

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE DANO AO DNA E DA AUTOFAGIA EM  
CÉLULAS TUMORAIS EXPOSTAS AO TRATAMENTO COM  
QUIMIOTERÁPICOS**

**Michelle de Souza Lima**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)**.

**Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques**

**Co-orientador: Prof. Dr. Guido Lenz**

Porto Alegre, novembro de 2018.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS**

Esta tese foi realizada principalmente no Laboratório de Reparo de DNA de Eucariotos, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O trabalho foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a qual concedeu a bolsa no país, e pelos projetos PRONEX/FAPERGS/CNPQ – EDITAL n°008/2009 - (Processo n°10/0044-3) e Universal MCTIC/CNPQ (Processo n° 454288/2014-0).

Parte das atividades experimentais foram desenvolvidas durante estágio sanduíche no laboratório *Biologie et Thérapeutiques du Cancer, Centre de Recherche Saint Antoine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), UPMC, Paris, França. O estágio sanduíche foi subsidiado pelo projeto CAPES/COFECUB n° 583/07 e pelo INSERM, França.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu querido orientador, prof. João Antonio Pêgas Henriques, por me possibilitar fazer parte de seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica, por acreditar no meu potencial, por me permitir ter uma experiência acadêmica incrível no exterior e por todo o carinho e respeito.

Ao meu co-orientador, prof. Guido Lenz, por quem tenho imensa admiração. Obrigada por todo o apoio e por me guiar nos momentos de dúvida. Sempre foi uma honra poder contar com sua opinião e sua análise crítica.

Ao prof. Alexandre Escargueil, meu tutor durante o período sanduíche. Obrigada por me receber e me fazer sentir bem-vinda em seu grupo de pesquisa, por ser extremamente ético e profissional e por sempre confiar no meu potencial. Muito obrigada de coração.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelas oportunidades. Ao Elmo, por ser sempre solícito e atencioso.

À CAPES, especialmente ao programa CAPES/COFECUB pelo financiamento deste projeto.

À Diana Bordin, que mesmo à distância e passando por um período difícil foi capaz de me auxiliar durante as etapas finais do meu doutorado. Obrigada por todo o carinho e atenção. Sempre serei grata por tudo que você me ensinou e continua ensinando.

À Victória Patrícia e à Larissa Milano (Beus), obrigada pela amizade, pelos desabafos nos momentos de crise existencial, por serem tão prestativas e queridas. À Tatiana Visnu, obrigada pela amizade e pela parceria em nossa viagem histórica pra Colômbia. À Mariana Rinaldi, pela amizade, pelas conversas e por me permitir fazer parte de um projeto paralelo e enriquecer meus conhecimentos. Todas vocês têm um lugar grande no meu coração.

Aos colegas do laboratório, Iuri Marques, Miriana Machado, André Juchem, Larissa Penna, Beatriz Dal Pont, Marcos Thomé, Gabriel Berbigier, Lyda Espítia e

Jose Torres, muito obrigada pela amizade e por qualquer forma de ajuda que vocês me prestaram (inclusive as caronas). Às nossas queridas ICs, Sâmia Squizani, Carol Vieira, Priscila Silveira e Jéssica Pelegrini.

À Nucha, pela amizade e companheirismo durante a estadia da França. À Fernanda Munari, por ter me auxiliado e me acolhido no início do meu período sanduíche.

Aos meus pais, Genézio e Marli, pelo apoio nos momentos difíceis e por suportarem a saudade de três mil quilômetros de distância durante todos estes anos. À minha irmã, Luciane, por todo o apoio, seja por Skype, seja por uma viagem pelo Canal da Mancha. À tia Ni, por todo o carinho e apoio desde o início da minha saga em Porto Alegre.

À minha segunda família. Meu namorado, Dax, por me trazer paz quando eu mais precisei. À minha sogra, Cláudia, por me acolher e ser uma segunda mãe. À tia/chefe Helena, que também me acolheu com carinho e me proporcionou o que eu mais precisava nestes últimos meses.

Muito obrigada a todos por acreditarem que eu podia chegar até aqui.

## SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS .....	2
AGRADECIMENTOS .....	3
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A Resposta de Dano ao DNA.....	15
1.1.1 O DNA Pode Ser Lesionado por Fontes Endógenas ou Exógenas.....	15
1.1.2 O Reconhecimento do Dano .....	16
1.1.3 ATM e a Resposta a Quebras de Fita Dupla .....	17
1.1.4 ATR e a Ativação de Checkpoints .....	20
1.1.5 Principais Vias de Reparo de DNA.....	21
1.1.5.1 Reparo por Excisão de Bases – BER.....	21
1.1.5.2 Reparo por Excisão de Nucleotídeos – NER.....	23
1.1.5.3 Reparo por União de Extremidades Não-Homólogas – NHEJ .....	25
1.1.5.4 Reparo por Recombinação Homóloga – HR .....	26
1.1.5.5 A Via da Anemia de Fanconi – FA.....	29
1.1.5.6 Reparo de Pareamentos Errados – MMR (Mismatch Repair) .....	31
1.1.5.7 Síntese Translesão – TLS .....	33
1.1.6 A Ativação da DDR por Quimioterápicos.....	35
1.1.6.1 As Ecteinascidinas.....	38
1.1.7 Modulação da DDR no Tratamento do Câncer.....	39
1.1.7.1 O Princípio da Letalidade Sintética e os Inibidores de PARP.....	39
1.1.7.2 Inibidores das Vias de ATM-Chk2 e ATR-Chk1 .....	40
1.1.7.3 Inibidores das Vias de Reparo.....	42
1.2 A Via Autofágica .....	42
1.2.1 Maquinaria Molecular da Autofagia .....	43

1.2.2	Autofagia como Alvo Terapêutico no Combate ao Câncer .....	45
2	OBJETIVOS.....	50
2.1	Objetivo geral .....	50
2.2	Objetivos específicos.....	50
3	CAPÍTULO I - <i>Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair</i> .....	53
4	CAPÍTULO II - <i>Autophagy modulation influences oxaliplatin tolerance of colorectal cancer cells under low glucose environment</i> .....	75
5	DISCUSSÃO GERAL.....	103
6	CONCLUSÕES.....	111
6.1	Conclusão geral.....	111
6.2	Conclusões específicas .....	111
7	PERSPECTIVAS .....	113
8	REFERÊNCIAS .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

**3MA:** 3-metiladenina (*3-methyladenine*)

**5-FU:** 5-fluorouracil

**AMPK:** proteína cinase ativada por AMP (*AMP activated protein kinase*)

**AP:** sítio abásico

**APE:** AP-Endonuclease

**ATG:** genes relacionados à autofagia (*autophagy related genes*)

**Atg:** proteínas relacionadas à autofagia (*autophagy related proteins*)

**ATM:** mutado na ataxia telangiectasia (*ataxia telangiectasia mutated*)

**ATP:** adenosina trifosfato

**ATR:** relacionado à ATM e Rad3 (*ATM and Rad3 related*)

**ATRIP:** proteína de interação à ATR (*ATR interacting protein*)

**BER:** reparo por excisão de bases (*base excision repair*)

**BRCA1/2:** gene associado ao câncer de mama 1 e 2 (*breast cancer associated gene 1 and 2*)

**CDKs:** cinases dependentes de ciclina (*cyclin dependente kinases*)

**Chk1:** cinase de ponte de checagem 1 (*checkpoint kinase 1*)

**Chk2:** cinase de ponte de checagem 2 (*checkpoint kinase 2*)

**CQ:** cloroquina (*chloroquine*)

**CtIP:** proteína de ligação à CtBP (*CtBP-binding protein*)

**DDR:** resposta de dano ao DNA (*DNA damage response*)

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DNA:** ácido desoxirribonucleico (*desoxyribonucleic acid*)

**DNA-PK:** cinase dependente de DNA (*DNA-dependent protein kinase*)

**DNA-PKcs:** subunidade catalítica da cinase dependente de DNA (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*)

**dRP:** 5' desoxirribose-fosfato

**DSB:** quebras de fita dupla no DNA (*double strand break*)

**dsDNA:** DNA de fita dupla (*double strand DNA*)

**ET:** ecteinascidina

**ERCC1:** *excision repair cross complementing group 1*

**ERO:** espécie reativa de oxigênio

**EXO1:** exonuclease 1

**FA:** anemia de Fanconi

**FEN1:** 5'-flap endonuclease 1

**FIP200:** proteína de 200kDa que interage com a família FAK (*Fak family interacting protein of 200kDa*)

**GGR ou GG-NER:** reparo do genoma global (*global genome repair*)

**GLUT 1:** transportador de glicose 1 (*glucose transporte 1*)

**GLUT 3:** transportador de glicose 3 (*glucose transporte 3*)

**H2AX:** histona H2A

**HCQ:** hidroxicloroquina

**HR:** reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination repair*)

**ICL:** ponte intercadeia (*interstrand crosslink*)



**LC3/II:** proteína 1 de cadeia leve 3 associada ao microtúbulo – I e II (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 – I and II*)

**LKB1:** cinase de fígado B1 (*liver kinase B1*)

**MDC1:** mediador do ponto de checagem 1 de dano ao DNA (*mediator of DNA damage checkpoint 1*)

**MGMT:** metilguanina metiltransferase

**MLH:** homólogo de MutL (*MutL homolog*)

**MMR:** Reparo de pareamentos errados no DNA (*mismatch repair*)

**MRE11:** gene de recombinação meiótica 11 (*meiotic recombination 11*)

**MSH:** homólogo de MutS (*MutS homolog*)

**mTOR:** alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

**MTT:** sal de tetrazólio (*thiazolyl blue tetrazolium bromide*)

**NBS1:** proteína 1 da síndrome de quebra de Nijmegen (*Nijmegen breakage syndrome protein 1*)

**NER:** reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*)

**NHEJ:** reparo por união de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*)

**PARP:** poli ADP ribose polimerase

**PAXX:** parálogo de XRCC4 e XLF (*paralog of XRCC4 and XLF*)

**PCNA:** antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen*)

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*)

**PIKK:** cinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase-related kinase*)

**RFC:** fator de replicação C (*replication fator C*)

**RPA:** proteína de replicação A (*replication protein A*)

**SLX4 :** *Synthetic Lethal of unknown (X) function - 4*

**SSB:** quebra de fita simples no DNA (*single strand break*)

**ssDNA:** DNA de fita simples (*single strand DNA*)

**TCR ou TC-NER:** reparo acoplado à transcrição (*transcription coupled repair*)

**TFIIH:** fator de transcrição IIH (*transcription factor IIH*)

**TLS:** síntese translesão (*translesion syntesis*)

**TopBP1:** proteína 1 de ligação à topoisomerase 2 (*topoisomerase 2-binding protein 1*)

**Ulk1/2:** cinases Unc-51-like 1 e 2 (*Unc-51-like kinases 1 and 2*)

**UV:** ultravioleta

**XLF:** fator tipo XRCC4 (*XRCC4-like factor*)

**XP:** *Xeroderma pigmentosum*

**XRCC1/2/3/4:** *X-ray repair cross-complementing protein 1, 2, 3 and 4*

## RESUMO

A resposta de dano ao DNA (DDR) é um conjunto de vias capazes de orquestrar o manejo de lesões no DNA provocadas por agentes endógenos ou exógenos. A ativação da DDR pode ocorrer em células tumorais em resposta ao tratamento com fármacos quimioterápicos. Neste cenário, após o reconhecimento do dano e transdução do sinal, diversos mecanismos podem ser ativados nas células, como a parada no ciclo celular, o reparo do dano, a autofagia, ou a morte celular. Em casos nos quais os danos não são suficientes para levar à morte da célula tumoral, a ativação das outras vias pode levar à resistência ao fármaco. Desta forma, uma modulação destas respostas pode auxiliar na investigação das causas da resistência e otimizar o efeito dos quimioterápicos no tratamento de tumores. Neste trabalho, demonstrou-se a ativação da DDR por dois fármacos pertencentes ao grupo das Ecteinascidinas (ETs), trabectedina (Yondelis®) e lurbinectedina (PM01183). A fim de se investigar o efeito da modulação do início da DDR, foram utilizados inibidores das vias das cinases ATM e ATR em células de câncer cervical e de câncer de ovário tratadas com as ETs. Foi encontrado que somente a inibição dual das cinases pode reduzir de maneira expressiva a viabilidade destas células. Em células de câncer cervical, esta redução na viabilidade ocorre por diminuição na formação de foci de proteínas do início da DDR ( $\gamma$ H2AX e MDC1) e de proteínas do reparo por recombinação homóloga (BRCA1 e Rad51). O aumento no número de mitoses aberrantes também foi encontrado nas mesmas condições de tratamento, confirmando a necessidade de inibição dual de ATM e ATR para a sensibilização destas células. Nesta tese também se investigou o papel da autofagia em células de câncer colorretal tratadas com oxaliplatina (Ox) em condições de baixa disponibilidade de glicose. A baixa concentração de glicose é uma característica presente no microambiente tumoral que pode conferir resistência às terapias convencionais. Ao compararmos células tratadas em baixa ou alta concentração de glicose, foi encontrado um aumento na ativação da autofagia, acompanhado de uma maior sobrevivência celular em células tratadas com Ox em baixa glicose. O papel da autofagia nesta possível resistência à condição de baixa glicose foi analisado por modulação

gênica e farmacológica. Encontrou-se que o silenciamento do gene ATG7, essencial para o via autofágica, reduziu a ativação de autofagia em células tratadas em baixa glicose, porém não foi suficiente para reduzir a viabilidade celular, indicando que o mecanismo de resistência à baixa glicose é parcialmente independente da autofagia. Entretanto, em células tratadas com o indutor de autofagia rapamicina, foi encontrada uma queda na viabilidade celular, sugerindo que a super estimulação da autofagia pode ser uma ferramenta na sensibilização de células de câncer colorretal ao tratamento com Ox. Assim, a modulação da DDR e da via autofágica, vias que são ativadas na presença de quimioterápicos, pode ser uma ferramenta válida para a sensibilização de células de câncer e conferir uma melhor resposta ao tratamento.

