na literatura trazem outro processo de estimulação direta via ETAA1 (HAAHR et al., 2016). Evidências sugerem que ambas proteínas trabalhem em conjunto na ativação da resposta frente ao estresse replicativo (BASS et al., 2016; HAAHR et al., 2016), seja atuando sobre diferentes substratos, seja respondendo a estímulos variados desse estresse ou amplificando o resultado desse processo (SALDIVAR; CORTEZ; CIMPRICH, 2017).

A resposta do estresse replicativo promovida pela ativação de ATR, resulta na degradação via ubiquitinação da ciclina E (cycE). Altos níveis de cycE proporcionam a retenção de Cdc6 no complexo pré-replicacional; inibem os disparos das forquilhas de replicação e ativam Chk1 (figura 4) (LIM; KALDIS, 2013). Dessa forma, ATR e seus efetores são capazes de bloquear os disparos de origem, induzir a parada do ciclo celular, bem como estabilizar e reiniciar as forquilhas de replicação paralisadas.

**Figura 3. Componentes da ativação da via de ATR.**



Situações de estresse replicativo podem levar a mobilização da maquinaria de resposta ao dano do DNA (DDR). A ativação de ATR, por sua vez, pode ser estimulada diretamente através de ETAA1 ou indiretamente através de TOPBP1. Ela conta com o auxílio de inúmeras proteínas para bloquear disparos de origem indevidos, impedir que as células prossigam com o ciclo celular e para reestabelecer o processamento das forquilhas de replicação que foram danificadas (Saldivar e Cimprich, 2017 modificada).

A interrupção do processamento da forquilha em regiões do DNA que foram lesionadas e não sofreram reparo pode ser revertida através dos mecanismos de tolerância ao dano do DNA. Em situações como essa, polimerases especializadas podem atuar replicando o DNA através da lesão por síntese translesão, ou ainda, a cromátide irmã não danificada ou a fita nascente de DNA da fita reversa podem ser usadas como molde (CHANG; CIMPRICH, 2009). Esses mecanismos juntamente com a ativação de origens dormentes vizinhas as lesões tendem a evitar o prolongamento da paralização das forquilhas (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

No entanto, a persistência do estresse replicativo ou a falha na via de sinalização de ATR pode provocar o colapso da forquilha de replicação. Esse fenômeno está associado com o surgimento de quebras de dupla fita do DNA e, portanto, com a ativação dos mecanismos de resposta ao dano ao DNA (DDR).

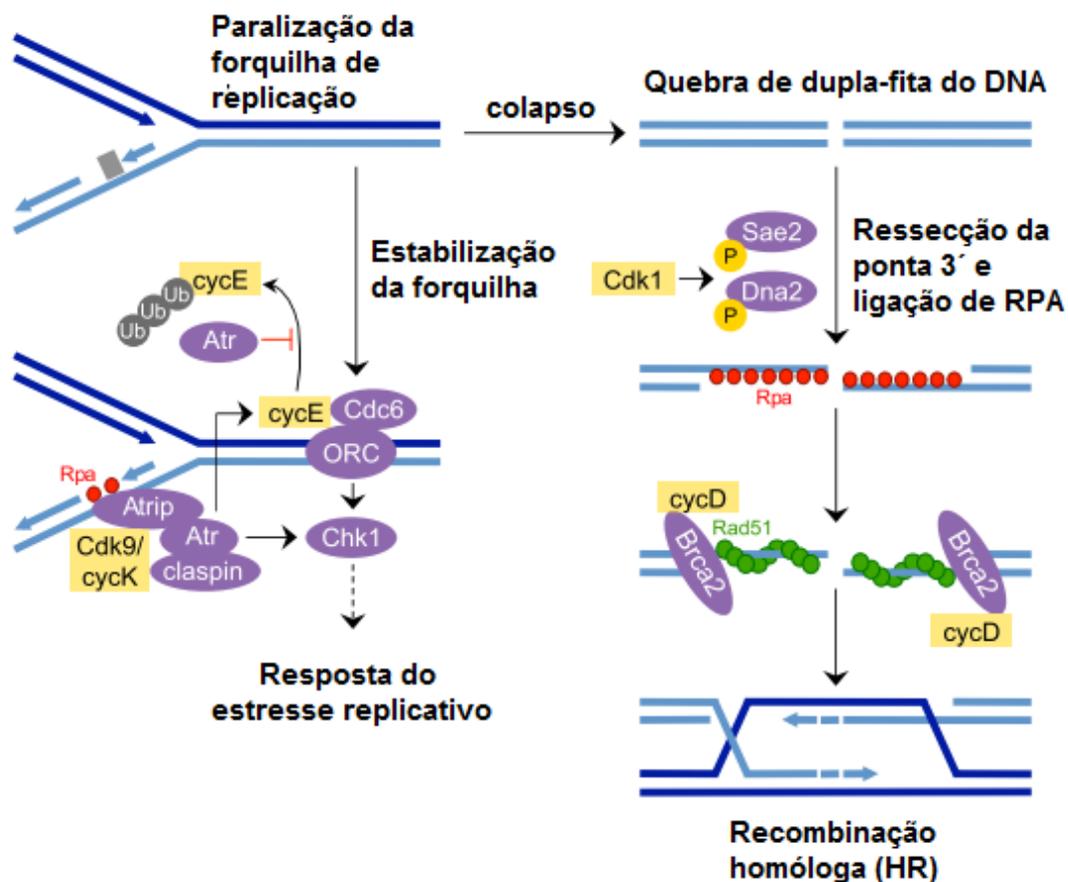
Na presença de DSBs, o complexo MRN (Mre11- Rad50-Nbs1) liga-se à região lesionada e promove o recrutamento da quinase ATM. A chegada dessa proteína à DSB leva a sua auto fosforilação e, conseqüentemente, a ativação de outras proteínas de sinalização como a variante da histona H2AX e Chk2.

Em resposta a presença de DSB, H2AX é fosforilada em diversos pontos dos dois lados da lesão (IACOVONI et al., 2010). Após a ressecção da ponta 3' da fita do DNA, RPA se liga a regiões de simples fita (ssDNA) estabilizando-as. Em seguida, a ciclina D1 (cycD) interage com brca2 para facilitar o recrutamento de Rad51. Ao chegar no local da lesão e ligar-se ao DNA, Rad51 estimula a sinalização que dá início ao pareamento de DNA e a invasão da fita molde, resultando por fim no reparo por recombinação homóloga (HR) (LIM; KALDIS, 2013).

Apesar do reparo por recombinação homóloga ter um papel fundamental na estabilidade e proteção das forquilhas de replicação, ele está sujeito à erros (GUIROUILH-BARBAT et al., 2014). Em alguns casos, esse mecanismo de reparo pode introduzir sequências de recombinações homólogas não alélicas (NAHR) inadequadamente as regiões de junção da quebra (HASTINGS et al., 2009). Outro exemplo é a substituição de conjuntos de bases durante a parada da forquilha em trechos de ssDNA, decorrentes da atividade da enzima Citidina deaminase (ROBERTS et al., 2012).

Ao contrário de todas as outras DSBs, as quebras de dupla fita induzidas pelo estresse replicativo geram uma única extremidade livre disponível. Esse acontecimento recruta proteínas de uma via dependente de HR denominada via de replicação induzida por quebra (BIR) (HASTINGS et al., 2009). A ponta 3' que é gerada após a ressecção tem a capacidade de invadir a região homóloga molde e formar a forquilha de replicação, a qual é responsável pela extensão da fita líder e da tardia através de baixa processividade de polimerização. Então, a ponta 3' separa-se do molde para invadi-lo novamente e formar uma nova forquilha de replicação. Esse procedimento é realizado inúmeras vezes até que seja formada uma maquinaria de replicação com uma maior processividade para que possa dar continuidade ao processo de duplicação do DNA (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

Figura 4. Consequências do estresse replicativo.



O estresse replicativo gerado pela paralização das forquilhas de replicação pode desencadear a resposta do estresse replicativo ou, ainda, a formação de lesões de quebra de dupla-fita do DNA. Na primeira situação, ocorre a ativação de ATR na tentativa de bloquear os disparos de novas origens, induzir a parada do ciclo celular, bem como estabilizar e reiniciar as forquilhas de replicação paralisadas. Na segunda situação, o colapso da forquilha leva a formação de quebras de dupla-fita que irão desencadear na ativação de ATM e no reparo por recombinação homóloga. (Lim; Kaldis, 2013 modificada).

Dados na literatura apontam a participação de um outro mecanismo BIR independente de Rad51 denominado micro homologia mediada por quebra (MMBIR) na participação de DSBs originadas através do estresse replicativo. Em comparação com o que acontece em BIR, nessa via as porções de fita simples de DNA com apenas algumas bases contendo homologia conseguem promover a invasão da região a ser utilizada como molde. Isso faz de MMBIR um mecanismo menos preciso e com maior propensão a deleções, inversões, translocações, dependendo do local em que há essa alternância de *template*

(TAYLOR; LINDSAY, 2016). Apesar disso, MMBIR se faz necessária no resgate de forquilhas paralisadas em situações de estresse replicativo induzido pela ativação de oncogenes devido à sobrecarga da via de HR em elevados níveis de estresse (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

O mecanismo de junção de pontas não-homólogas (NHEJ) também tem sido apresentado como uma alternativa na resolução de DSBs induzidas por quebra de simples fita (ALLEN et al., 2011). Porém, ainda não se sabe ao certo se os fatores de NHEJ funcionam regulando o processo de resolução via HR ou tem um papel extra no reparo de DSBs induzidas pelo estresse replicativo. Nesse contexto, a via de junção de pontas não-homólogas atua como mais uma fonte de rearranjos cromossômicos e, portanto, um fator indutor da instabilidade genômica observada em todos os tipos de câncer.