## **ABSTRACT**

The DNA damage response (DDR) is a group of pathways that orchestrate the management of DNA lesions caused by endogenous and exogenous agents. DDR activation can occur in tumor cells in response to chemotherapy. In this scenario, after the damage recognition and signal transduction, several outcomes can be activated within the cells, such as cell cycle arrest, DNA repair, autophagy, or cell death. In cases the damage cannot lead to tumor cell death, the activation of other pathways may lead to drug resistance. Therefore, a modulation of these responses helps in investigating the causes of resistance and can optimize the effects of chemotherapeutical agents in the treatment of tumors. In this work, we demonstrated the activation of DDR by two Ecteinascidins (ETs), trabectedin (Yondelis®) and lurbinectedin (PM01183). To investigate the effect of modulating the initial steps of DDR, ATM and ATR kinases inhibitors were used in cervical and ovarian cancer cells treated with ETs. It was found that only dual inhibition of the kinases can expressively reduce cell viability. In cervical cancer cells, this reduction in cell viability is due to a decrease in foci formation of proteins found in DDR initial steps ( $\gamma$ H2AX and MDC1), and proteins of homologous recombination

repair (BRCA1 and Rad51). Aberrant mitosis was also increased in the same treatment conditions, confirming the requirement of dual inhibition of ATM and ATR to sensitize these cells. In this thesis, we also investigated the role of autophagy in colorectal cancer cells treated with oxaliplatin (Ox) in low glucose conditions. Low glucose is a feature of the tumor microenvironment that can confer resistance to conventional therapies. In comparison to cells treated in high glucose conditions, it was found an increase in autophagy activation, followed by increased cell viability in cells treated in low glucose. The role of autophagy in the possible resistance to low glucose condition was assessed by genetic and pharmacological modulation. Silencing of ATG7, an essential autophagy gene, decreased autophagy activation in cells treated under low glucose conditions, but was not enough to decrease cell viability, suggesting that the resistance mechanism in low glucose is partly independent of autophagy. Meanwhile, in cells treated with the autophagy inducer rapamycin, reduction in cell viability was observed, suggesting that autophagy overstimulation may be a useful tool to sensitize colorectal cancer cells to Ox. Therefore, modulation of DDR and autophagy, pathways that are activated in the presence of chemotherapeutical agents, can be a useful tool to sensitize cancer cells and provide a better response to treatment.

---

# ***INTRODUÇÃO***

---

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 A Resposta de Dano ao DNA**

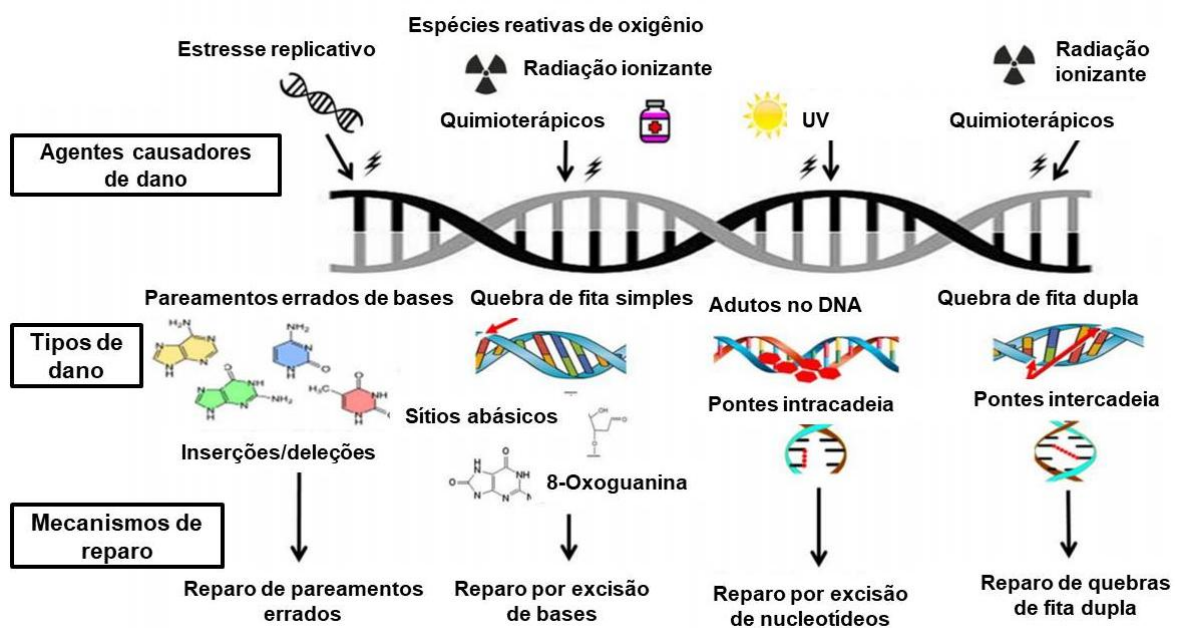
O dano ao DNA é um evento que ocorre frequentemente durante a vida de uma célula. Graças à resposta de dano ao DNA (DNA damage response – DDR), que determina o destino celular, a integridade genômica pode ser mantida (Sancar et al. 2004; Minchom et al. 2018). A DDR é composta por uma rede complexa e coordenada de diferentes vias que podem ser ativadas dependendo da fonte de estresse ou lesão ao DNA (O'Connor 2015). A ativação de vias de reparo é uma das principais funções da DDR, no entanto, a coordenação de vários mecanismos é necessária para que o reparo possa ocorrer no contexto de outras funções celulares. A parada ou diminuição do ciclo celular devido à ativação de pontos de checagem é um exemplo desta coordenação. Além disso, várias outras vias podem ser ativadas na célula sob influência da DDR como modificações transcricionais, remodelamento de cromatina, regulações metabólicas, indução de autofagia e, no caso de dano muito extenso, indução de senescência ou de morte celular programada tipo I (apoptose) (Ciccia and Elledge 2010).

As principais personagens envolvidas na DRR são as proteínas serina/treonina cinases ATM (ataxia telangiectasia-mutated), ATR (ATM and RAD3-related) e DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), que pertencem à família das PIKK (phosphoinositide 3-kinase-related kinase). ATM e ATR são responsáveis por orquestrar o início da sinalização da DDR enquanto que a DNA-PKcs atua no reparo de quebras de fita dupla por união de extremidades não-homólogas (NHEJ) (Blackford and Jackson 2017).

### **1.1.1 O DNA Pode Ser Lesionado por Fontes Endógenas ou Exógenas**

A molécula de DNA está sob constante ataque e pode ser estressada por várias fontes tanto endógenas como exógenas. Fontes endógenas podem ser geradas de forma espontânea durante o metabolismo celular normal, como as

espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar a oxidação de bases e quebra no DNA. A incorporação errônea de bases durante a replicação, a interconversão de bases por desaminação e a perda de bases por depuração também são fontes endógenas de dano ao DNA (Lindahl and Barnes 2000; Helena et al. 2018). Fontes exógenas de dano podem ser tanto físicas quanto químicas. A radiação ultravioleta e a radiação ionizante são exemplos de fontes genotóxicas físicas. Dentre as fontes químicas causadoras de dano, os fármacos quimioterápicos são exemplos bem conhecidos, como os agentes alquilantes e os agentes indutores de pontes intracadeia ou intercadeia (ICLs) (Ciccia and Elledge 2010). Estas fontes genotóxicas causam diferentes tipos de dano e, dependendo do dano, diferentes mecanismos de reparo serão ativados (**Fig. 1**).



**Figura 1. Dano ao DNA e mecanismos de reparo.** Vários tipos de agentes causam diferentes tipos de dano no DNA. A ativação das diferentes vias de reparo depende do tipo de dano. Adaptado de Helena et al. (2018).

### 1.1.2 O Reconhecimento do Dano

Para que a DDR seja ativada na presença de dano, primeiramente o dano é reconhecido por sensores das vias de reparo que podem detectar lesões

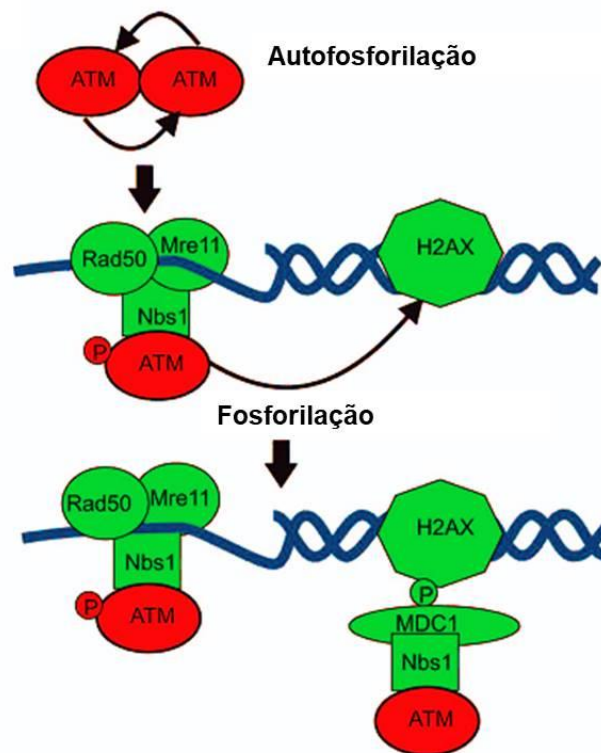


específicas. Estes sensores podem ser as próprias enzimas de reparo ou podem atuar como armação (scaffold) para o recrutamento dos sistemas de reparo. É importante mencionar que estes sensores de dano, na maioria dos casos, não são responsáveis pela sinalização do dano, conseqüentemente, a sinalização do dano não está diretamente acoplada à sua detecção. Ao considerarmos que o DNA é lesionado milhares de vezes por dia, uma ativação da sinalização de dano toda vez que uma lesão fosse detectada levaria a um ponto de checagem quase permanente com conseqüente impedimento da progressão do ciclo celular, bem como a uma constante ativação da via apoptótica. Assim, apesar de interconectadas, a detecção do dano e a sinalização do dano são eventos paralelos (Friedberg 2003; Khanna and Shilof 2009).

Um ponto interessante levantado por Cline e Hanawalt é de que a lesão no DNA pode ser encontrada por uma proteína que não seja necessariamente relacionada ao reparo, como um fator de transcrição. Assim, dependendo de qual proteína encontre primeiro a lesão, o destino da célula pode ser diferente (Cline and Hanawalt 2003). Além disso, diferentes vias de reparo podem atuar ao mesmo tempo em uma mesma lesão. Isto pode ocorrer quando lesões intermediárias são geradas durante um mecanismo de reparo, o que acarreta a intervenção de enzimas responsáveis por outras vias de reparo (Hanawalt 2015). O DNA de fita simples (ssDNA) e as quebras de fita dupla (DSBs) são exemplos destas lesões intermediárias. O ssDNA pode surgir no decorrer de vias como o reparo de DSBs, reparo por excisão de bases e reparo por excisão de nucleotídeos. As DSBs podem ocorrer, por exemplo, na presença de radiação ionizante, agentes químicos clastogênicos, ou quando forquilhas de replicação encontram um intervalo de ssDNA. Desta forma, a sinalização de dano também pode ser provocada pelo reconhecimento destas lesões (Jeggo and Lo 2007; Hanawalt 2015).