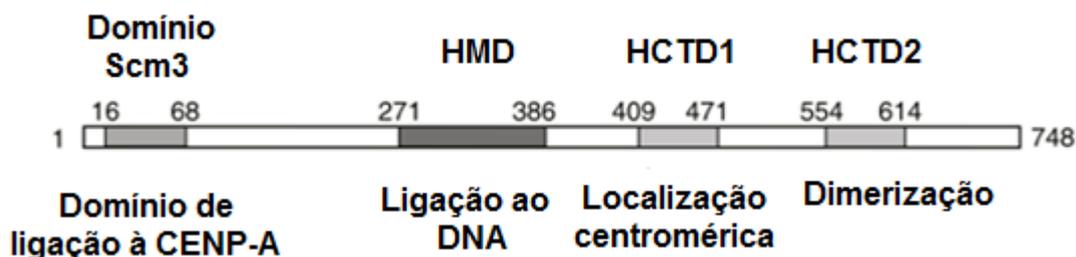
Além disso, o estresse replicativo tem potencial de perturbar a estabilidade genômica não só na fase S do ciclo celular mas também durante a mitose, impactando no processo de segregação dos cromossomos (TAYLOR; LINDSAY, 2016). Regiões do DNA que não foram duplicadas em sua totalidade ou ainda estruturas derivadas de intermediários dos processos de reparo podem se acumular no final de G2/M e, então, serem processadas por um conjunto de nucleases específicas (ERCC1 e MUS81–EME1) (FRAGKOS; NAIM, 2017). Caso não haja a resolução dessas estruturas antes da transição para a anáfase, é observada a formação de pontes entre as cromátides irmãs parcialmente replicadas, dificultando o processo de segregação. Essa tensão provocada leva a quebra e a distribuição desigual desse cromossomo entre as células (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

Por fim, relatos na literatura tem mostrado que o estresse replicativo também pode influenciar na estrutura da cromatina e, conseqüentemente, na expressão gênica. Por exemplo, a interrupção da processividade da forquilha pode resultar em um desbalanço entre a quantidade de histonas que possuem características parentais e a superexpressão de novas histonas monometiladas (H3K9) na região de parada (KHURANA; OBERDOERFFER, 2015). Essa alteração estrutural promove a formação de heterocromatina e tem impacto na expressão gênica.

## HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) Caracterização molecular da proteína HJURP

HJURP é uma proteína humana formada por 748 aminoácidos codificada pelo gene HJURP, localizado na região 2q37 do cromossomo humano (NCBI, 2016). Ela consiste em quatro domínios distintos representados na figura 3, cujas funções estão atreladas a sua atividade como chaperona de CENP-A, uma variante da histona H3 marcadora epigenética da região centromérica em eucariotos.

**Figura 5. Estrutura representativa da proteína HJURP com seus domínios e funções.**



Müller, 2014 modificada.

A porção N-terminal de HJURP é uma região bastante conservada entre as diferentes espécies (SANCHEZ-PULIDO et al., 2009; SHUAIB et al., 2010). Nela está localizado o domínio Scm3 (16-68), sítio de interação com CENP-A, que mostrou ser essencial na formação de nucleossomos *in vitro* e *in vivo* (BARNHART et al., 2011). Em contrapartida, a porção C-terminal dispõe de variações entre as espécies. Em vertebrados, essa proteína apresenta um tamanho maior em comparação com seu ortólogo em leveduras, além de possuir outros três domínios adicionais, cada um com uma função específica (SANCHEZ-PULIDO et al., 2009).

Um estudo recente realizado por Zasadzinska e colaboradores (2013) mostrou a relação entre o domínio HCTD1 (409-407) e o direcionamento de HJURP para a região centromérica. Eles também observaram que a dimerização da proteína através do domínio HCTD2 (554-614) era essencial para a formação do complexo pré-nucleossomal e que esse fenômeno era imprescindível para a deposição de CENP-A no centrômero. Em 2014, Müller e colaboradores

encontraram dentro do domínio HMD (271-386) um único ponto de interação de HJURP com o DNA, que apesar de indispensável para seu recrutamento, era extremamente importante para o carregamento de CENP-A na região centromérica.

Novos avanços na caracterização dessa proteína têm evidenciado sua participação no remodelamento da cromatina. Experimentos envolvendo a criação de centrômeros artificiais mostraram que a associação entre HJURP e M18BP1/KNL2 induzia a expansão dos cinetócoros ao longo dos cromossomos (PERPELESCU et al., 2015). Outro estudo mais recente demonstrou que HJURP era responsável pelo recrutamento do complexo condensina II, fator mediador da descompactação da cromatina e importante na deposição de nova CENP-A nos centrômeros (BARNHART-DAILEY et al., 2017).

Embora muitos estudos tenham sido publicados nos últimos anos, esses trabalhos concentram-se na relevância de HJURP no processo de divisão celular, na medida que ela age como chaperona específica de CENP-A (Müller, S. et al, 2014; e Perpelescu, M., et al., 2015). Entretanto, um trabalho mais antigo realizado por Kato e colaboradores (2007) sugere a participação dela no reparo de lesões ao DNA. A partir de ensaios de imunoprecipitação, eles observaram a interação entre HJURP e outras proteínas (hMSH5 e NBS1) envolvidas no reparo por recombinação homóloga e viram que a exposição de células de câncer cervical (HeLa) a agentes lesivos era capaz de induzir a expressão de HJURP, levantando assim, a hipótese do envolvimento dela nos mecanismos de reparo do DNA após tratamento com agentes genotóxicos.

### **HJURP no câncer**

Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que HJURP está superexpressa em amostras de astrocitomas e que seus níveis de expressão estão altamente correlacionados com a baixa sobrevida dos pacientes (VALENTE et al., 2009, 2013). Relatos na literatura abordam também a ocorrência desse fenômeno em outros tipos tumorais, tais como pulmão (KATO et al., 2007) mama (HU et al., 2010), e gliomas (DE TAYRAC et al., 2013).

Em 2010, Hu e colaboradores mostraram que a superexpressão de HJURP estava presente em mais de 50% das linhagens de câncer de mama e que quanto maior os níveis dessa proteína, menor era o tempo de duplicação dessas células, isto é, maior era a sua taxa proliferativa. Além disso, eles observaram que os pacientes com altos níveis de superexpressão de HJURP tinham maior recidiva e menor expectativa de vida.

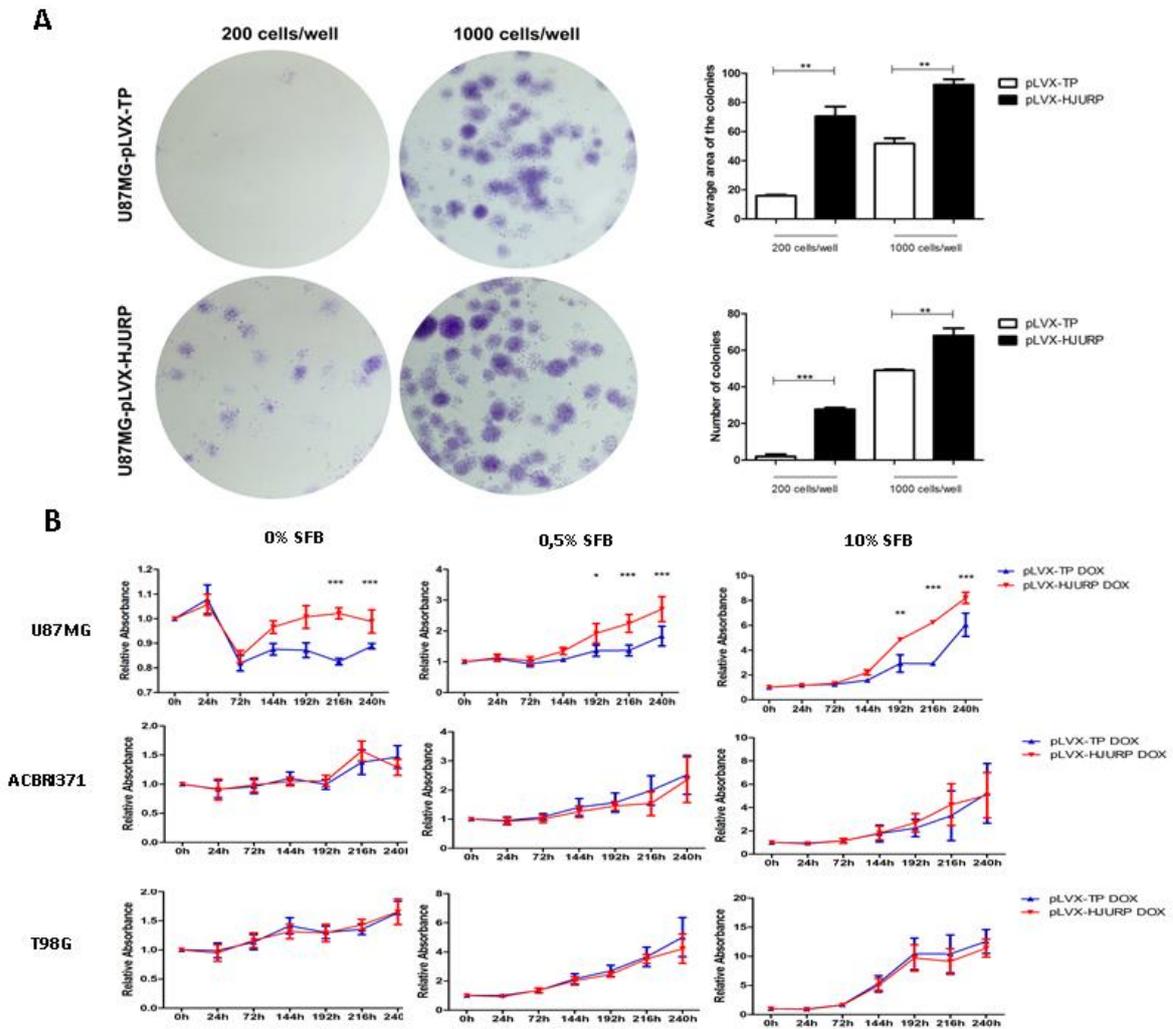
Dados de nosso grupo demonstraram que a expressão de HJURP é essencial para a sobrevivência de diferentes linhagens de glioblastoma multiforme (GBM) (U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG). A indução da expressão dessa proteína na linhagem U87MG, p53 selvagem e níveis de HJURP moderados, confere um ganho na habilidade em formar clones (figura 6A) e provoca um aumento na taxa de proliferação celular mesmo em condições de baixa concentração de soro fetal bovino (figura 6B). Por sua vez, o silenciamento de HJURP nas linhagens T98G e U251MG induziu uma parada abrupta do ciclo celular, enquanto que as linhagens U87MG, U138MG e U343MG entraram em estado senescente. Em contrapartida, astrócitos não tumorais e fibroblastos não mostraram ter sua viabilidade significativamente afetada pós silenciamento.