### **1.1.3 ATM e a Resposta a Quebras de Fita Dupla**

ATM é uma das principais cinases responsáveis pelo início da resposta celular a quebras de fita dupla, sendo capaz de fosforilar centenas de substratos na presença deste tipo de dano. Em resposta ao dano, ATM é autofosforilada na Ser1981 e passa de sua forma dimerizada inativa para a forma monomérica ativa. ATM ativada é capaz de fosforilar e ativar outras proteínas cinases, como a Chk2, que por sua vez fosforilam vários outros substratos. Entretanto, é provável que a maioria dos substratos de ATM também seja fosforilada por ATR, como Chk1, e que alguns substratos sejam também fosforilados por DNA-PKcs, como a variante de histona H2AX. O recrutamento de ATM para o local da DSB é dependente de sua ligação a NBS1 (Nijmegen breakage syndrome protein 1), um componente de MRN, um complexo formado por NBS1, RAD50 e MRE11 (meiotic recombination 11) (Adamowicz 2018). Além de recrutar a ATM para o local do dano, o complexo MRN também estimula sua atividade de cinase. No entanto, em resposta a modificações na cromatina ou ao estresse oxidativo, a ativação de ATM pode ocorrer sem a necessidade de uma DSB e do complexo MRN. A fosforilação de H2AX na Ser139 para formar  $\gamma$ H2AX, um dos principais eventos na sinalização de DSBs, é mediada por ATM. MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) reconhece  $\gamma$ H2AX, liga-se a ela e é estabilizado por ATM. MDC1 também pode ser fosforilado por NBS1 para promover sua retenção no local de  $\gamma$ H2AX juntamente com o complexo MRN. Com isso, ocorre mais recrutamento de ATM, levando a mais formação de  $\gamma$ H2AX e a uma amplificação do sinal da DDR (Blackford and Jackson 2017; **Fig. 2**).

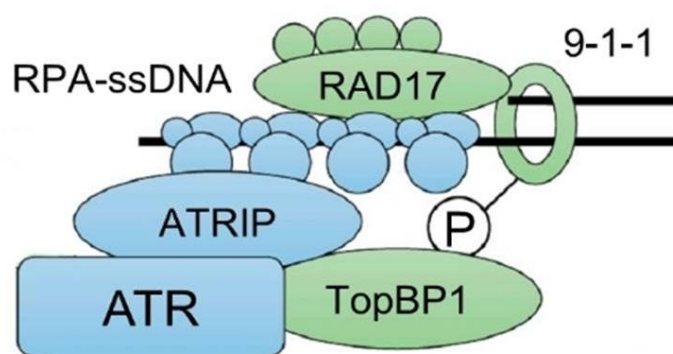


**Figura 2. Recrutamento e ativação de ATM.** ATM é autofosforilada na Ser1981 e torna-se monomérica. O recrutamento de ATM para o local da lesão é dependente de sua ligação a NBS1, um componente de MRN (NBS1, RAD50 e MRE11). ATM fosforila H2AX na Ser139 para formar  $\gamma$ H2AX. MDC1 liga-se a  $\gamma$ H2AX e pode interagir com NBS1, o que promove a retenção do complexo MRN no local de  $\gamma$ H2AX. Consequentemente, mais ATM é recrutada e o sinal da DDR é amplificado. Adaptado de Woods and Turchi (2013).

Como será mencionado adiante, ATM também está envolvida no reparo por recombinação homóloga. Esta via de reparo é estimulada pelas DSBs e requer a ressecção das extremidades do DNA no local da quebra para produzir ssDNA, uma etapa determinante na escolha pelo mecanismo de reparo. O papel da ATM nesta etapa se dá pela fosforilação de CtIP (CtBP-binding protein), uma nuclease que interage com o complexo MRN e que é requerida na ressecção (Lee et al. 2018). ATM também tem um papel na ativação do checkpoint S/G1 devido à fosforilação direta ou indireta (pela fosforilação de Chk2) do supressor tumoral p53, que por sua vez ativa p21 para promover a parada no ciclo celular (Riley et al. 2008).

### 1.1.4 ATR e a Ativação de Checkpoints

ATR também é um dos principais reguladores na DDR e, em comparação a ATM, pode ser ativada por uma maior variedade de danos genotóxicos. Isto se deve ao fato de que ATR é recrutada para regiões de ssDNA, que surgem como intermediários em vários casos de lesões. A proteína ATRIP (ATR interacting protein), parceira obrigatória de ATR, pode ligar-se a regiões de ssDNA pela sua interação com a proteína de replicação A (Replication Protein A, RPA) e, desta forma, proporcionar a localização de ATR na região do dano. Em seguida, o heterodímero ATR-ATRIP interage com o grupo específico de dano 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) que se liga em junções de ssDNA e dsDNA (DNA de fita dupla). TopBP1 (topoisomerase 2-binding protein 1) é um dos principais ativadores de ATR. Para que ATR seja ativada, primeiramente o grupo 9-1-1 é carregado na junção ssDNA-dsDNA pelo complexo carregador de grupo RAD17-RFC. O grupo é então fosforilado, o que permite a interação de TopBP1 com a ATR, levando à sua ativação (Awasthi et al. 2016, **Figura 3**).



**Figura 3. Recrutamento e ativação de ATR.** ATR é recrutada para regiões de RPA-ssDNA via ATRIP e ativada por TopBP1. O complexo do grupo 9-1-1 é carregado em regiões de junção ssDNA/dsDNA pelo carregador do grupo RAD17/RFC. O grupo 9-1-1 interage com TopBP1 e esta interação é essencial para a ativação de ATR. Adaptado de Blackford and Jackson (2017).

ATR pode participar em vias de reparação como no reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e no reparo de pontes intercadeia (ICLs) na via da anemia de Fanconi (FA). No entanto, uma das principais funções de ATR é a de sinalização

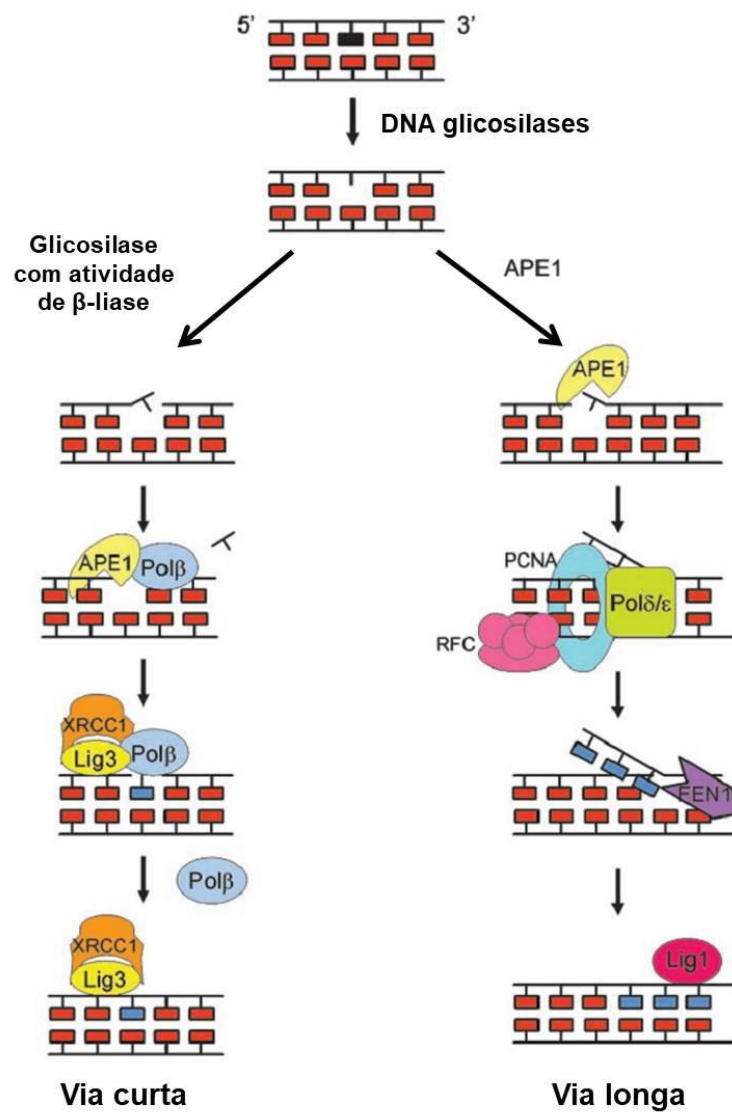
de checkpoint devido à sua capacidade de fosforilar e ativar Chk1. Na presença de dano, Chk1 inativa CDC25A, uma fosfatase que remove modificações inibitórias das cinases dependentes de ciclina (CDKs). Com esta redução da atividade das CDKs, ocorre o impedimento da progressão do ciclo celular em G2/M, conferindo mais tempo para que ocorra o reparo do DNA. Caso o dano seja muito grave, pode ocorrer a ativação das vias de senescência ou de apoptose (Nam and Cortez 2013).

### **1.1.5 Principais Vias de Reparo de DNA**

#### **1.1.5.1 Reparo por Excisão de Bases – BER**

O reparo por excisão de bases é a via mais versátil dentre os mecanismos de reparo por excisão, sendo um mecanismo conservado nos eucariotos, incluindo mamíferos. Quebras de fitas simples geradas por agentes endógenos ou exógenos, bases alquiladas, desaminadas ou oxidadas podem ser reparadas pelo BER. O reparo inicia com a remoção de uma base danificada, anormal ou inapropriada por uma DNA glicosilase. As glicosilases monofuncionais realizam apenas a clivagem da base danificada, enquanto que as bifuncionais removem a base e também possuem atividade de liase para clivar o esqueleto de DNA (Dianov and Hu 2013). Esta remoção de bases danificadas gera intermediários de reparo tais como os sítios abásicos (AP,apurínico ou apirimidínico) e quebras no DNA. O reparo destes intermediários possui etapas em comum com o reparo de quebras de fita simples geradas por ERO e com o reparo de sítios AP gerados espontaneamente. Como estes intermediários são mais citotóxicos do que a base danificada em si, vários fatores enzimáticos surgiram ao longo da evolução para promover o reparo. Um destes fatores é a AP-Endonuclease (APE), uma endonuclease específica do sítio AP que gera uma extremidade 3' OH e uma extremidade 5' desoxirribose-fosfato (dRP) após a clivagem da fita 5' no local do sítio AP (Krokan and Bjoras 2013; Wallace 2014). Nesta etapa, a via pode divergir e o reparo pode continuar por via longa (long-patch, LP-BER), na qual ocorre a excisão de dois ou mais nucleotídeos, ou por via curta (short-patch, SP-BER), na

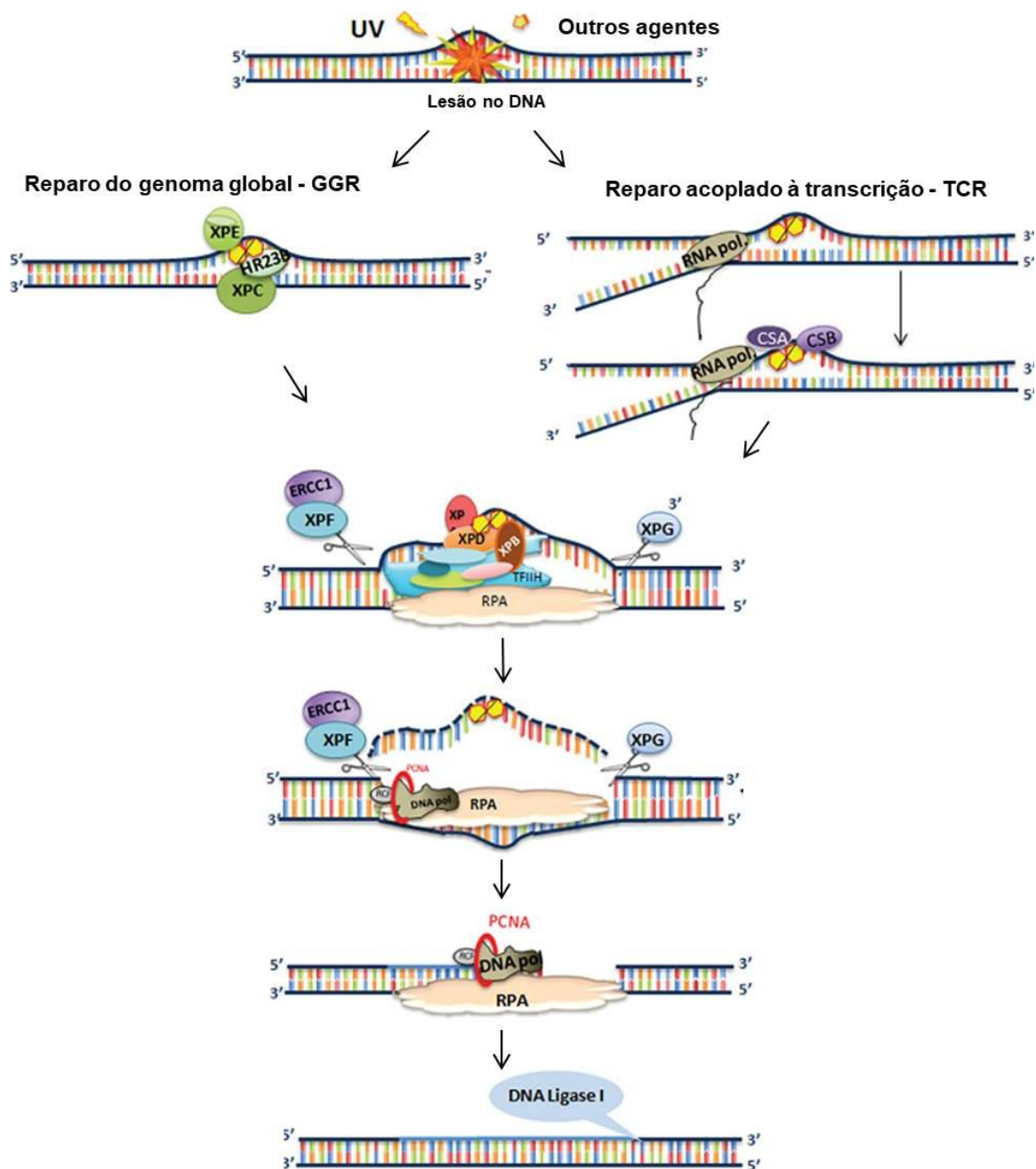
qual ocorre a excisão de um único nucleotídeo. O espaço resultante da excisão será então preenchido por uma DNA polimerase. No caso da via curta, a atividade de liase da polimerase  $\beta$  corta a extremidade 5' dRP e insere um nucleotídeo. A ligação final é catalisada pela DNA ligase 3 em complexo com XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1). A via longa utiliza proteínas replicativas para o processamento como PCNA/RFC (proliferating cell nuclear antigen/replication factor C) e a síntese pode ser feita pelas polimerases  $\beta$  ou  $\delta/\epsilon$ . A 5'-flap endonuclease 1 (FEN1) corta a extremidade 5' dRP que contém o dano e a DNA ligase 1 catalisa a finalização desta via de reparo (Gavande et al. 2016; **Fig. 4**).



**Figura 4. Modelo de BER em mamíferos.** Uma base danificada é removida por uma DNA glicosilase gerando um sítio AP. O reparo pode continuar por via curta ou via longa. Na via curta ocorre a remoção de um único nucleotídeo. Neste modelo, a glicosilase é bifuncional e possui atividade de  $\beta$  liase para clivar a ligação 3' fosfodiéster no sítio AP. APE1 endonuclease cliva a ligação 5' e recruta a polimerase  $\beta$  para preencher a sequência lesionada. A ligação é feita pela DNA ligase 3 (Lig3) em complexo com XRCC1. No modelo da via longa, a glicosilase é monofuncional e apenas gera o sítio AP. APE1 cliva a ligação 5' fosfodiéster e o complexo PCNA/RFC-Pol  $\delta/\epsilon$  continua o reparo, removendo vários nucleotídeos. A endonuclease FEN1 cliva a extremidade a ser eliminada e a ligase 1 (Lig1) realiza a ligação final. Adaptado de Sancar et al. (2004).

### 1.1.5.2 Reparo por Excisão de Nucleotídeos – NER

O NER é responsável pela eliminação de uma grande variedade de lesões com diferentes estruturas, sem a necessidade de proteínas específicas para uma determinada lesão como no caso das glicosilases do BER (Spivak 2015). Em mamíferos, a via NER pode ocorrer de duas formas: reparo do genoma global (global genome repair – GGR, GG-NER) ou reparo acoplado à transcrição (transcription coupled repair – TCR, TC-NER). Ambas as sub-vias compartilham fatores centrais do NER, porém apresentam fatores únicos para o reconhecimento do dano. No GGR, o reparo inicia com o reconhecimento do dano por *Xeroderma pigmentosum* grupo C (XPC) em complexo com a proteína HR23B, seguidos pelas ações de outros fatores envolvidos no NER (Menck and Munford 2014). O TCR é iniciado pela parada da RNA polimerase II e é responsável pela remoção de danos em genes transcricionalmente ativos (Hanaoka and Sugasawa 2016). As duas subvias convergem quando TFIIH (transcription factor IIH), um complexo de iniciação da transcrição, é recrutado para o local do reparo. As helicases XPB e XPD, que fazem parte do complexo TFIIH, criam uma bolha de nucleotídeos no local do dano. O recrutamento de XPA, RPA e XPG, assim como sua interação com outras proteínas, iniciam o processo de excisão da região danificada do DNA. A lacuna resultante desta excisão é então preenchida pela ação da maquinaria de replicação Pol  $\delta/\epsilon/\kappa$ -PCNA-RFC-RPA. Por último, uma DNA ligase catalisa a união final no local do reparo (Lehmann 2011; **Fig 5**).



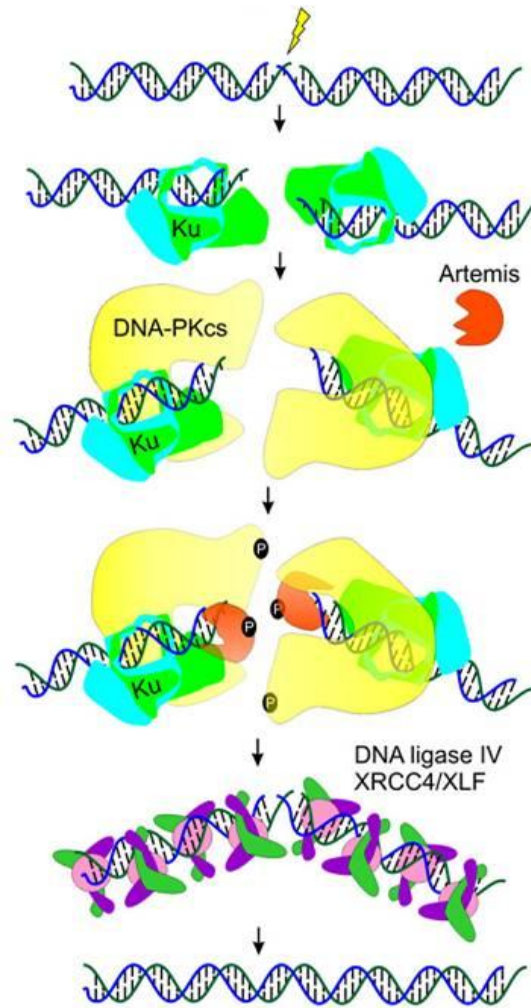
**Figura 5. Representação do NER.** Duas subvias estão envolvidas no reconhecimento da lesão no DNA. No GGR o reconhecimento depende do complexo XPC/HR23B. O TCR atua na fita transcrita de genes expressamente ativos. A parada da RNA polimerase no local do dano leva ao recrutamento de CSA e CSB. Na etapa subsequente, comum às duas subvias, ocorre o recrutamento do complexo TFIIH que inclui as helicases XPB e XPD. Este complexo desenovela o local do dano no DNA que será coberto com RPA. RPA e XPA auxiliam no posicionamento correto da maquinaria do NER antes da etapa de clivagem. XPG e o complexo XPF/ERCC1 são as principais endonucleases para a clivagem na região do dano. o preenchimento da sequência é



realizado pela maquinaria de replicação Pol  $\delta/\epsilon/\kappa$ -PCNA-RFC-RPA e a selagem é feita pela ligase 1. Adaptado de Menck and Munford (2014).

### 1.1.5.3 Reparo por União de Extremidades Não-Homólogas – NHEJ

Em células humanas, o NHEJ é responsável pelo reparo da maior parte das quebras de fita dupla dentro das fases S e G2 do ciclo celular e por praticamente todo o reparo de DSBs que ocorre fora das fases S e G2 (Lieber 2010). Enquanto o reparo por recombinação necessita de uma região de homologia que pode chegar a centenas de pares de bases, no reparo por NHEJ é comum a utilização de uma região de micro-homologia, geralmente  $\leq 4$  pares de bases. Esta via inicia quando a DSB é reconhecida pelo heterodímero Ku70-Ku80 (Ku)(Kakarougkas and Jeggo 2014). A DNA-PKcs, que tem alta afinidade pelas extremidades do DNA, especialmente na presença de Ku, é então recrutada. Sua atividade de cinase regula, através de autofosforilação, o processamento das extremidades e o reparo, bem como facilita o recrutamento do complexo de ligação final. A nuclease Artemis também é requerida para a união de extremidades em vários casos, possivelmente em casos com algum nível de ressecção devido à sua complexidade. A adição dos nucleotídeos no local da quebra pode ser feita pela família Pol X de polimerases (Pol  $\mu$  e Pol  $\lambda$ ) e por fim, o complexo da DNA ligase, composto de ligase IV, XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), XLF (XRCC4-like fator) e PAXX (paralog of XRCC4 and XLF), realiza a etapa final de ligação nas duas fitas do DNA (Pannunzio et al. 2017, **Fig. 6**).

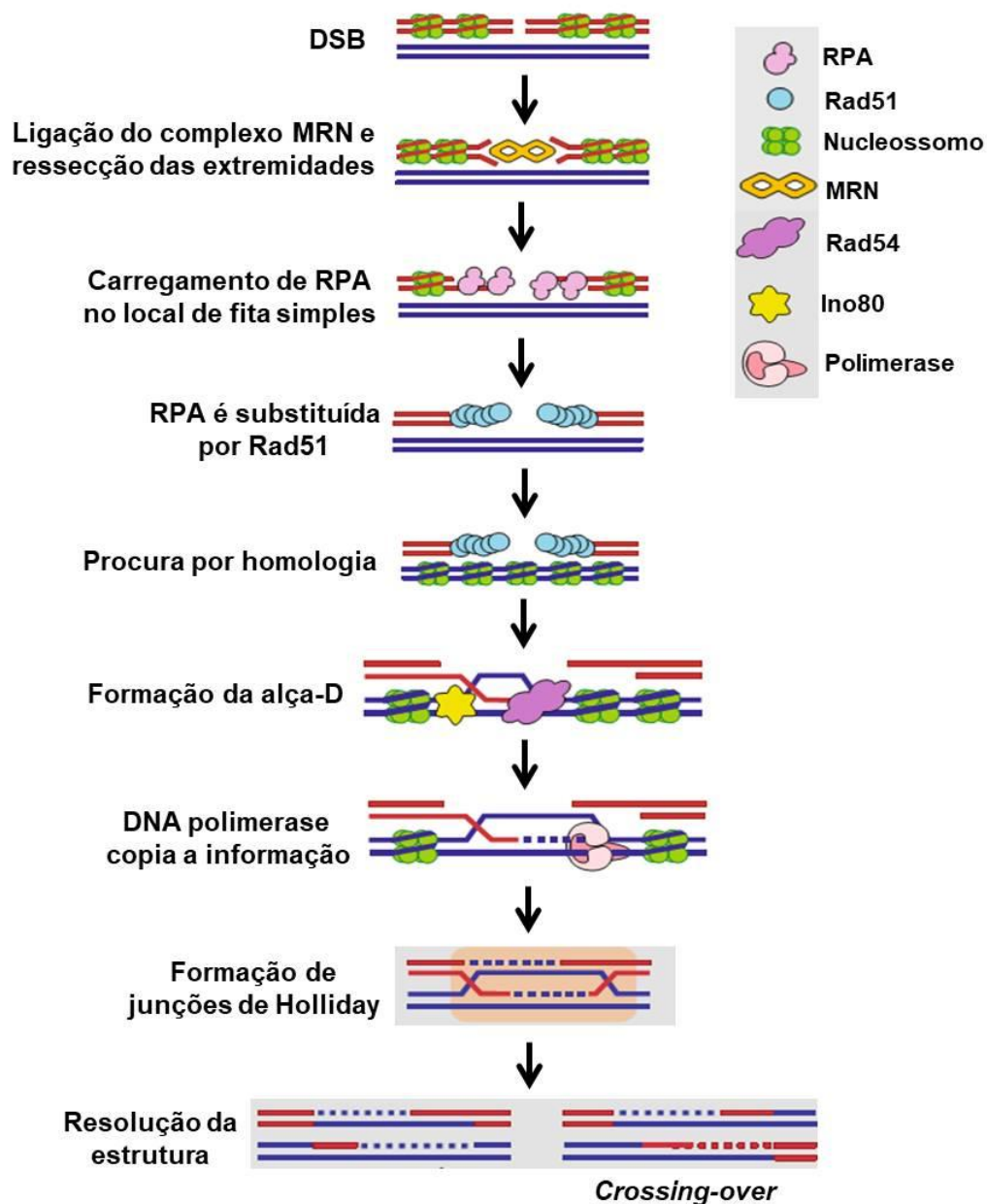


**Figura 6. Reparo por união de extremidades não-homólogas – NHEJ.** Uma DSB é reconhecida pelo heterodímero Ku. A DNA-PKcs, que tem alta afinidade pelas extremidades do DNA, especialmente na presença de Ku, é então recrutada. DNA-PKcs é autofosforilada e regula o processamento das extremidades e o reparo, além de facilitar o recrutamento do complexo de ligação final. A nuclease Artemis também é fosforilada por DNA-PKcs. O complexo da DNA ligase, formado por DNA ligase IV, XRCC4, XLF e PAXX (não mostrado), realiza a etapa final de ligação nas duas fitas do DNA. Adaptado de Blackford and Jackson (2017).