Outro estudo envolvendo o silenciamento de HJURP em fibroblastos humanos não tumorais da derme (HDF) e células endoteliais da veia humana não tumoral (HUVEC) mostrou que os baixos níveis de HJURP eram capaz de induzir senescência prematura nessas células de maneira dependente de p53 (HEO; CHO; KIM, 2013). Um trabalho mais recente, desenvolvido por Filipescu e colaboradores (2017), identificou uma relação causal entre o *status* de p53 (supressor tumoral) e variações dos níveis de RNAm de HJURP e CENP-A em células com diferentes *backgrounds* genéticos.

Nesse estudo, eles observaram que a perda ou o ganho de função através de mutações (R175H, R248Q, R248W, R249S e R273H) no gene TP53 promovia um aumento nos níveis de expressão dessas proteínas; e que alterações na sequência CDE presente na região promotora de HJURP impactavam na sua regulação por p53, levantando a hipótese de uma possível regulação transcricional via p21 e o complexo E2F4-DREAM. Dessa forma, tanto o ganho

de função quanto a perda do gene TP53 estariam promovendo o aumento na expressão dessas proteínas.

**Figura 6. A superexpressão de HJURP induz aumento das taxas de proliferação e capacidade clonogênica para linhagens de GBM.**

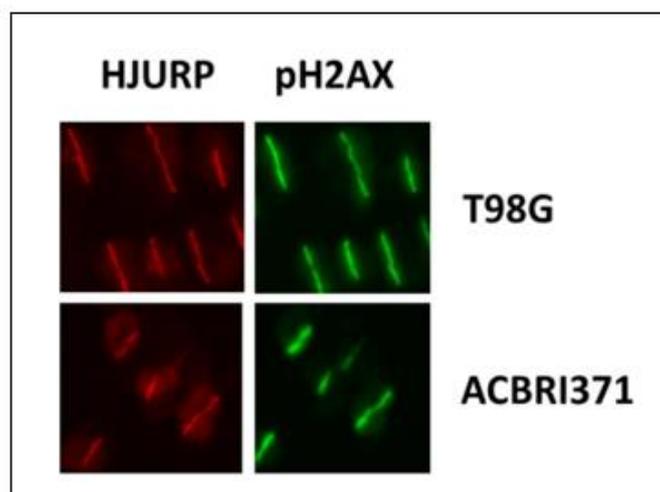


(A) As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com uma densidade de 200 células/poço. Após treze dias, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (pH = 7,5). Em seguida, adicionou-se 2 mL de violeta de cristal a 0,5% e o excesso de corante foi lavado com água. As colônias foram fotografadas e analisadas com o software ImageJ. (B) 500 células das linhagens ACBR1371, U87MG e T98G foram plaqueadas por poço em placa de 96 poços, tratadas com doxiciclina para indução da expressão de HJURP e após 24 horas o meio foi retirado e adicionado novo meio com 0; 0,5 ou 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 10 dias em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para análise de proliferação por violeta cristal. Fonte: Serafim, 2018.

Além disso, resultados de nosso laboratório mostraram que a diminuição dos níveis de HJURP era capaz de impactar na atividade de reparo do DNA pelas vias de recombinação homóloga (HR) e junção de pontas não homólogas (NHEJ). A geração de quebras de dupla fita induzidas por *microlaser* nas linhagens ACBRI371 (astrócitos não tumorais) e T98G (GBM) evidenciaram o recrutamento de HJURP para as regiões de lesão em estágios iniciais do dano, independentemente da ativação de ATM e confirmaram sua participação no reparo das lesões após indução com radiação ionizante (figura 7).

Tendo em vista a importância da proteína HJURP na manutenção da estabilidade genômica, é plausível pensar que os altos níveis de HJURP estejam contribuindo de certa forma para o desenvolvimento e progressão das células tumorais. Seja melhorando a eficiência da propagação da região centromérica (Filipescu, et al.,2017), seja participando ativamente no reparo das agressões à que essas estão sujeitas. Nesse sentido, acredita-se que essa proteína faça parte de uma maquinaria de resposta ao estresse replicativo que impeça que as células entrem em colapso e deem continuidade a progressão tumoral.

**Figura 7. Indução de quebras de dupla fita com microlaser nas linhagens ACBRI371 e T98G.**



As células foram fixadas 10 minutos após a aplicação do laser e as marcações com os anticorpos anti-HJURP e anti-pH2AX foram analisadas com o auxílio de um microscópio confocal. Fonte: Serafim et.al. 2017 em preparação.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O objetivo consiste em verificar o impacto da superexpressão de HJURP na e manutenção do estresse replicativo em células de GBM.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar o impacto da superexpressão de HJURP na capacidade proliferativa em situação de estresse replicativo.
2. Verificar a capacidade de sobrevivência (viabilidade celular) das células superexpressoras frente ao estresse replicativo causado por camptotecina.
3. Analisar o impacto do estresse replicativo na dinâmica do ciclo celular das células superexpressoras de HJURP.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cultura de Células**

A linhagem de GBM U87MG (HTB-14TM) foi obtida da coleção da ATCC. As células U87MG superexpressoras da proteína HJURP foram geradas durante o doutorado do aluno Rodolfo Bortolozo Serafim. Elas foram transformadas com uma construção que possibilita a superexpressão de HJURP de modo regulado, através de um promotor induzível com doxíciclina (pLVX-Tight-Puro). As células controle (transformadas com o vetor vazio) foram denominadas TP e aquelas que carregam a construção para superexpressão da HJURP foram denominadas HJ e o sistema de superexpressão da proteína HJURP foi validado por *western blot*.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium- High Glucose (DMEM, Life Technologies) suplementado com 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen) e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Para a indução da superexpressão de HJURP, foi adicionado 1µL de Doxyciclina (D9891, Sigma) (1mg/mL) para cada 10 mL de DMEN High Glucose.

### **Indução do estresse replicativo com Camptotecina (CPT)**

Para a indução do estresse replicativo, as células foram tratadas com um derivado do alcalóide isolado da planta *Camptotheca acuminata* (LI et al., 2017). A camptotecina (CDS008734, Sigma) age especialmente na fase S do ciclo celular inibindo a enzima topoisomerase I (Top1). Ela promove a paralização das forquilhas de replicação através da estabilização do complexo transiente Top1-DNA. O choque entre o complexo CPT-Top1-DNA com a maquinaria de replicação resulta em estresse na cadeia de DNA intacta, podendo ocasionar presença de fita simples (ssDNA), quebras de dupla fita de DNA (DSBs) e morte celular (VESELA et al., 2017).

### **Ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico)**

O teste colorimétrico de MTT foi utilizado nesse trabalho com o intuito de verificar a capacidade das linhagens superexpressoras de se recuperarem do estresse replicativo induzido pela camptotecina. A presença de desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células viáveis são responsáveis pela clivagem do anel tetrazólico do sal de MTT e, conseqüentemente, pela alteração da coloração amarela para roxa. Portanto, a produção dos cristais de formazan (coloração roxa) reflete o funcionamento da cadeia respiratória, isto é, a quantidade de células viáveis após o tratamento (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Foi preparada uma suspensão de  $4,5 \times 10^4$  células/mL em meio de cultura DMEM *high glucose* contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> *overnight* para adesão. No dia seguinte, foi adicionado o tratamento com camptotecina e as placas foram incubadas por 6, 12 e 24 horas. Decorrido o período de exposição, o meio contendo CPT foi substituído por meio de cultivo (DMEM *high glucose* + 10% SFB) e as células foram deixadas na incubadora por mais 48 horas, para recuperação frente ao estresse induzido. Após esse tempo, o meio de cultivo foi substituído por meio sem soro contendo 0,5mg/ml de MTT e a placa foi incubada novamente por 3 horas. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 100µL de isopropanol acidificado (HCL 4%). A leitura da placa foi realizada no comprimento de onda de 570nm de acordo com o protocolo estabelecido por (DE FREITAS et al., 2017).

### **Ensaio de proliferação por coloração com cristal violeta**

O cristal violeta é um corante capaz de atravessar as membranas celulares e nucleares e ligar-se inespecificamente ao DNA, RNA e proteínas (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016). A viabilidade celular é determinada pela quantificação das células coradas que permanecem aderidas na placa mesmo após o tratamento. O ensaio do cristal violeta foi utilizado nesse

trabalho com o objetivo de analisar o comportamento proliferativo das linhagens superexpressoras de HJURP frente a indução do estresse replicativo.

As linhagens superexpressoras de HJURP foram plaqueadas ( $5 \times 10^3$  células/mL – 100 µL por poço) em placas de 96 poços. No dia seguinte, as células foram expostas a diferentes concentrações de camptotecina por tempos variados de tratamento e as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> até o momento de análise. A primeira leitura foi realizada após 3 horas do plaqueamento (tempo 0), enquanto que as demais placas foram lidas em intervalos de dois dias após o tratamento. Decorrido o tempo de incubação pré-estabelecido, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com uma solução de etanol 70% (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. Então, após a remoção da solução de fixação, foi adicionado 100 µL de solução de violeta cristal 0,05% (Sigma) e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Ao término da incubação, a solução corante foi removida e o excesso foi retirado com água. Por fim, foi adicionado uma solução de ácido acético 10% (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm (Protocolo adaptado de Feoktistova e colaboradores, 2016).

### **Análise de ciclo celular por citometria de fluxo**

Os efeitos do tratamento com camptotecina na distribuição das células superexpressoras ao longo do ciclo celular foram analisados através da citometria de fluxo com iodeto de propídeo. Para a análise de conteúdo de DNA foram plaqueadas cerca de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 12 poços. No dia seguinte, as células foram expostas a diferentes concentrações de camptotecina por intervalos de tempos distintos e seu conteúdo de DNA foi analisado conforme a metodologia descrita a seguir. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos à 400g. O *pellet* foi lavado com uma solução de PBS-EDTA 5mM e centrifugado novamente. Depois, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µL dessa solução em cada tubo. Em seguida, foram gotejados 700 µL de etanol absoluto gelado sob leve agitação e então incubadas *overnight* a -20° C. Decorrido o período de incubação, as amostras

foram centrifugadas a 400g por 5 minutos e o pellet foi ressuspenso em 450µL de PBS-EDTA. Após esse procedimento, foram adicionados 50µL de RNase A (10ng/mL) e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Por fim, foram adicionados 200µL de solução de iodeto de propídeo (PI) em PBS 1x (50µg/mL) e as amostras foram quantificadas por citometria de fluxo (BD, FACSCanto).

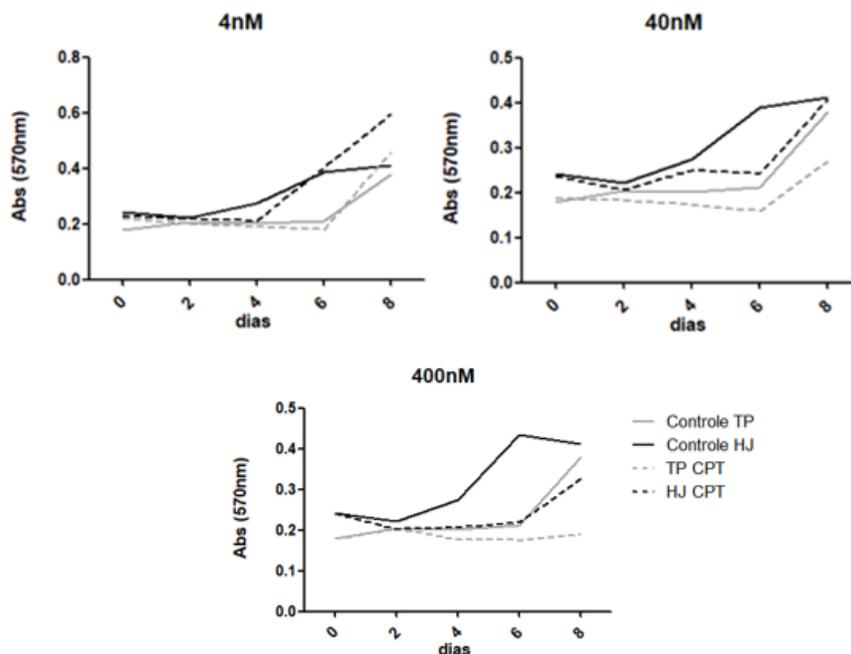
## RESULTADOS

### **Avaliação do impacto da superexpressão de HJURP na capacidade proliferativa após tratamento com camptotecina (CPT)**

É sabido que os altos níveis de HJURP conferem as células de GBM um aumento na taxa proliferativa celular. Tendo em vista essa vantagem, buscamos investigar se a superexpressão dessa proteína também era capaz de proporcionar resistência ao estresse replicativo induzido exogenamente. Inicialmente, foram avaliadas várias concentrações de CPT nas linhagens U87MG selvagem e superexpressora de HJURP, com o intuito de identificarmos uma concentração efetiva na promoção do estresse mas permissiva à atividade proliferativa. Nesse ensaio, as células foram expostas a três diluições (1:10) de camptotecina por 24 horas. Para a escolha da faixa de tratamento a ser utilizada analisamos o comportamento proliferativo das células ao longo de 10 dias após o tratamento (figura 8). De acordo com os resultados, observamos que em concentrações muito baixas (4nM) as curvas de proliferação das condições tratadas se aproximam do perfil proliferativo do respectivo controle, evidenciando que o tratamento nessa condição não impacta significativamente a capacidade proliferativa das células. Em contrapartida, em concentrações intermediárias (40nM) observou-se uma diferença na proliferação em todas as condições. Já em concentrações de tratamento mais agressivas (400nM), observamos taxas de proliferação muito semelhantes entre as células que carregavam ou não a construção para a superexpressão de HJURP.

Portanto, a partir da análise desses dados, decidimos avaliar concentrações próximas de 40nM e com intervalos menos distantes. Neste sentido, definimos três concentrações de trabalho, 110nM, 80nM e 50nM, para dar sequência aos experimentos. Nesse novo ensaio, o período de exposição de 24 horas foi mantido e os resultados obtidos estão apresentados na figura 9. O comportamento proliferativo das linhagens HJ na ausência e presença de doxiciclina é similar devido a ocorrência de vazamento na expressão de HJURP a partir do vetor pLVX, isto é, HJURP é expressa em níveis aumentados mesmo na ausência de doxiciclina (dox).

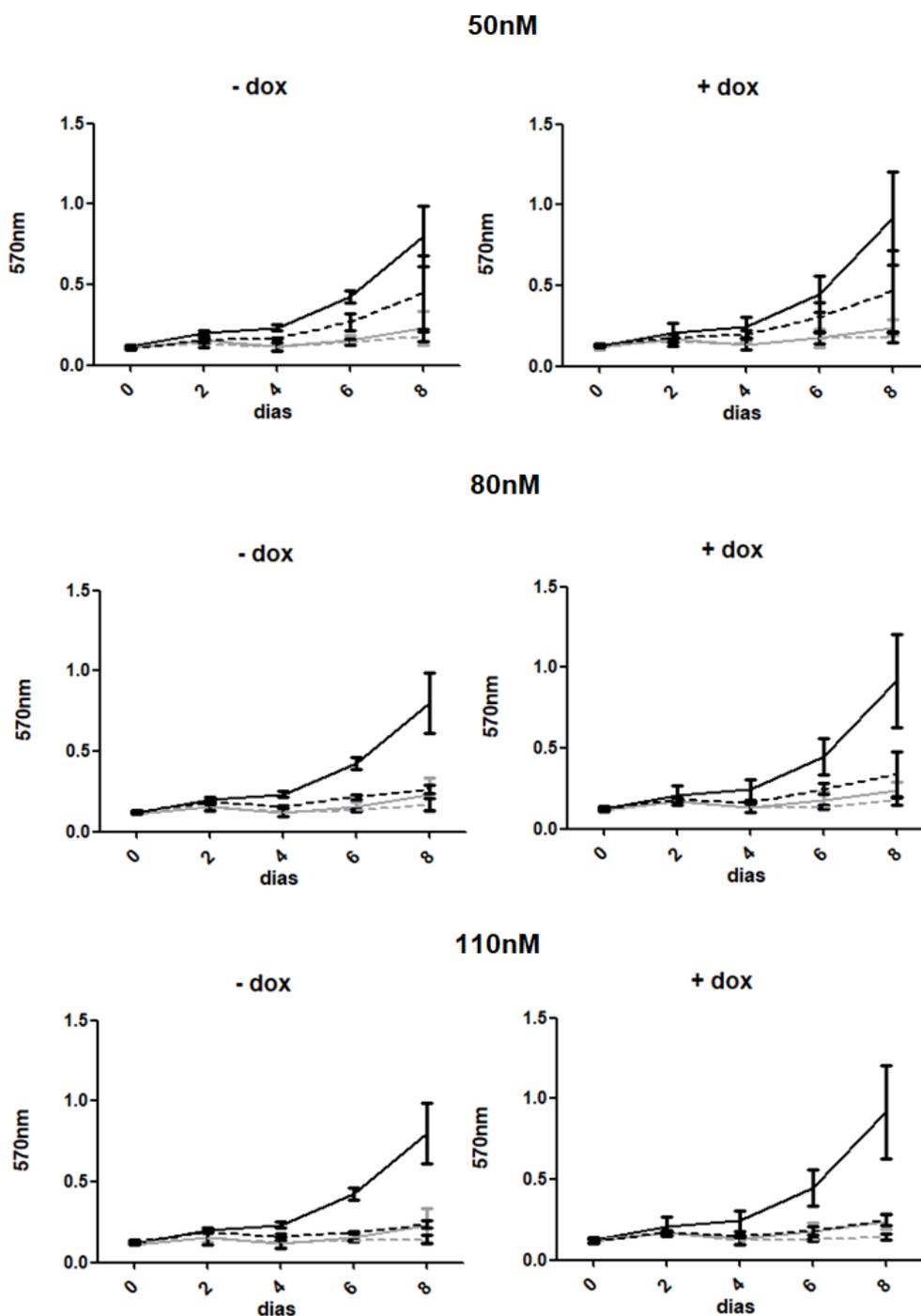
**Figura 8. Curva proliferação das linhagens superexpressoras U87MG frente ao estresse replicativo promovido por camptotecina (CPT).**



Foi realizado um ensaio preliminar com diferentes concentrações de camptotecina com o objetivo de encontrar uma faixa de tratamento que fosse suficiente para causar um impacto no crescimento das linhagens U87MG carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP, mas que não impedisse que elas pudessem se proliferar após a retirada do tratamento. Para isso, o tratamento com camptotecina foi realizado por 24 horas e as concentrações estão indicadas na imagem.

Como esperado, na condição não tratada, a linhagem superexpressora de HJURP apresentou maior capacidade proliferativa do que as células controle, cujas curvas de crescimento assemelham-se a das linhagens expostas à CPT. Na condição de estresse replicativo induzido, observamos uma tendência no ganho proliferativo na linhagem HJ a partir do 4º dia de análise na condição de tratamento mais branda (50nM), enquanto que nas maiores concentrações (80 e 110nM) não foi visto diferenças entre as células parentais ou superexpressoras. Tendo em vista o mecanismo de ação da camptotecina (durante a fase S do ciclo celular), questionamos se o período de tratamento prolongado (24 horas) não estaria sendo excessivo e, conseqüentemente, mascarando um eventuais diferenças no comportamento dessas linhagens.

Figura 9. Curva de proliferação da linhagem U87MG após a indução do estresse replicativo por camptotecina durante 24 horas.