#### 1.1.5.4 Reparo por Recombinação Homóloga – HR

Assim como o NHEJ, o HR é responsável pelo reparo de quebras de fita dupla de DNA, porém, como requer regiões de homologia que podem ser encontradas na cromátides-irmãs, este tipo de reparo ocorre apenas durante as fases S e G2 do ciclo celular (Lemaître and Soutoglou 2015). Nesta via de reparo

são necessárias várias etapas para que seja restaurada qualquer perda de informação no local da quebra. Em uma primeira etapa, ocorre a ressecção das extremidades da quebra de 5' para 3' gerando regiões de fita simples com extremidades 3'. A etapa inicial da ressecção envolve o complexo MRN (Lee et al. 2018). A nuclease CtIP também está envolvida na ressecção e tem sua atividade regulada por ATM. Para evitar a formação de estruturas secundárias nas regiões de fita simples, RPA é recrutada por CtIP e liga-se rapidamente nestas extremidades. A ligação de RPA estabiliza a fita simples de DNA, o que leva à ativação de ATR, assim como ao recrutamento da recombinase Rad51, de BRCA1/2 (Breast Cancer Associated Gene 1/2) e de outras proteínas para auxiliar na procura pelo molde de DNA não danificado (Desai et al. 2018). Em seguida, ocorre a substituição de RPA pela Rad51 que, com o auxílio de seus parálogos (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 e XRCC3), forma um filamento ativo capaz de procurar pela região de homologia (Sanchez et al. 2014). Na procura por homologia, este filamento invade uma fita de DNA não danificada que servirá de molde para restaurar a sequência danificada. Esta procura é facilitada pela DNA translocase Rad54 e por Ino80, que aumenta a mobilidade da cromatina. A invasão na fita não danificada promove a formação de uma estrutura transiente conhecida como alça-D (D-loop) na qual a extremidade 3'OH da fita invasora servirá como *primer* para que a maquinaria de replicação do DNA realize o preenchimento da informação faltante (Ward et al. 2015). Esta alça-D também é necessária para a formação de estruturas de fitas cruzadas conhecidas como junções de Holliday. Após a restauração da fita danificada e da ligação final do DNA, ocorre a resolução das junções de Holliday por diversas nucleases, processo que pode ocorrer em diferentes direções e resultar ou não em *crossing-over* (Khanna and Shilof 2009, **Fig. 7**).

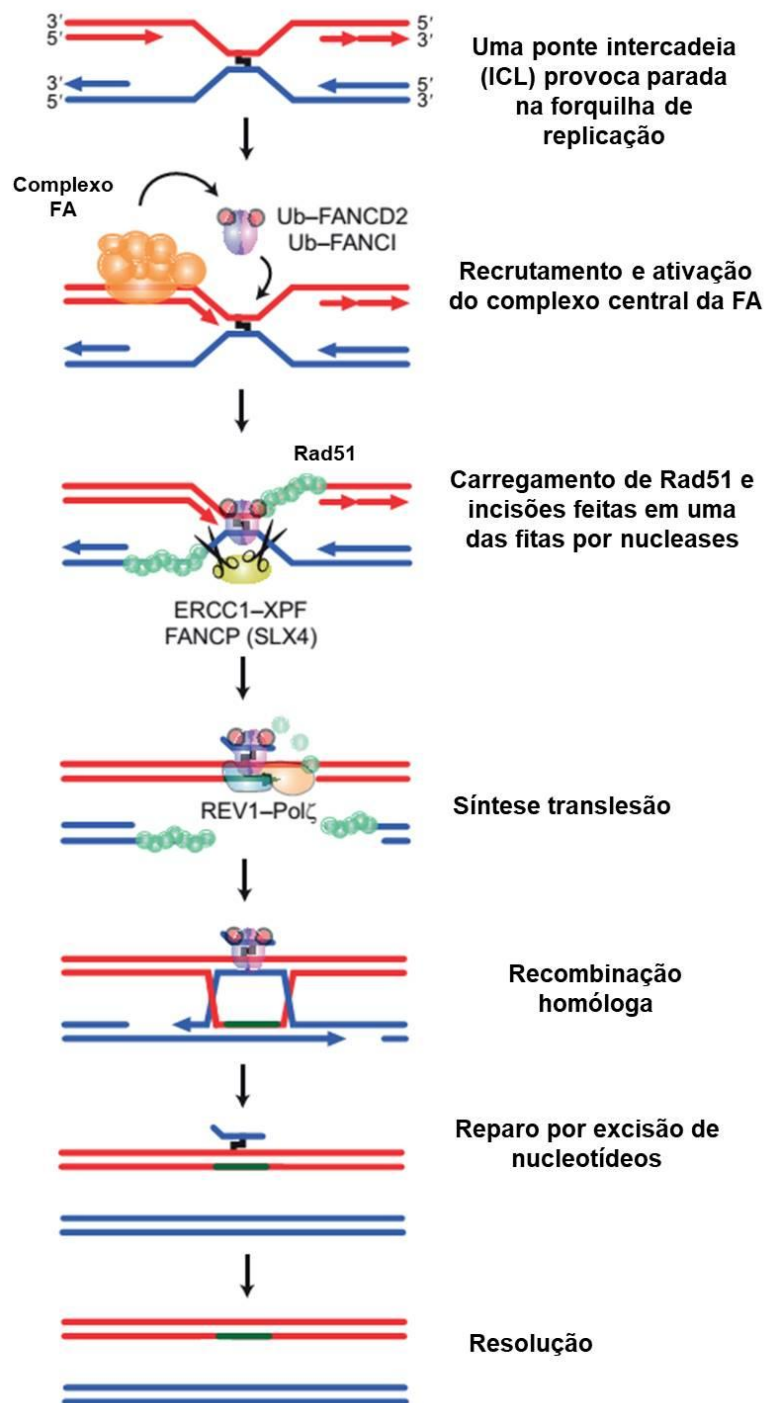


**Figura 7. Reparo por recombinação homóloga.** Na presença de uma DSB, o reparo por HR inicia-se com a ressecção das extremidades gerando regiões de fita simples, processo que envolve o complexo MRN. Para evitar a formação de estruturas secundárias nas regiões de fita simples a RPA é recrutada e liga-se rapidamente nestas extremidades. Em seguida, ocorre a substituição de RPA pela Rad51, que forma um filamento ativo capaz de procurar pela região de homologia. A procura por homologia é facilitada por Rad54 e Ino80. A invasão na fita não danificada promove a formação de uma estrutura transitente conhecida como alça-D (D-loop) na qual a extremidade 3'OH da fita invasora serve como *primer* para que a maquinaria de replicação do DNA realize a cópia da informação faltante. A alça-D também é necessária para a formação de estruturas de fitas cruzadas conhecidas como junções de Holliday. Após a restauração da fita

danificada pela DNA polimerase e da ligação final do DNA, ocorre a resolução das junções de Holliday, processo que pode ocorrer em diferentes direções e resultar ou não em *crossing-over*. Adaptado de Khanna and Shilof (2009).

#### 1.1.5.5 A Via da Anemia de Fanconi – FA

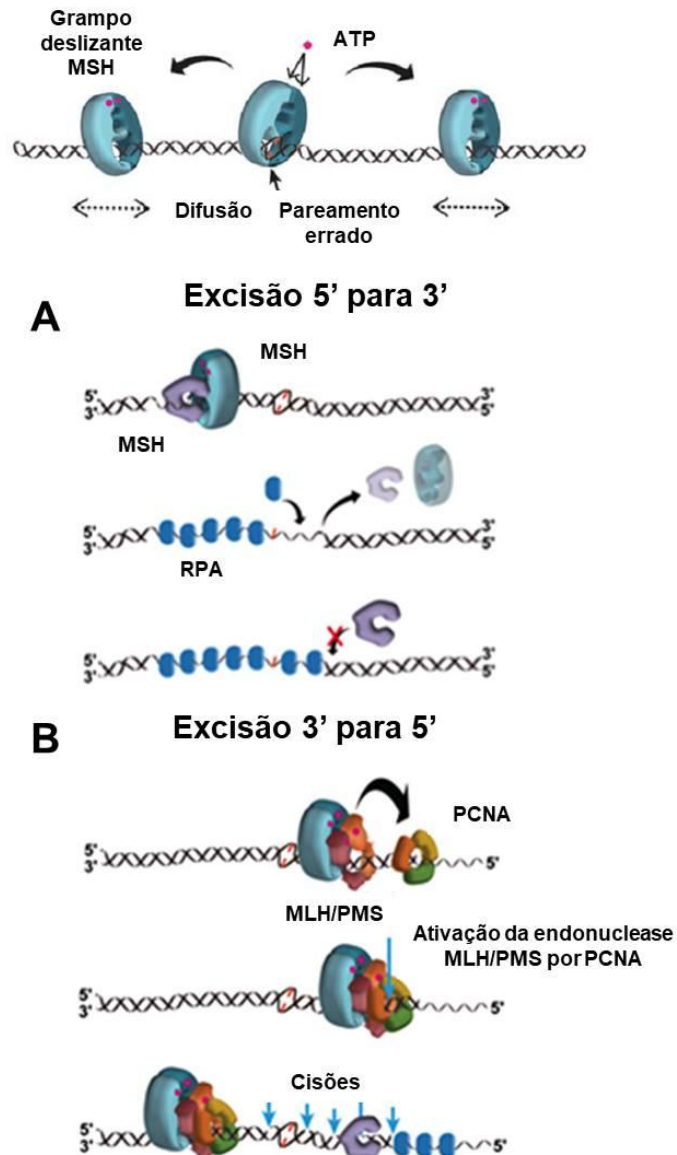
A anemia de Fanconi é uma doença hereditária caracterizada por instabilidade genômica e associada à deficiência no reparo de ICLs. A via da FA pode ser ativada tanto por dano no DNA como por parada na forquilha de replicação e é responsável pela ativação da DDR nos casos de ICLs (Nalepa and Clapp 2018). Existe ainda um papel da via FA na escolha entre NHEJ e HR no reparo de DSBs. Isto ocorre porque DSBs podem ser geradas no reparo de ICLs e caso ocorra um NHEJ inapropriado no lugar de HR, formam-se intermediários tóxicos que podem levar à morte celular. Além disso, acredita-se que a via de FA tenha um papel na ressecção de extremidades 5' em uma DSB, etapa decisiva na escolha entre HR e NHEJ, o que auxiliaria então na escolha pelo HR (Hanaoka and Sugawara 2016). Na presença de ICL ocorre o recrutamento do complexo central de FA (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM) que direciona a atividade de E3 ubiquitina ligase da FANCL para monoubiquitar e ativar o complexo de ligação ao DNA formado por FANCD2 (Fanconi anemia group 2 protein) e FANCI. Este complexo FANCD2-FANCI orchestra os eventos à jusante (downstream) da via FA para solucionar a ICL (Sale 2012; Sumpter and Levine 2017). O reparo prossegue com duas incisões feitas em uma das fitas do DNA por nucleases como SLX4 (Synthetic Lethal of unknown (X) function - 4) e ERCC1-XPF. Ocorre também o carregamento de proteínas Rad51 no DNA de fita simples para favorecer o reparo por HR. No caso de reparo dependente da replicação, ocorre a colaboração das vias do NER e da TLS (Douwel et al. 2014; **Fig. 8**). A via FA está envolvida no reparo de diversos outros tipos de lesões e suas proteínas podem participar em concerto com outras vias para manter a integridade genômica em caso de estresse genotóxico (Pace et al. 2010).



**Figura 8. Modelo para reparo de ICL dependente de replicação.** Uma ICL provoca parada na forquilha de replicação, levando ao recrutamento do complexo central da FA que por sua vez ativa FANCD2 e FANCI por ubiquitinação. O DNA de fita simples é carregado com Rad51 e ocorre as incisões no local da lesão, processo coordenado pelas nucleases ERCC1-XPF e FANCP (SLX4). A lesão pode ser ultrapassada pelas polimerases da TLS e a quebra pode ser reparada por HR. O remanescente do dano pode ser reparado pela via do NER. Adaptado de Sale (2012).

### 1.1.5.6 Reparo de Pareamentos Errados – MMR (Mismatch Repair)

O MMR é o reparo de pareamentos errados no DNA. Este tipo de lesão pode ocorrer, dentre outros motivos, pela incorporação errônea de nucleotídeos pela DNA polimerase e por danos físicos ou químicos aos nucleotídeos. A taxa de erro das polimerases capazes de revisão (proofreading) é em torno de 1 por milhão de nucleotídeos copiados. Em relação ao MMR, os homólogos de MutS (MSH) e os homólogos de MutL (MLH/PMS) foram altamente conservados no curso da evolução. O exato mecanismo do MMR ainda é debatido, mas acredita-se que se inicia com o carregamento no DNA de vários grampos deslizantes MSH ligados à ATP, que são capazes de se difundir bidirecionalmente (**Fig. 9**). As etapas subsequentes envolvem diferentes proteínas dependendo se a reação de excisão será em direção a 5' ou a 3'. A reação de excisão 3' é mais complexa e ocorre na fita líder na forquilha de replicação. Esta reação requer MSH, MLH/PMS, uma exonuclease (EXO1) e RPA (**Fig. 9A**). A procura por um pareamento errado parece ser auxiliada pelo grampo de processividade grampo- $\beta$ /PCNA (Kunkel and Erie 2015). Além disso, PCNA também se faz necessária para a atividade de endonuclease de MLH/PMS. A reação de excisão em direção a 5' ocorre na fita descontínua em uma forquilha de replicação e requer apenas MSH, EXO1 e RPA (**Fig. 9B**). O preenchimento da lacuna no DNA é feito pela maquinaria de replicação normal (Fishel 2015).