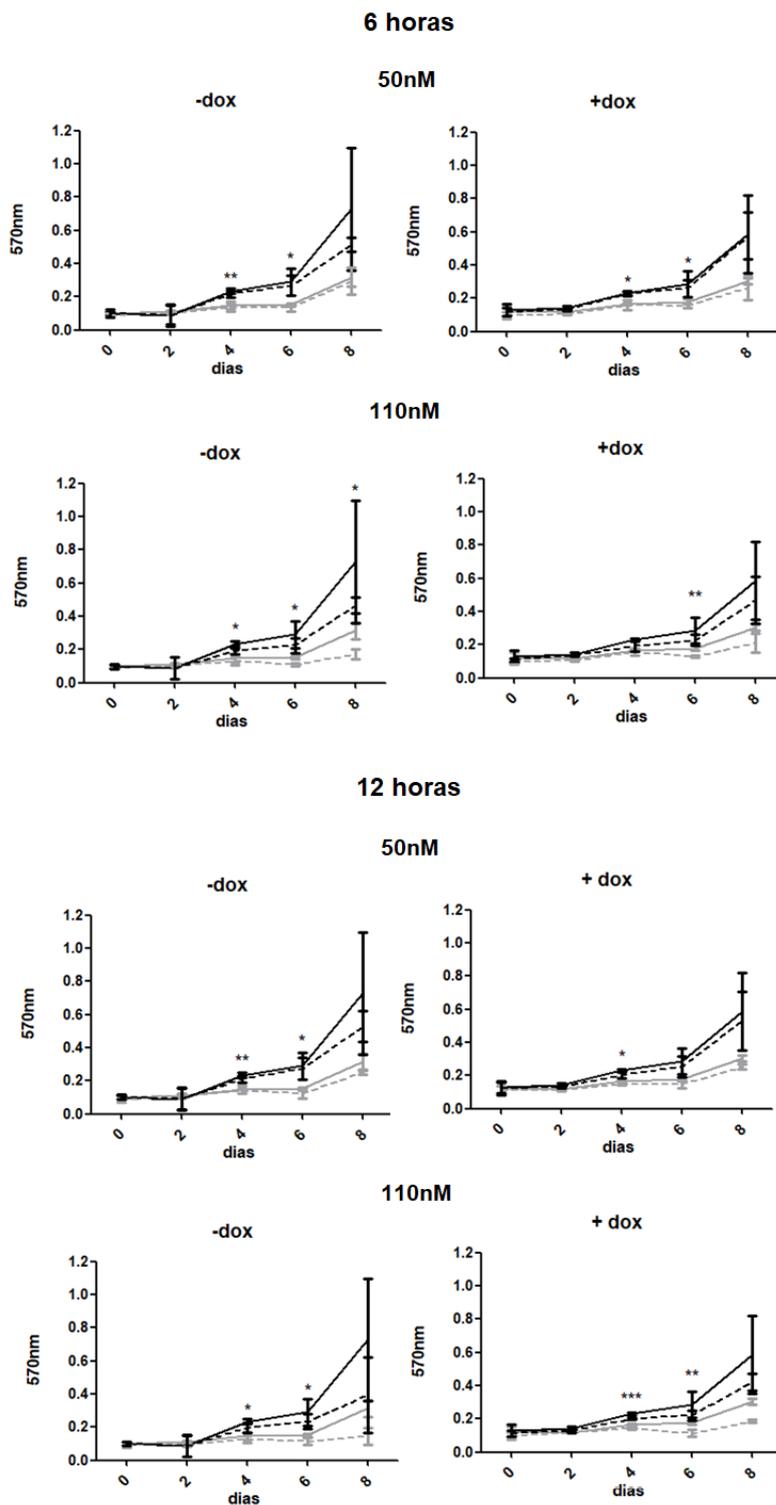
Quantificação da proliferação celular das linhagens U87MG carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP. A cor cinza indica as linhagens transformadas com o vetor vazio (TP), enquanto que a cor preta representa o vetor carregando a construção para a superexpressão de HJURP (HJ). O tratamento com CPT está representado pelas linhas tracejadas.

Então, para testarmos essa hipótese, conduzimos experimentos de avaliação da atividade proliferativa em que as células foram tratadas com diferentes concentrações de CPT (50 e 110nM) por períodos mais curtos, 6 e 12 horas (figura 10), e paralelamente realizamos o ensaio de citotoxicidade (MTT) (figura 11), para verificar se o tratamento estaria causando algum impacto na viabilidade dessas células.

A partir da análise das curvas de proliferação após o tratamento com 50nM de CPT, em ambos os intervalos de tempo, observamos um comportamento de crescimento similar entre as linhagens tratadas com seus respectivos controles não submetidos ao estresse. Este dado sugere que a concentração e o período de tratamento utilizados tenham sido insuficientes para causar impacto na proliferação das linhagens.

A comparação entre as curvas de crescimento das linhagens TP tratada x HJ tratada (dados no gráfico) mostrou que as células superexpressoras de HJURP tendem a ter uma maior resistência ao estresse replicativo quando expostas à camptotecina. Apesar do perfil proliferativo delas (TP tratada x HJ tratada) ser estatisticamente diferente, essa análise por si só não nos permite concluir que a superexpressão é capaz de conferir resistência proliferativa frente ao tratamento. Esperava-se que o impacto na proliferação entre as linhagens TP controle x TP tratada fosse maior do que o impacto entre as células HJ controle x HJ tratada, porém a análise estatística dessas condições não apresentou diferença significativa. É possível que o tempo de observação do crescimento dessas células (até 8 dias) tenha sido insuficiente para identificarmos essa competência, pois as curvas de proliferação tendem a abrir a partir do sexto dia em cultura. Então, para tentarmos validar essa hipótese esse experimento será repetido alterando a quantidade de dias que as células ficarão se proliferando.

Figura 10. Curva de proliferação da linhagem U87MG após a indução de estresse replicativo por camptotecina durante 6 ou 12 horas.



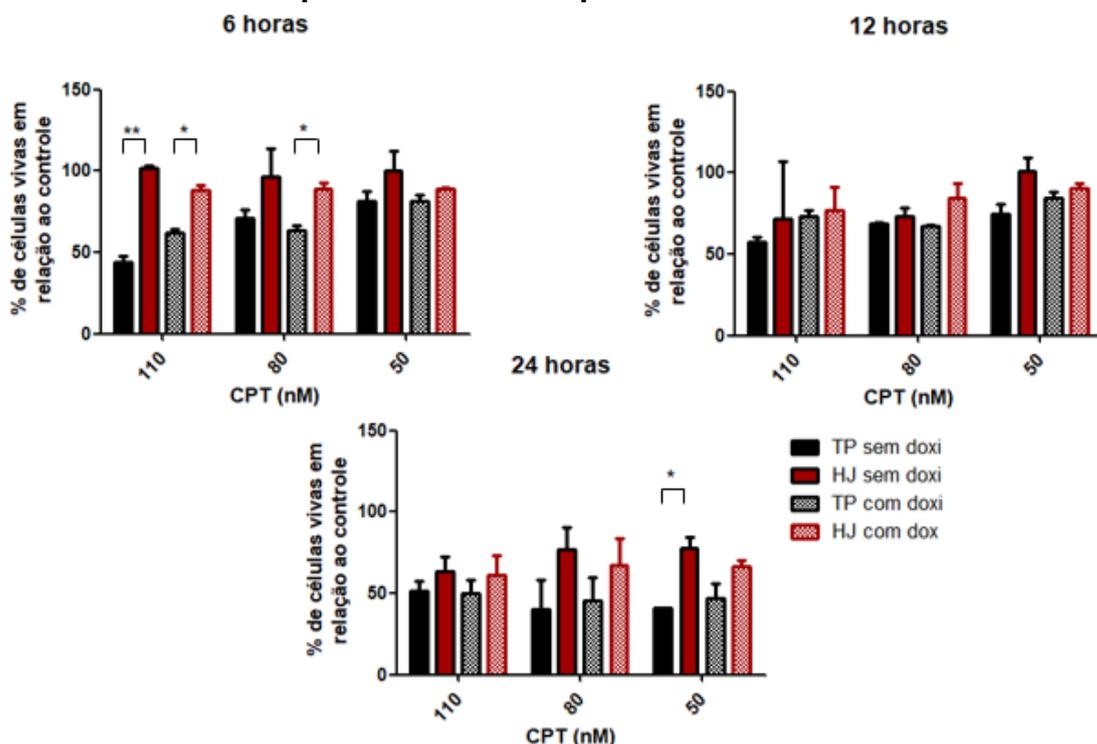
Quantificação da proliferação celular das linhagens U87MG carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP após a indução do estresse replicativo por 6 e 12 horas. O tratamento com CPT está representado pelas linhas tracejadas. As diferenças estatísticas entre as condições TP tratada x HJ tratada foram obtidas utilizando o teste t de *Student* (\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### **Avaliação da capacidade de recuperação das células superexpressoras frente ao estresse replicativo causado por camptotecina (CPT)**

O potencial de recuperação, das células parentais e superexpressoras de HJURP, frente ao estresse replicativo foi analisado através do ensaio de MTT. Nele, as linhagens TP e HJ foram submetidas a diferentes concentrações de camptotecina (50, 80 e 110nM) por 6,12 ou 24 horas. Após a exposição, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas para se recuperarem dos efeitos causados pela droga e os resultados estão representados na figura 11. De maneira geral, o tratamento com CPT por 12 horas não teve um impacto significativo na viabilidade das linhagens se comparado aos demais tratamentos. Nesse intervalo, a porcentagem de células vivas, em relação ao controle não tratado, mostrou valores superiores a 65%. Porém no tratamento mais curto de 6 horas observamos que as células superexpressoras de HJURP apresentam maior viabilidade celular após exposição com 80nM ( $P \leq 0.05$ , HJ dox x TP dox) e 110nM ( $P \leq 0.01$ , HJ x TP e;  $P \leq 0.05$ , HJ dox x TP dox) de camptotecina. Além disso, as células superexpressoras de HJURP mostraram maior capacidade de recuperação após o tratamento na concentração de 50nM pelo período de 24 horas ( $P \leq 0.05$ ), mesmo na ausência de doxiciclina, o que é explicado pelo vazamento na expressão de HJURP (figura 11).

Os resultados do ensaio de MTT das células submetidas ao tratamento com CPT, juntamente com a informação de que a indução do estresse replicativo prolongado é capaz de interferir drasticamente na viabilidade celular, confirmou que o tratamento de 24 horas não seria adequado para os ensaios de proliferação e dificultaria a detecção de diferenças no comportamento das células superexpressoras *versus* as células parentais, como suposto anteriormente.

**Figura 11. Avaliação da capacidade de recuperação das linhagens U87MG frente ao estresse replicativo causado por CPT.**



Análise da recuperação das linhagens U87MG carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP após a indução do estresse replicativo com camptotecina (CPT) por 6, 12 e 24 horas de tratamento. Terminado o período de exposição, as células foram incubadas a 37° C por 48 horas até o momento da análise. O teste t de *Student* foi utilizado para encontrar as possíveis diferenças estatísticas entre as linhagens HJ e TP (\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### **Análise do impacto do estresse replicativo na dinâmica do ciclo celular das células superexpressoras de HJURP**

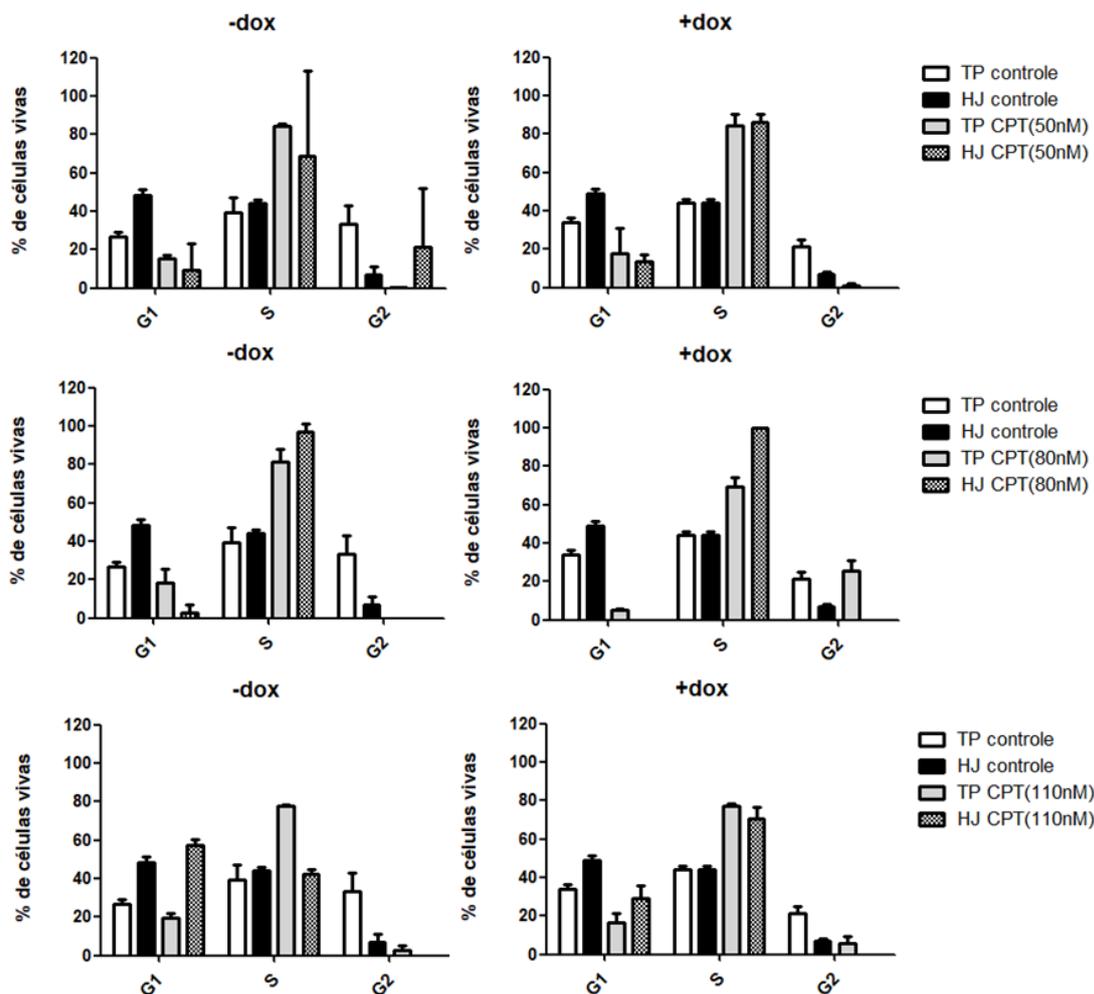
A confirmação da participação de HJURP no reparo de DSBs (dados não publicados de nosso grupo), juntamente com a observação de altos níveis de expressão e correlação com pior prognóstico em diversos tecidos tumorais, embasou a hipótese do seu envolvimento com o controle do estresse replicativo. Nesse sentido, acreditamos que a superexpressão de HJURP poderia atuar como um mecanismo adaptativo que permite a propagação dessas células tumorais sem que elas entrem em colapso.

Na tentativa de avaliar a função HJURP no controle da dinâmica do ciclo celular frente ao estresse replicativo, submetemos as linhagens TP e HJ ao tratamento com diferentes concentrações de camptotecina (50, 80 e 110nM) e verificamos a distribuição das células no ciclo celular através de análise do

conteúdo de DNA. O intervalo de exposição de 24 horas foi escolhido com o intuito de garantir que a maior parte da população celular tivesse a possibilidade passar pela fase S do ciclo celular durante o tratamento e, portanto, sofrer a ação da droga. Findado o período de tratamento, as células foram processadas e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo (IP).

Os resultados obtidos revelaram um perfil de distribuição celular ligeiramente distinto entre as linhagens carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP mesmo na ausência de estresse replicativo (figura 12). Curiosamente, a linhagem TP apresentou uma porcentagem baixa de células em G1 (menor que 40% em todas as condições testadas) e uma quantidade relativamente alta de células em G2 de cerca de 20%. Já a população de células presentes em S foi similar entre as linhagens analisadas. Por sua vez, a linhagem HJ exibiu aproximadamente metade da população celular em G1 e uma quantidade bem reduzida (menor que 10%) em G2 (figura 12). Após a indução do estresse replicativo, foi observado um aumento na população de células em fase S em ambas linhagens. Como esperado, o tratamento prolongado com a camptotecina foi capaz de induzir uma certa sincronização celular em fase S. Isso se deve ao fato de a droga funcionar como um inibidor de Top1, uma enzima muito importante no processo de duplicação do material genético, e ocasionar a interrupção do processamento das forquilhas de replicação. Entretanto, não observamos diferenças consistentes entre as células parentais e superexpressoras de HJURP (figura 12).

**Figura 12. Distribuição da dinâmica do ciclo células das linhagens superexpressoras de HJURP frente ao tratamento com camptotecina (CPT).**



Análise da distribuição das populações ao longo do ciclo celular das linhagens U87MG carregando ou não a construção para a superexpressão de HJURP após a indução do estresse replicativo com camptotecina (CPT) por 24 horas. Após 18 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de CPT (50,80 e 110nM) e o perfil de distribuição celular foi analisado por citometria de fluxo com iodeto de propídeo (PI).

## DISCUSSÃO

A descoberta da relação entre o elevado nível proteico de HJURP, encontrado nos mais variados tipos de câncer, com o péssimo prognóstico dos pacientes tem orientado nossas investigações acerca das possíveis funções dessa proteína no desenvolvimento tumoral. Adicionalmente, dados anteriores de nosso grupo demonstraram que os altos níveis de HJURP são fundamentais para a sobrevivência das células de GBM, e conferem maior capacidade proliferativa e clonogênica para estas células, o que embasou a hipótese de seu possível envolvimento com o controle do estresse replicativo.

Neste trabalho demonstramos que a superexpressão de HJURP na linhagem de GBM U87MG pode conferir maior resistência ao estresse replicativo induzido pelo tratamento com camptotecina. Em todas as condições analisadas, as células portadoras da construção para superexpressão de HJURP mostraram um ganho de competência proliferativa em relação ao vetor vazio (TP), mesmo após o tratamento com camptotecina. A inexistência de diferença nas taxas de proliferação das células (HJ e TP) na ausência e presença de camptotecina à 50nM, mesmo após longa exposição (12 horas), sugerem que a linhagem U87MG tenha resistência ao tratamento em baixas concentrações (figura 10).

Os resultados do ensaio de MTT corroboram com a existência de uma possível resistência à CPT em altas concentrações (110nM) com exposição de até 6 horas e em baixas concentrações (50-80nM) com exposição de até 12 horas, pois nestas condições a viabilidade de celular ficou acima de 80%. Além disso, observamos também que a superexpressão de HJURP confere um efeito protetivo adicional frente ao estresse replicativo, visto que em algumas condições de maior estresse (110nM) ou tratamento mais longo (24 horas), as células superexpressoras mostram maior viabilidade (figura 11) e também maior capacidade proliferativa (figura 10).

Em conformidade com esses achados, outros dados de nosso grupo (Bortolozo Serafim, 2018) mostraram que o tratamento com hidroxiuréia (agente indutor de estresse replicativo através de outros mecanismos) promove aumento nos níveis de expressão de HJURP na linhagem U87MG parental (não transformada). Conjuntamente, esses resultados sugerem que a superexpressão de HJURP, amplamente observada em tumores agressivos,

parece ser um mecanismo adaptativo das células tumorais para o controle do estresse replicativo endógeno, ocasionado pela atividade de proliferação exacerbada.

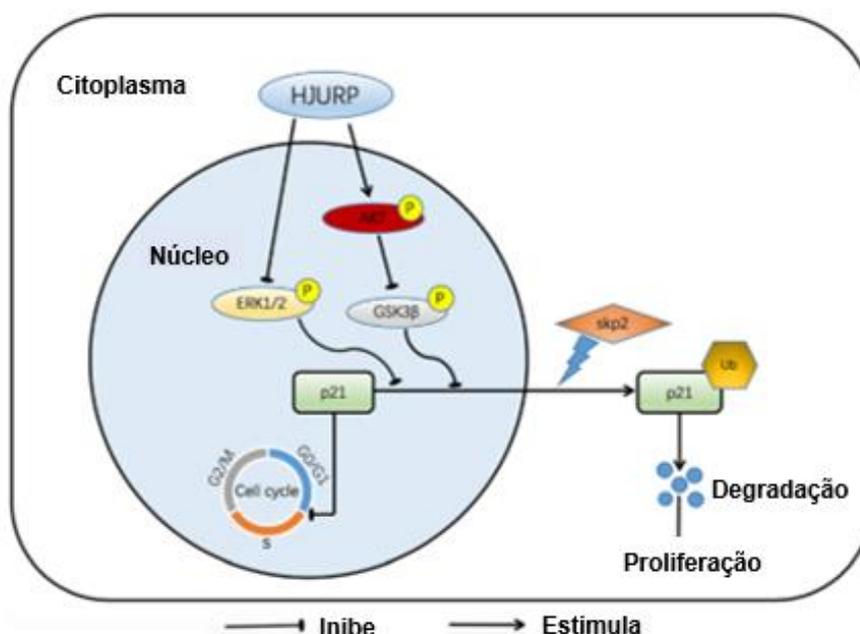
Estudos na literatura, envolvendo modelos tumorais distintos, demonstraram através de métodos diferentes que a variação dos níveis de HJURP impacta na proliferação celular. Em um destes trabalhos, foi demonstrado que a superexpressão dessa proteína em células de carcinoma hepatocelular (SMMC7721) induz um aumento nas taxas proliferativas, enquanto que o seu silenciamento reduz o crescimento celular após 48 e 72 horas (B. et al., 2017). Outro trabalho também mostrou a associação existente entre o incremento dos níveis de HJURP com um aumento na atividade proliferativa de células tumorais de mama (HU et al., 2010).

Recentemente, Filipescu e colaboradores (2017) descobriram que os níveis de RNAm de HJURP e CENP-A em células com diferentes *backgrounds* genéticos estavam atrelados ao o *status* do gene TP53 daquelas células. Eles observaram que a perda do gene TP53 tem como consequência o aumento na expressão dessas proteínas, e que esse controle é realizado através de regulação transcricional via p21 e o complexo E2F4-DREAM. Assim sendo, em células nas quais TP53 não é funcional, HJURP encontra-se aumentada, o que pode explicar porque os tumores agressivos frequentemente apresentam aumento nos níveis de HJURP.