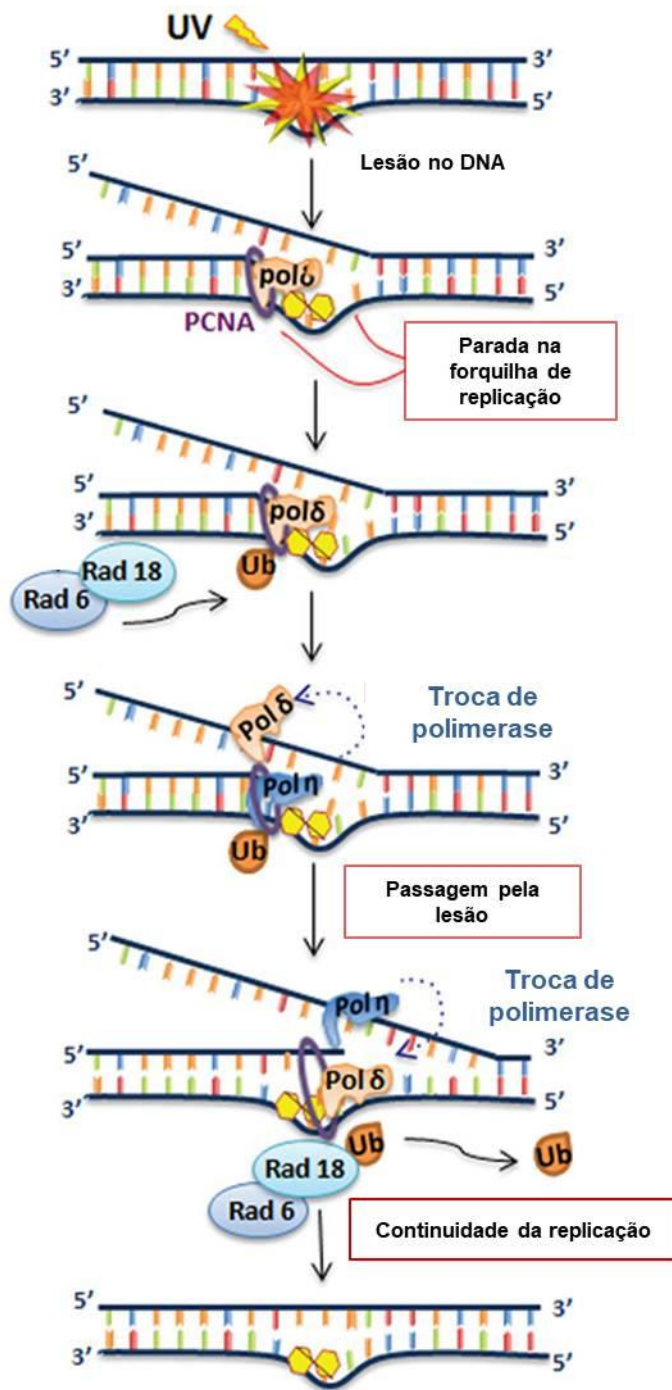


**Figura 9. Modelo de excisão 5' ou 3' em MMR para eucariotos.** Ambos os processos de excisão 5' para 3' ou 3' para 5' iniciam com o carregamento no DNA de grampos deslizando MSH ligados à ATP. **A) Excisão 5'.** Um grampo MSH interage e estabiliza EXO1 no DNA e aumenta sua processividade exonucleásica 5'-3'. Quando o complexo MSH/EXO1 se dissocia espontaneamente, outro grampo MSH pode ser carregado, interagir com EXO1 e reiniciar a atividade de exonuclease. Para que a ação de EXO1 seja impedida na ausência de MSH, as proteínas RPA ligam-se na fita simples. Este processo ocorre até que a segmento de DNA contendo o erro seja eliminado. **B) Excisão 3'.** O grampo MSH, associado com MLH/PMS, difunde-se em direção à PCNA, que se encontra em um local de excisão 3'. O complexo MSH/MLH/PMS/PCNA difunde-se em direção à 5'. A atividade endonucleásica de MLH/PMS leva à introdução de múltiplas cisões que são substrato para EXO1 exonuclease. Este processo ocorre até que o pareamento errado seja eliminado. Adaptado de Fishel (2015).



### 1.1.5.7 Síntese Translesão – TLS

Embora os mecanismos de reparo consigam remover os danos no DNA antes do início da replicação, alguns danos podem persistir na fase S e impedir as polimerases replicativas. Desta forma, surgiram os mecanismos de tolerância ao dano no DNA (DDT) para que o DNA não reparado possa ser copiado, proporcionando a duplicação cromossômica mesmo na presença de lesões. A TLS é um tipo de DDT na qual DNA polimerases especializadas utilizam o DNA danificado como molde e estendem a extremidade 3' além do dano (**Fig. 10**). Como a fidelidade na síntese de DNA por estas polimerases é reduzida em comparação às polimerases replicativas, as polimerases TLS são consideradas como propensas a erro (error-prone) (Korzhnev and Hadden 2016). Aproximadamente metade das polimerases codificadas pelo genoma humano possui a capacidade de ignorar adutos de DNA, tais como Rev1, Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$ , que são membros da família Y e Pol  $\zeta$ , membro da família B de polimerases (Jain et al. 2018). Em eucariotos, os eventos de TLS podem ser dependentes ou não da ubiquitinação do grampo deslizante PCNA. A ubiquitinação adiciona um ponto de ancoragem entre uma polimerase TLS e PCNA para fortalecer esta interação. Acredita-se que a escolha entre PCNA ubiquitinado ou não dependa do tipo de lesão no DNA (Zafar and Eoff 2017).



**Figura 10. Síntese translesão pela Pol η.** O dano no DNA causado por UV leva à parada na forquilha de replicação. Para que a replicação possa proceder mesmo na presença do dano, ocorre uma troca de polimerase. O grampo PCNA é monoubiquitinado por Rad6 e Rad18, o que estabiliza as Pols TLS na forquilha. Neste exemplo, ocorre a troca da Pol δ pela Pol η que pode ser revertida após a passagem pela lesão. Adaptado de Menck and Munford (2014).

### 1.1.6 A Ativação da DDR por Quimioterápicos

Os quimioterápicos compõem uma importante classe de agentes exógenos causadores de danos no DNA. Estes podem ser divididos em diferentes categorias de acordo com o seu mecanismo de ação, tais como, agentes alquilantes, agentes platinados, inibidores de topoisomerase e antimetabólitos (**Tabela 1**).

Os agentes alquilantes, uma das classes mais antigas de fármacos utilizados no tratamento do câncer, são empregados em diversos regimes quimioterápicos e atuam pela transferência covalente de grupos alquil para o DNA ou outras moléculas biológicas. A alquilação frequentemente provoca danos volumosos no DNA que podem ser reparados pela via do NER (Bordin et al. 2013; Woods and Turchi 2013). A temozolomida, principal quimioterápico no tratamento de gliomas, é um exemplo de agente alquilante que causa a metilação do DNA, gerando produtos como a O<sup>6</sup>-metilguanina que pode ser revertida pela enzima metilguanina metiltransferase (MGMT). A O<sup>6</sup>-metilguanina possui alto potencial citotóxico, pois pareia-se erroneamente com uma guanina ou uma timina na fase S e tentativas fúteis da maquinaria do MMR para reparar o dano resultam na formação de DSB. (Goldstein and Kastan 2015).

Os agentes platinados são conhecidos como agentes alquilantes-*like*, pois seu mecanismo de ação se dá não pela transferência de um grupo alquil, mas de um grupo platina para o DNA. A oxaliplatina é um agente de terceira geração da platina utilizado no tratamento do câncer colorretal cuja toxicidade é caracterizada pela formação de pontes intercadeia (ICL) e, principalmente, intracadeia. Enquanto o reparo de pontes intracadeia pode ser feito pelo NER, o reparo de ICLs envolve a via da FA, que pode utilizar partes do NER, da HR e da TLS (Munari et al. 2013; Riddell and Lippard 2018).

Os inibidores de topoisomerase interferem na função das enzimas topoisomerasas. Estas enzimas, TOP I e TOP II, são responsáveis por impedir a

torção excessiva no DNA através da quebra transiente em uma ou nas duas fitas do DNA, respectivamente. Os inibidores de topoisomerase bloqueiam a religação final do DNA pelas topoisomerases após as etapas de clivagem e relaxamento (Cheung-Ong et al. 2013). Os inibidores de TOP I, como o topotecan e a camptotecina, levam ao acúmulo de quebras de fita simples (SSBs) que podem ser reparadas pela maquinaria do BER e pelo complexo tirosil-DNA-fosfodiesterase 1 (Tdp1). As SSBs podem levar à parada na forquilha de replicação em fase S com conseqüente surgimento de DSBs. Estas podem ser reparadas por recombinação homóloga. Os inibidores de TOP II, como a doxorubicina e o etoposídeo, causam um acúmulo de DSBs sem a necessidade da replicação levando à rápida ativação da DDR (Pommier 2014; Montecucco et al. 2015).

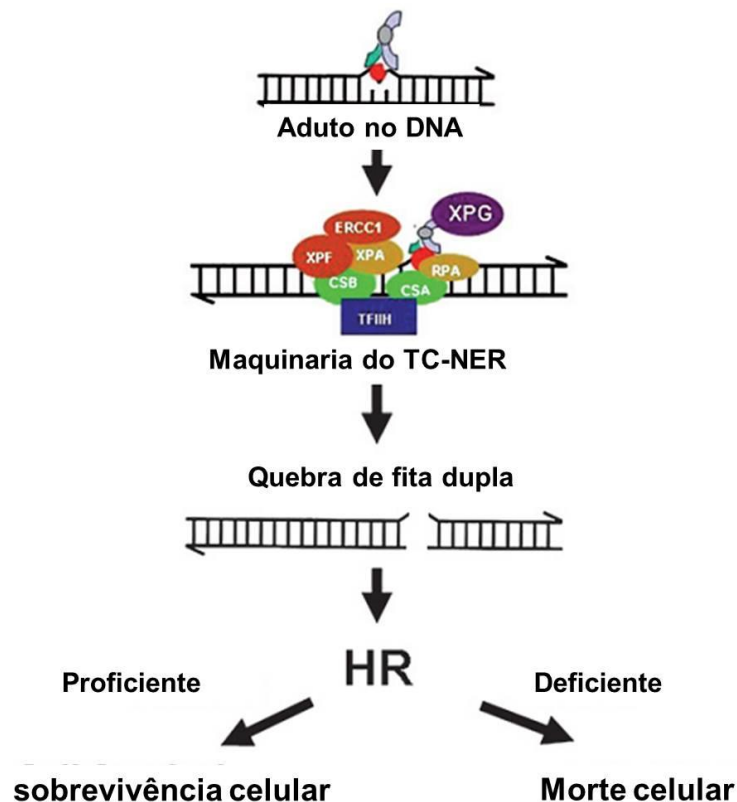
Os quimioterápicos antimetabólitos são fármacos que mimetizam moléculas celulares e interferem com a replicação do DNA. São geralmente antagonistas de DNA e interferem no metabolismo dos nucleotídeos (Tiwari 2012; Penna et al. 2017). Os análogos de purinas, como fludarabina, e os análogos de pirimidina, como 5-fluorouracil (5-FU) e gemcitabina, são incorporados no DNA na fase S e impedem sua replicação adequada. Outros antimetabólitos podem bloquear a síntese de nucleotídeos pela inibição de enzimas que participam da síntese de DNA, como pemetrexed, metotrexato e aminopterina, que inibem a enzima diidrofolato redutase (Cheung-Ong et al. 2013).