Uma vez que o estresse replicativo, gerado a partir do intenso processo de duplicação celular, tenha sido apontado como umas das principais causas da instabilidade genômica (DOBDELSTEIN; SØRENSEN, 2015; GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015), é plausível pensar que os altos níveis de HJURP estejam contribuindo de certa forma para o desenvolvimento e progressão das células tumorais, já que vários estudos na literatura relatam a importância dela na manutenção da estabilidade genômica (FILIPESCU et al., 2017; HEO; CHO; KIM, 2013; HU et al., 2010; VALENTE et al., 2013). Baseando-se no trabalho elaborado por Chen e colaboradores (2018) em células de carcinoma hepatocelular, acreditamos que o ganho replicativo observado nas células U87MG (p53 selvagem) após a indução de HJURP possa estar envolvido com as vias de sinalização MAPK/ERK1/2 e AKT/GSK3 $\beta$ . De acordo com o modelo proposto (figura 13), HJURP seria responsável pela desestabilização de

p21, proteína reguladora da transição da fase G1/S e que participa da resposta de dano ao DNA, promovendo sua translocação para o citoplasma e, conseqüentemente, sua degradação via ubiquitinação por SKP2. Desse modo, HJURP poderia facilitar a transição G1/S e assim favorecer a proliferação celular.

**Figura 13. Modelo representativo da função de HJURP nas células de carcinoma hepatocelular (HCC).**



p21 é um inibidor quinase dependente de ciclina que atua na transição G1/S e no reparo do DNA. Ele desempenha um papel crucial em várias vias de sinalização inibidoras do crescimento celular e na inibição da progressão do ciclo celular de maneira dependente e independente de p53. Sua ação antiproliferativa está atrelada com a ativação de quinases (ERK1/2 e p-GSK3 $\beta$ ) que conferem estabilidade à proteína, mantendo-a na região nuclear. Conforme o modelo proposto, HJURP é responsável pela desestabilização de p21 através da inibição das vias de sinalização MAPK/ERK1/2 e AKT/GSK3 $\beta$ . Esse fenômeno promove a translocação de p21 para a região citoplasmática, onde será ubiquitinado e futuramente degradado. Fonte: Chen et al. 2018, modificada.

Ainda que os desbalanços nos mecanismos de regulação da proliferação e/ ou da capacidade de evasão à apoptose sejam importantes para o processo de tumorigênese, a sobrevivência tumoral é dependente também de uma resposta mínima ao estresse replicativo adicional, que invariavelmente promove o surgimento de danos no DNA. Dentro dessa perspectiva, inúmeros inibidores da via de ATR-CHK1 (SAR-020106, CCT244747 e V158411) têm sido empregados na clínica para o tratamento dos mais diversos tipos de neoplasias

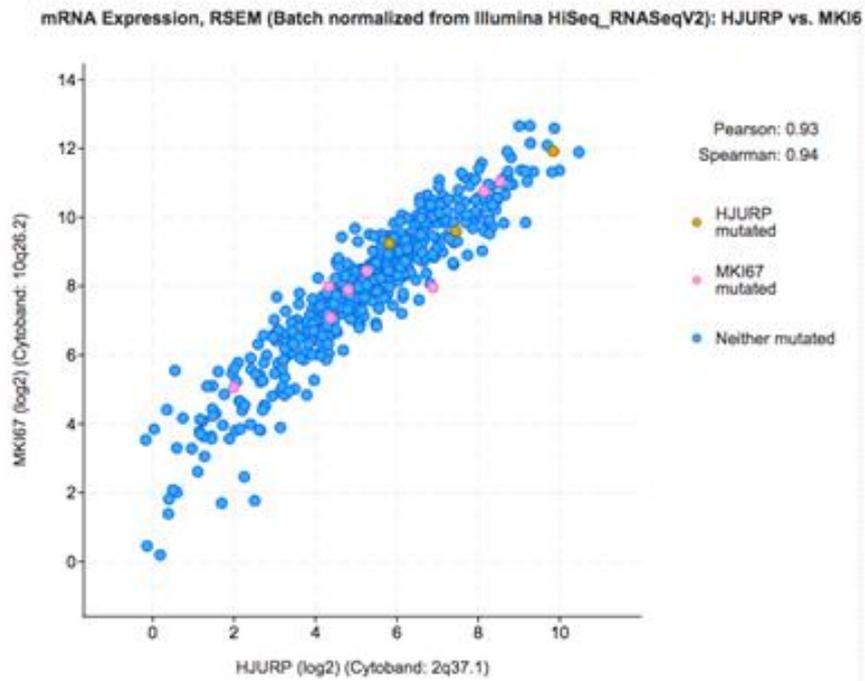
(TAYLOR; LINDSAY, 2016). Por exemplo, SAR-020106 demonstrou ter um potencial terapêutico em estudos pré-clínicos quando utilizado em associação com gemcitabina e irotecano (derivado de camptotecina) (WALTON et al., 2010). Entretanto, a magnitude do efeito terapêutico ainda sim é limitada para alguns tipos de tumores (TAYLOR; LINDSAY, 2016).

Evidências encontradas na literatura apontam uma possível participação da HJURP no reparo de lesões no material genético. Através de ensaios de imuno-precipitação Kato e colaboradores (2007) demonstraram a interação de HJURP com outras duas proteínas, hMSH5 e NBS1, relacionadas com o reparo de quebras de fita dupla no DNA através de recombinação homóloga. Além disso, eles também observaram um aumento na expressão de HJURP após o tratamento com diversos agentes genotóxicos. Ensaio de imuno-precipitação, envolvendo uma proteína componente do replissomo importante na duplicação do DNA denominada And-1, demonstraram uma possível cooperação com HJURP no contexto de deposição de CENP-A na região centromérica (JARAMILLO-LAMBERT et al., 2013). Outros estudos mais recentes, relataram a participação de And-1 conjuntamente com Claspin na resposta induzida por estresse replicativo (HAO et al., 2015); e com CtIP na atividade de ressecção da fita de DNA para que haja o reparo eficiente da lesão por recombinação homóloga (CHEN et al., 2017).

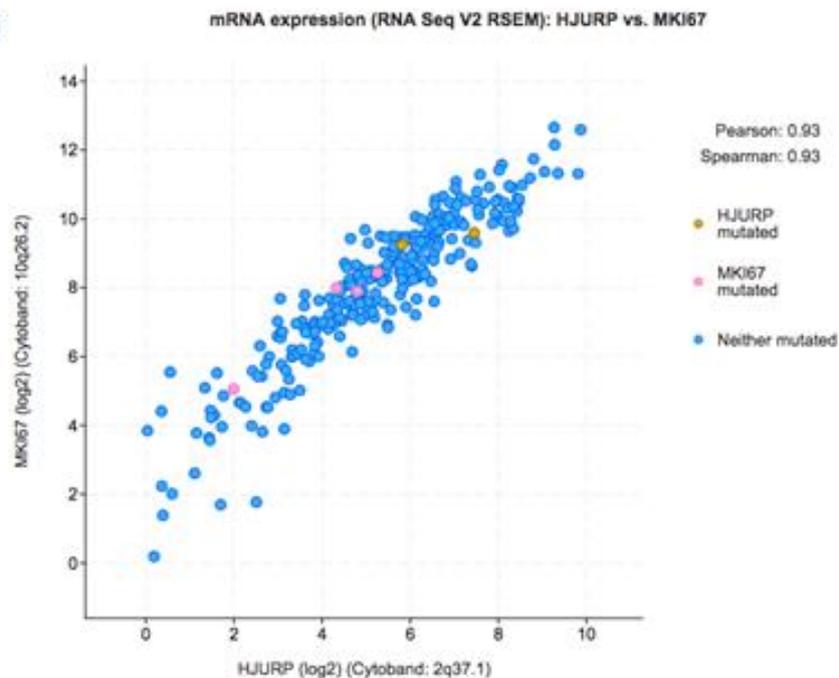
Dados recentes do nosso grupo (Bortolozo Serafim, 2018), comprovaram a participação de HJURP na atividade de reparo de DNA em células de GBM. A partir de ensaios de indução de quebras de dupla fita através de irradiação com *microlaser*, demonstramos que HJURP e CENP-A são recrutadas para as regiões de lesão imediatamente após a ocorrência do dano e promovem alterações na estrutura da cromatina que facilitam a atividade de reparo de DNA através do mecanismo de recombinação homóloga. Além disso, observamos uma correlação positiva bem forte entre os níveis de expressão de HJURP e do marcador de proliferação Ki67 em astrocitomas de diferentes graus caracterizados pelo consórcio internacional *The Cancer Genome Atlas* (BRENNAN et al., 2013).

Figura 14. Correlação entre os níveis de expressão de HJURP e MKI67.

A)



B)



Correlação positiva entre os níveis de mRNA de HJURP e MKI67 feitas através de análise no cBioportal (514 casos LGG e 592 casos GBM do experimento PanCancer). com a ferramenta de co-expressão ([http://www.cbioportal.org/index.do?Action=Submit&genetic\\_profile\\_ids=gbm\\_tcga\\_pan\\_can\\_atlas\\_2018\\_mutations&case\\_set\\_id=gbm\\_tcga\\_pan\\_can\\_atlas\\_2018\\_all&cancer\\_study\\_id=gbm\\_tcga\\_pan\\_can\\_atlas\\_2018&gene\\_list=HJURP&tab\\_index=tab\\_visualize&#mutation\\_details](http://www.cbioportal.org/index.do?Action=Submit&genetic_profile_ids=gbm_tcga_pan_can_atlas_2018_mutations&case_set_id=gbm_tcga_pan_can_atlas_2018_all&cancer_study_id=gbm_tcga_pan_can_atlas_2018&gene_list=HJURP&tab_index=tab_visualize&#mutation_details)) Fonte: Serafim, 2018. Manuscrito em preparação).

Em conjunto, esses dados sugerem que a resistência ao estresse replicativo exógeno, observado nesse estudo, seja decorrente da participação de HJURP no reparo de lesões do DNA. Podemos também supor que esta competência confere maior habilidade para o controle do estresse replicativo, atrelado à proliferação exacerbada, o que é permissivo para a progressão tumoral bastante rápida observada nos astroctiomas e explica a capacidade de proliferação extremamente alta observada nos glioblastomas.