<b>Agente quimioterápico</b>	<b>Indicação</b>	<b>Principais mecanismos de ação</b>	<b>Principais vias de reparo envolvidas</b>	
<b>Agentes alquilantes</b>	Temozolomida	Glioblastoma, glioma, gliosarcoma, astrocitoma anaplásico, melanoma	O <sup>6</sup> -metilguanina	MGMT/ BER (Goldstein and Kastan 2015)
	Ciclofosfamida	Vários tipos de linfomas e leucemias, retinoblastoma, câncer de mama, testicular, ovário, pulmão, endometrial	ICL	FA/ NER/ HR/ TS (Puigvert et al. 2016)
	Trabectedina	Câncer recidivo de ovário sensível à platina, sarcoma de tecidos moles	Aduto, SSB, DSB	TC-NER/ HR (Soares et al. 2007)
<b>Agentes platinados</b>	Oxaliplatina	Câncer colorretal	Ponte intracadeia e ICL	FA/ NER/ HR/ TS (Riddell and Lippard 2018)
	Cisplatina	Câncer de pulmão, ovário, testicular, mama, cervical, estômago, próstata, cabeça e pescoço	Ponte intracadeia e ICL	FA/ NER/ HR/ TS (Riddell and Lippard 2018)
	Carboplatina	Câncer de pulmão, ovário, mama, esôfago, cabeça e pescoço, pulmão	Ponte intracadeia e ICL	FA/ NER/ HR/ TS (Cheung-Ong et al. 2013)
<b>Antimetabólitos</b>	5-Fluorouracil	Câncer colorretal	Análogo de pirimidina	BER/ MMR (Wyatt and Iii 2009)
	Metotrexato	Leucemia linfoblástica aguda	Inibidor da diidrofolato redutase (inibe a síntese de DNA)	BER/ MMR (Xie et al. 2016)
<b>Inibidores de topoisomerase</b>	Camptotecina	Câncer de Mama, ovário, renal, estômago	Inibidor de topoisomerase I	BER/ TdP1/ HR (Cheung-Ong et al. 2013)
	Etoposídeo	Câncer de pulmão de células pequenas, testicular, tumores endócrinos, osteosarcomas, sarcoma de Kaposi,	Inibidor de toisomerase II	NHEJ (Montecucco et al. 2015)
	Doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama metastático, ovário, mieloma	Inibidor de toisomerase II, agente intercalante, ICL	FA/ HR/ NER (Saffi et al. 2010)

**Tabela 1. Agentes quimioterápicos causam diferentes tipos de lesões que ativam diferentes mecanismos de reparo**

### 1.1.6.1 As Ecteinascidinas

As ecteinascidinas são compostos com potencial quimioterápico que apresentam um mecanismo de ação mais complexo quando comparadas às outras classes de fármacos. As ecteinascidinas contêm duas ou três subunidades de tetra-hidroisoquinolina e são produtos naturais derivados de tunicados marinhos (Le et al. 2016). O primeiro composto desta família aprovado para o tratamento do câncer foi a trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>, ET-743), que possui uma metade capaz de interagir diretamente com o DNA e outra metade capaz de se ligar a proteínas específicas envolvidas na transcrição e no reparo, o que confere ao fármaco a habilidade de atuar nas células tumorais e no microambiente tumoral (Ray-Coquard 2017). Enquanto outros agentes alquilantes exercem melhor a sua função nas células de câncer quando o via do NER está deficiente, a trabectedina atua de maneira mais eficaz com a via do NER proficiente. Seu mecanismo ação se inicia com a alquilação de uma guanina na posição N2 formando um aduto no DNA. Os adutos causam a parada da RNA polimerase II durante a transcrição e competem com certos fatores de transcrição, o que leva ao bloqueio da expressão gênica. Na presença do aduto, a maquinaria do TC-NER é recrutada e, na tentativa de corrigir o dano, induz a formação de SSBs na fita oposta à da alquilação. Como a trabectedina forma um complexo ternário XPG-DNA-trabectedina, estas SSBs tornam-se irreversíveis e são transformadas em DSBs que podem ser reconhecidas e reparadas pelo reparo por HR (**Fig. 11**). Assim, células deficientes no reparo por HR ficam mais sensíveis ao tratamento (Soares et al. 2007; Larsen et al. 2016). Outro composto bastante promissor é o PM01183 (Lurbinectedina), um agente derivado da trabectedina. Apesar das similaridades funcionais com a trabectedina, lurbinectedina é ainda mais eficaz no tratamento de tumores, pois possui uma diferença estrutural que confere benefícios farmacodinâmicos e farmacocinéticos, o que diminui sua toxicidade e permite regimes com doses mais intensas (Soares et al. 2011; Takahashi et al. 2016).



**Figura 11. Mecanismo de ação proposto para a trabectedina.** A trabectedina alquila uma guanina formando um aduto no DNA. Na presença do aduto, a maquinaria do TC-NER é recrutada e, na tentativa de corrigir o dano, induz a formação de SSBs na fita oposta à da alquilação. Como a trabectedina forma um complexo ternário XPG-DNA-trabectedina, estas SSBs tornam-se irreversíveis e são transformadas em DSBs que podem ser reconhecidas e reparadas pelo reparo por HR. Em células deficientes para HR ocorre uma maior sensibilização ao fármaco. Adaptado de Cuevas (2009).

## 1.1.7 Modulação da DDR no Tratamento do Câncer

### 1.1.7.1 O Princípio da Letalidade Sintética e os Inibidores de PARP

Nos últimos anos, muitos estudos têm sugerido a modulação da DDR como estratégia promissora no combate de tumores. Pelo menos 450 genes relacionados à DDR poderiam ser modulados para a otimização da terapia (Pearl et al. 2015). Os moduladores da DDR podem ser empregados na forma de monoterapia ou em regimes de tratamento combinados com agentes que causam dano no DNA. Em tumores com deficiência ou perda em alguma função

específica da DDR, característica presente em quase todos os tipos de tumores, os moduladores ampliam a janela de tratamentos disponíveis para o paciente. Neste caso, em que as células cancerosas tornam-se dependentes das vias remanescentes da DDR para lidar com o dano ao DNA, pode ser usado o princípio da letalidade sintética, no qual um agente tem como alvo a via remanescente que está compensando a falta da via principal (Basu et al. 2012). Um dos primeiros exemplos foi a aprovação regulatória do Olaparib no tratamento de câncer de ovário em 2014 e câncer de mama em 2018 (Desai et al. 2018). Olaparib é um inibidor de PARP (poli (ADP ribose) polimerase), fator essencial no reparo de quebras de fita simples, especialmente via NER. Em células de câncer com perda de função em BRCA1 ou BRCA2, nas quais as DSBs não podem ser reparadas pela via da HR e dependem da via NER, o tratamento com o inibidor de PARP mostrou-se eficaz. Além disso, na presença do inibidor, PARP fica ligada em uma região de SSB formando um complexo PARP-DNA que pode levar ao colapso de forquilhas de replicação e resultar em DSBs deletérias (Puigvert et al. 2016).

#### **1.1.7.2 Inibidores das Vias de ATM-Chk2 e ATR-Chk1**

Outro exemplo atrativo no que diz respeito à modulação da DDR é a combinação de quimioterápicos com inibidores das cinases responsáveis pela transdução de sinal de dano. As vias de ATM-Chk2 e ATR-Chk1, como mencionado, são as principais envolvidas na sinalização de dano e na parada do ciclo celular para promover o reparo e a sobrevivência da célula ou, em caso de dano irreparável, a morte celular. Dois dos primeiros inibidores de ATM descritos, a cafeína e a wortmanina, são capazes de sensibilizar células de tumores a agentes causadores de DSBs e à irradiação, porém de maneira muito tóxica *in vivo* e pouco potente (Blasina et al. 1999). Além disso, são muito inespecíficos e podem também inibir as cinases ATR, DNA-PK e mTOR (mammalian target of rapamycin). Vários inibidores mais específicos têm sido desenvolvidos, como os inibidores ATP-competitivos KU-55933 e sua versão melhorada em relação à farmacocinética e à biodisponibilidade, KU-60019. Outra molécula desta classe de



compostos, KU-59403, mostrou ainda melhor biodisponibilidade e solubilidade. Entretanto, o único inibidor de ATM atualmente em testes clínicos de fase I é a molécula AZD0156 (Batey et al. 2013; Carrassa and Damia 2017).

Como regra geral, o checkpoint G1 está desregulado em células de câncer devido a mutações nas vias de TP53, o que leva à dependência pelo checkpoint S/G2 para a sobrevivência celular após dano ao DNA (Riley et al. 2008). Neste caso, a inibição da via de ATR-Chk1 pode auxiliar na sensibilização das células e aumentar a atividade citotóxica de vários agentes causadores de dano. Para ATR, o desenvolvimento de inibidores específicos é dificultado pelo alto grau de homologia no domínio de cinase da ATR com outras PIKK. Os primeiros inibidores específicos descritos foram VE-821 e seu análogo mais recente, VE-822 (VX-970 ou M6620) (Weber and Ryan 2015). Estes são capazes de sensibilizar as células à irradiação e ao tratamento com vários quimioterápicos. VE-822 e outro inibidor de ATR, AZD6738, estão atualmente em testes clínicos de fases I e II (Kim et al. 2017).

Inibidores de Chk1 também têm sido desenvolvidos. Recentemente, foi relatado que células tumorais deficientes no reparo por HR podem ser sensibilizadas pelo tratamento com inibidores de Chk1 e que estes inibidores apresentam atividade sinérgica com inibidores de PARP. Alguns dos inibidores de Chk1 em fase clínica são MK8776, bem tolerado em testes clínicos em combinação com quimioterápicos, irradiação ou como monoterapia, e prexaceritib (LY2606368), segunda geração de LY2603618 e atualmente em testes clínicos de fases I e II (Carrassa and Damia 2017). Inibidores da cinase Wee1 também têm sido desenvolvidos. Da mesma forma que Chk1, Wee1 também está envolvida na ativação de checkpoints pela regulação da atividade das CDKs nas fases S e G1 e é requerida para a manutenção da integridade genômica na replicação. A molécula MK-1775, renomeada AZD-1775, é atualmente o inibidor mais potente e específico de Wee1, capaz de aumentar o efeito citotóxico de vários agentes causadores de dano tanto *in vitro* como *in vivo* (Do et al. 2013; Chaudhuri et al. 2014).

### **1.1.7.3 Inibidores das Vias de Reparo**

Esforços têm sido feitos na tentativa de desenvolver e testar compostos que possam modular as vias de reparo. A metoxiamina (MX ou TCR102) forma ligações covalentes com os sítios AP, levando ao bloqueio da atividade de APE1 e da continuidade da via BER (Desai et al. 2018). Esta molécula está em estudos clínicos em combinação com pemetrexed e tomazolomida devido à sua capacidade de aumentar o potencial citotóxico destes quimioterápicos. Em relação à via NHEJ, inibidores de DNA-PK estão sendo testados, como as moléculas MSC2490484A e VX984, e inibidores de Ku70 e Ku80 estão em desenvolvimento (Gavande et al. 2016). Proteínas envolvidas no reparo por HR também podem servir como alvo de inibidores. Uma das mais promissoras é Rad51 devido ao seu papel central nesta via de reparo e pelo fato de sua expressão estar aumentada em muitos casos de tumores. O composto RS-1 explora a superexpressão de Rad51 e estimula a formação de complexos de Rad51 tóxicos na cromatina não danificada, principalmente em células tumorais em comparação a células normais (Mason et al. 2015). B02 é um composto que tem sido empregado em outro tipo de estratégia, na qual Rad51 é impedido de se ligar no ssDNA, e tem se mostrado eficaz na sensibilização ao tratamento com vários agentes como radiação ionizante, cisplatina e mitomicina C (Alagpulinsa et al. 2014).

Muitos estudos ainda são necessários para entender o efeito em longo prazo dos inibidores da DRR em pacientes, porém, este tipo de modulação continua a ser uma das estratégias mais importantes no combate a células cancerosas.

## **1.2 A Via Autofágica**

A autofagia é um processo catabólico de degradação de componentes celulares que resulta na liberação e reciclagem de nutrientes. A autofagia pode ser categorizada em três vias principais: microautofagia, autofagia mediada por

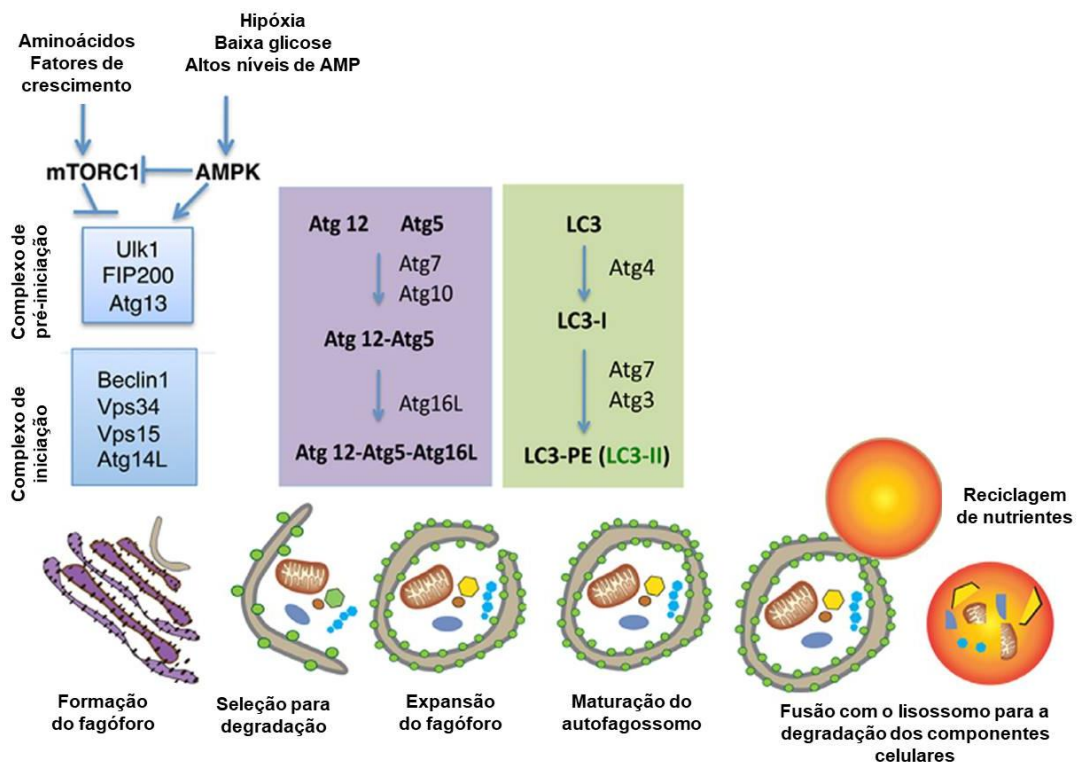
chaperonas e macroautofagia (Ravikumar et al. 2010). Na microautofagia uma pequena porção do citoplasma é entregue diretamente ao lisossomo para ser degradada através de uma invaginação na membrana lisossomal. Na autofagia mediada por chaperonas ocorre o transporte direto de componentes citoplasmáticos pela parede dos lisossomos via proteínas chaperonas. Na macroautofagia (referida a partir deste ponto como autofagia) organelas danificadas e outros elementos a serem degradados são envolvidos em uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo. Esta vesícula funde-se então com o lisossomo, que contém as enzimas responsáveis pela digestão de seu conteúdo (Wilde et al. 2018).