## **CONCLUSÃO**

Nossos resultados sugerem que os altos níveis de HJURP conferem um aumento na capacidade proliferativa das células U87MG e podem induzir uma maior resistência ao estresse replicativo induzido por camptotecina. Considerando que o aumento da proliferação celular e o acúmulo de danos são eventos chaves para o desenvolvimento tumoral, podemos concluir que HJURP pode estar participando no ganho de capacidade proliferativa e de reparo de DNA em células de glioblastoma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. **Molecular Cell**, v. 46, n. 2, p. 115–124, 2012.

ALLEN, C. et al. More forks on the road to replication stress recovery. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 1, p. 4–12, 2011.

ALMASAN, A. et al. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry , activation of E2F-responsive genes , and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 92, n. 12 June, p. 5436–5440, 1995.

ALSAAB, H. O. et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–15, 2017.

B., H. 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, 2017.

BARNHART-DAILEY, M. C. et al. HJURP interaction with the condensin II complex during G1 promotes CENP-A deposition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, n. 1, p. 54–64, 2017.

BARNHART, M. C. et al. HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 229–243, 2011.

BASS, T. E. et al. ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. **Nature Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 1185–1195, 2016.

BECK, D. B. et al. The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h.. **Genes Dev**. v. 26, n. 23, p. 2580-2589, 2012.

BIGNELL, G. R. et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 893–898, 2010.

BLACK, J. C. et al. Conserved Antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 $\gamma$  during Cell Cycle Progression. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 736–748, 2010.

BLACK, J. C. et al. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 541–555, 2013.

BLACKBURN, E. H. Telomerase and Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 3, n. September, p. 477–483, 2005.

BRENNAN, C. W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013.

BURHANS, W. C.; WEINBERGER, M. DNA replication stress, genome instability and aging. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7545–7556, 2007.

BYUN, T. S. et al. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. **Genes Dev**. v. 19, n.9, p. 1040–1052, 2005.

CHANG, D. J.; CIMPRICH, K. A. Perspective DNA damage tolerance : when it ' s OK to make mistakes. **Nat Chem Biol.** v. 5, n. 2, p. 82–90, 2009.

CHEN, Y. et al. And-1 coordinates with CtIP for efficient homologous recombination and DNA damage checkpoint maintenance. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 5, p. 2516–2530, 2017.

CHIAL, B. H. et al. Tumor Suppressor ( TS ) Genes and the Two-Hit Hypothesis. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 4–7, 2008.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Review Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. **Cell.** v.149, n.6, p. 1192-1205, 2012.

YIXIN, Y.; DAI, W. Genomic Instability and Cancer. **J Carcinog Mutagen**, v. 5, 1000165, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.4172%2F2157-2518.1000165>.

DALGAARD, J. Z. Causes and consequences of ribonucleotide incorporation into nuclear DNA. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 12, p. 592–597, 2012.

DE FREITAS, L. M. et al. Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

DE TAYRAC, M. et al. Prognostic Significance of EDN/RB, HJURP, p60/CAF-1 and PDLI4, Four New Markers in High-Grade Gliomas. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73332, 2013.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 309–316, 2010.

DENKO, N. C.; GIACCIAT, A. J.; STRINGER, J. R. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 11, May, p. 5124–5128, 1994.

DOBDELSTEIN, M.; SØRENSEN, C. S. Exploiting replicative stress to treat cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 6, p. 405–423, 2015.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650–9, 1986.

ERRICO, A.; COSTANZO, V. Differences in the DNA replication of unicellular eukaryotes and metazoans: Known unknowns. **EMBO Reports**, v. 11, n. 4, p. 270–278, 2010.

FEARON, E. F.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell.**, v. 61, N. 5, p. 759–767, 1990.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. 343–346, 2016.

FILIPESCU, D. et al. Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. **Genes and Development**, v. 31, n. 5, p. 463–480, 2017.

FRAGKOS, M.; NAIM, V. Rescue from replication stress during mitosis. **Cell Cycle**, v. 16, n. 7, p. 613–633, 2017.

FRENZEL, A. et al. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**. April, v. 14, n. 4, p. 584–596, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0300-z>.

GAILLARD, H.; GARCÍA-MUSE, T.; AGUILERA, A. Replication stress and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 276–280, 2015.

GORGOU LIS, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, April, v. 434, n. 7035, p. 907–913, 2005.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2011.

GUIROUILH-BARBAT, J. et al. Is homologous recombination really an error-free process? **Front Genet**. June, v. 5, Article 175, About 15 p., 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00175>.

HAAHR, P. et al. Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. **Nature Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 1196–1207, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HAO, J. et al. And-1 coordinates with Claspin for efficient Chk1 activation in response to replication stress. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 14, p. 1845–1985, 2015.

HASTINGS, P. J. et al. Mechanisms of change in gene copy number. **Nat Rev Genet**. v. 10, n. 8, p. 551-564 August, 2009.

HEO, J.-I.; CHO, J. H.; KIM, J.-R. HJURP Regulates Cellular Senescence in Human Fibroblasts and Endothelial Cells Via a p53-Dependent Pathway. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 8, p. 914–925, 2013.

HILLS, S. A.; DIFFLEY, J. F. X. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R435–R444, 2014.

HU, Z. 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. 1–15, 2010.

IACOVONI, J. S. et al. High-resolution profiling of  $\gamma$ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. **EMBO Journal**, v. 29, n. 8, p. 1446–1457, 2010.

ISHOP, J. M. I. B. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, n. 7, March, p. 3940–3944, 1999.

JARAMILLO-LAMBERT, A. et al. Acidic Nucleoplasmic DNA-binding Protein ( And-1 ) Controls Chromosome Congression by Regulating the Assembly of Centromere Protein A ( CENP-A ) at Centromeres. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 3,

p. 1480–1488, 2013.

KARNOUB, A. E. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 557–563, 2007.

KATO, T. 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. 8544–8553, 2007.

KHURANA, S.; OBERDOERFFER, P. Replication stress: A lifetime of epigenetic change. **Genes**, v. 6, n. 3, p. 858–877, 2015.

LABIB, K.; HODGSON, B. Replication fork barriers: Pausing for a break or stalling for time? **EMBO Reports**, v. 8, n. 4, p. 346–353, 2007.

LANGSTON, L. D.; INDIANI, C.; O'DONNELL, M. Whither the replisome: Emerging perspectives on the dynamic nature of the DNA replication machinery. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2686–2691, 2009.

LETAL, A. Apoptosis and Cancer. **Annu. Rev. Cancer Biol.** v.1, p. 275–294, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-050216-121933>.

LI, F. et al. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: Did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 12, p. 2350–2394, 2017.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1242/dev.091744>.

LIU, J. et al. Ras Transformation Results in an Elevated Level of Cyclin D1 and Acceleration of G 1 Progression in NIH 3T3 cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 7, p. 3654–3663, 1995.

LUCCA, C. et al. Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. **Oncogene**, v. 23, n. 6, p. 1206–1213, 2004.

LUDMIL B. ALEXANDROV, SERENA NIK-ZAINAL, DAVID C. WEDGE, SAMUEL A. J. R. APARICIO, SAMBEHJATI, ANDREW V. BIANKIN, GRAHAMR. BIGNELL, N. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, p. 415–421, 2013.

MACHERET, M.; HALAZONETIS, T. D. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 425–448, 2015.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.5, n.9, Article a012716, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a012716>.

MEERLOO, J. VAN; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods Mol Biol.** v. 731, p. 237–245, 2011.

MEISTER, P. et al. Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 4, p. 537–

544, 2005.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–134, 2010.

MICCO, R. DI et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. **Nature** November, v. 444, n. 7119, p. 638–642, 2006.

MULLER, W. J.; LEE, E. Y. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. October, v. 2, n.10, Article a003236, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.

MUÑOZ, S.; MÉNDEZ, J. DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease. **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 1-15, 2017.

NAM, E. A.; CORTEZ, D. ATR signaling: more than meeting at the fork Edward. **Biochem J**, v. 436, n. 3, p. 527–536, 2013.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, 2010.

PERPELESCU, M. et al. HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 15, p. 2742–2754, 2015.

POWELL SM, ZILZ N, BEAZER-BARCLAY Y, BRYAN TM, HAMILTON SR, THIBODEAU SN, VOGELSTEIN B, K. K. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature**, v. 359, n. 6392, p. 235-237, 1992.

QIAN, B.-Z. B.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

ROBERTS, S. A. et al. Article Clustered Mutations in Yeast and in Human Cancers Can Arise from Damaged Long Single-Strand DNA Regions. **Molecular Cell**, v. 46, n. 4, p. 424–435, 2012.

RUBEN, A. J.; BIOLOGY, E. Hayflick , his limit , and cellular ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**. October, v. 1, n. 1, p. 72–76, 2000.

SABATINOS, S. A. Replication Fork Stalling and the Fork Protection Complex. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 40, 2010.

SALDIVAR, J. C.; CORTEZ, D.; CIMPRICH, K. A. The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 10, p. 622–636, 2017.

SANCHEZ-PULIDO, L. et al. Common Ancestry of the CENP-A Chaperones Scm3 and HJURP. **Cell**, v. 137, n. 7, p. 1173–1174, 2009.

SHUAIB, M. et al. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, n. 4, p. 1349–1354, 2010.

TAUBE, J. H. et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-

expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 35, p. 15449–15454, 2010.

TAYLOR, E. M.; LINDSAY, H. D. DNA replication stress and cancer: cause or cure? **Future oncology (London, England)**, v. 12, n. 2, p. 221–37, 2016.

VALENTE, V. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 1–11, 2009.

VALENTE, V. et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) Levels Is Correlated with Glioblastoma Cells Survival. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, Article e62200, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062200>.

VANDER HEIDEN, M.; CANTLEY, L.; THOMPSON, C. Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

VESELA, E. et al. Common Chemical Inductors of Replication Stress : Focus on Cell-Based Studies. **Biomolecules**. Feb 21; v. 7, n. 1, pii: E19. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom7010019>.

WALTON, M. I. et al. The Preclinical Pharmacology and Therapeutic Activity of the Novel CHK1 Inhibitor SAR-020106. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 89–100, 2010.

ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. Causes and Consequences of Replication Stress. v. 16, n. 1, p. 2–9, 2015.

ZIMMERMAN, K. M. et al. Diminished Origin-Licensing Capacity Specifically Sensitizes Tumor Cells to Replication Stress. **Mol. Cancer Res**. April, v. 11, n. 4, p. 370–381, 2013.