### **1.2.1 Maquinaria Molecular da Autofagia**

Na maquinaria molecular da autofagia a proteína mTOR é um importante sensor do estado energético da célula. Ao associar-se com outras proteínas, forma o complexo mTORC1 que é inibido em situações de escassez de nutrientes, o que leva à ativação da autofagia. Quando os níveis de ATP estão baixos, por exemplo, mTORC1 é inibido pela proteína cinase dependente de AMP (AMPK) (Mowers et al. 2018). A inibição de mTORC1 por sua vez previne a fosforilação inibitória de Ulk1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1), que fica livre para ser fosforilada por AMPK em sítios ativadores. A presença das proteínas Atg, codificadas por genes ATG (autophagy related genes), é essencial nas etapas subsequentes. Ulk1 ativada fosforila Atg13 e FIP200 (Fak family interacting protein of 200kDa) e forma um complexo de pré-iniciação com estes fatores que é crucial para o início da formação do fagóforo, uma estrutura de membrana que dá origem ao autofagossomo (Das et al. 2018).

A formação do fagóforo também é regulada pelo complexo de iniciação formado por Beclina-1, Atg14L, VPS15 e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) de classe III, também conhecido como VPS34. O alongamento do autofagossomo requer dois sistemas de conjugação ubiquitina-*like*. No primeiro, Atg12 e Atg5 são conjugadas por Atg7 e Atg10. Atg5-Atg12 forma um complexo com Atg16L que

participa no alongamento da membrana autofágica (Choi et al. 2013). O segundo sistema de conjugação requer a proteína LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), um importante marcador nos estudos de autofagia. Na presença de um sinal autofágico a forma precursora de LC3 é clivada por Atg4 para formar LC3-I. Em uma etapa chave na formação do autofagossomo, LC3-I é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) pela ação de Atg7 e Atg3 e é convertida em LC3-II (Fig. 12). Esta se localiza tanto na membrana externa quanto na membrana interna do autofagossomo e está envolvida nas etapas finais de fusão de membrana e na localização de alvos a serem degradados (Wilde et al. 2018). LC3 também está envolvida no processo de degradação seletiva da proteína sequestossomo 1 (p62/SQSTM 1). Neste contexto, p62 é um efetor e um substrato para a autofagia. p62 interage com o material celular a ser degradado e interage com LC3 para se ligar à membrana do autofagossomo, o que faz com que ela também seja degradada pelo sistema lisossomal (Islam et al. 2018).



**Figura 12. Maquinaria molecular da autofagia.** A deprivação de nutrientes induz AMPK e suprime a atividade de mTORC1. Ocorre então a ativação da atividade de cinase de Ulk1 como

parte do complexo de pré-iniciação (Ulk1/FIP200/Atg13) que por sua vez induz a atividade de cinase do complexo de iniciação (Bleclina1/VPS34 e proteínas associadas). Este complexo recruta o complexo de conjugação Atg12/Atg5/Atg16L que promove o processamento e inserção de LC3 nas membranas do fagóforo. Na presença de sinal autofágico, a forma precursora de LC3 é clivada por Atg4 para formar LC3-I, que por sua vez é conjugada com PE e convertida em LC3-II pela ação de Atg7 e Atg3. A fusão do autofagossomo com o lisossomo resulta na degradação proteolítica com liberação dos nutrientes reciclados. Adaptado de Mowers et al. (2018).

### **1.2.2 Autofagia como Alvo Terapêutico no Combate ao Câncer**

A autofagia pode ser ativada por diversos estressores, como a privação de nutrientes, estresse oxidativo, infecções e dano ao DNA, entretanto, o papel da autofagia na presença destes estressores ainda é bastante controverso no que diz respeito à morte ou à sobrevivência da célula. Defeitos relacionados à autofagia têm sido associados à instabilidade genômica e à susceptibilidade ao surgimento de tumores. Contudo, sugere-se que o papel da autofagia no câncer é contexto-dependente, pois a ativação da via pode tanto inibir como promover a tumorigênese (Ding et al. 2011; Filippi-Chiela et al. 2011). Em células normais, a autofagia exerce um papel citoprotetor, pois remove organelas danificadas, ERO e proteínas mal-dobradas, limitando possíveis danos genômicos e protegendo contra o surgimento de mutações que levam ao câncer. Por outro lado, em tumores estabelecidos a autofagia aumenta a tolerância ao estresse por fornecer nutrientes que suprimem as altas demandas por energia (Singh et al. 2017). Por este motivo, muitos estudos têm demonstrado que a inibição da autofagia, seja farmacológica ou pelo uso do silenciamento gênico, pode sensibilizar células de câncer e levar à morte por apoptose. Todavia, em vários casos o aumento no fluxo autofágico também pode sensibilizar as células de tumor e levar à morte celular programada tipo II (morte celular com características autofágicas), o que aponta para a natureza contexto-dependente da autofagia (Shimizu et al. 2014; Bhat et al. 2018). É importante mencionar que ainda existe uma controvérsia em relação a este assunto, pois é possível que a autofagia não seja um tipo de morte celular, mas apenas uma característica frequente em células que estão em processo de morte (Bishop and Bradshaw 2018).

No contexto do microambiente de tumores sólidos, a ativação de autofagia é capaz de modular o desenvolvimento do tumor, a metástase e a resistência à terapia (Yang et al. 2015). O microambiente tumoral é um sistema complexo composto por várias células estromais, incluindo fibroblastos, células-tronco mesenquimais, células do sistema imune (linfócitos, macrófagos), adipócitos e citocinas (Ngabire and Kim 2017). Em relação ao perfil fisiológico, o microambiente é caracterizado por apresentar baixos níveis de oxigênio, privação de nutrientes, acidez e inflamação, diferindo consideravelmente dos tecidos normais. A privação de nutrientes é o principal indutor fisiológico de autofagia. A depleção de glicose, por exemplo, ativa a autofagia por estresse oxidativo e por diminuição dos níveis de ATP. Estas características levam à ativação da via autofágica para que a células do tumor sobrevivam ao estresse metabólico e para a manutenção da homeostase (Monkkonen and Debnath 2018).

A autofagia pode ser ativada em células tumorais quando tratadas com quimioterápicos, o que pode contribuir para o surgimento da resistência ao fármaco. Isto ocorre devido à comunicação entre a via autofágica e a via da DDR (Vessoni et al. 2013). Na presença de DSBs, por exemplo, ATM reconhece o dano e ativa AMPK que por sua vez remove o efeito inibitório de mTORC1 na autofagia. A proteína PARP1, ativada na presença de danos causados por agentes alquilantes, também está envolvida nesta interação entre autofagia e DDR. Quando ativada, PARP1 está associada a uma redução nos níveis de ATP, o que leva à ativação de AMPK com consequente indução da autofagia (Eliopoulos et al. 2016). Além disso, a autofagia também pode influenciar nos mecanismos de reparo por sustentar os níveis de ATP que são necessários para a atividade destas vias, regular os níveis de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) e controlar as dinâmicas do reparo através da degradação de proteínas regulatórias (Gomes et al. 2016).

Por ser um alvo terapêutico atrativo, diversos grupos de pesquisa têm investido na procura por moduladores de autofagia eficazes que possam ser

utilizados em regimes de tratamento de tumores. A modulação da autofagia pode ser feita tanto por inibidores quanto por ativadores da via. Em relação aos inibidores farmacológicos, estes podem inibir o início da via, a nucleação do fagóforo ou a etapa de fusão do autofagossomo com o lisossomo. Dentre os inibidores mais conhecidos estão a cloroquina (CQ) e seu derivado hidroxicloroquina (HCQ), fármacos utilizados há décadas para o tratamento da malária (Janji et al. 2018). CQ inibe a autofagia por bloquear a fusão do autofagossomo com o lisossomo (lisossomotrópico) e tem sido empregada em diversos estudos pré-clínicos e clínicos como monoterapia ou combinada com outros fármacos. No entanto, a resposta clínica a estes inibidores é variável e em alguns destes estudos nenhum benefício clínico foi observado. Além disso, CQ e HCQ não são inibidores seletivos da autofagia e sua toxicidade pode ser devida a outros mecanismos de ação, como a alteração no pH do tumor, o que afeta a biodisponibilidade de outros fármacos (Pellegrini et al. 2014). Indutores de autofagia também podem ser utilizados no tratamento de tumores como o inibidor de mTOR rapamicina (sirolimus) e seus análogos (rapálogos) everolimus, temsirolimus e deforolimus. Como mTOR está envolvida em outros mecanismos além da autofagia como as vias de proliferação, síntese proteica e metabolismo, a interpretação de resultados decorrentes do tratamento com estes fármacos deve ser feita com cautela (Byun et al. 2017).

Apesar de ser uma ideia promissora, a modulação da autofagia deve ser planejada levando-se em consideração o fato de que a via autofágica também tem um papel importante na resposta celular imune. A autofagia inibida pode bloquear o recrutamento dependente de ATP de células do sistema imune e interferir no processo de apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Ma et al. 2013). Desta forma, ao cogitarmos a modulação da autofagia para fins terapêuticos, torna-se importante considerar uma modulação no contexto do microambiente tumoral e não só a nível celular (Gewirtz et al. 2018). Este papel controverso da autofagia no microambiente tumoral ainda é bastante debatido e mais estudos são necessários para que se

possa ponderar em quais casos a inibição ou a ativação da via podem trazer benefícios ao paciente.



---

## ***OBJETIVOS***

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral desta tese foi avaliar o efeito de moduladores da via de resposta de dano ao DNA (DDR) e da via autofágica, em células tumorais humanas quando expostas ao tratamento com quimioterápicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar a ativação da DDR pelos fármacos trabectedina (Yondelis®) e lurbinectedina (PM01183) em células de câncer cervical HeLa.
- Determinar a citotoxicidade após o tratamento com trabectedina e lurbinectedina em combinação com inibidores farmacológicos das vias de ATM-Chk2 e ATR-Chk1 em células HeLa e em células de câncer de ovário IGROV1 e A2780.
- Avaliar o efeito da inibição farmacológica dual de ATM e ATR sobre o início da DDR em células HeLa tratadas com trabectedina e lurbinectedina.
- Apontar o efeito da inibição farmacológica dual de ATM e ATR sobre o reparo por recombinação homóloga em células HeLa tratadas com trabectedina e lurbinectedina.
- Determinar o índice mitótico e a presença de danos cromossômicos em células HeLa tratadas com trabectedina e lurbinectedina na presença de ambos os inibidores de ATM e ATR.
- Verificar o efeito do tratamento com oxaliplatina em condição de baixa disponibilidade de glicose na viabilidade e na ativação de autofagia em células de câncer colorretal HCT-116.

- Determinar se a ativação de autofagia pela oxaliplatina em baixa glicose ocorre por uma redução na atividade de mTOR e um aumento na atividade da cinase AMPK.
- Avaliar os efeitos da inibição da via autofágica por silenciamento do gene ATG7 na linhagem HCT-116 na presença de oxaliplatina em condições de baixa glicose.
- Avaliar o efeito da modulação farmacológica da autofagia em células HCT-116 na presença de oxaliplatina em condições de baixa glicose.

---

# ***CAPÍTULO I***

---

### **3 CAPÍTULO I - *Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair***

#### **APRESENTAÇÃO**

Neste capítulo está apresentado um artigo científico que trata sobre a modulação da resposta de dano ao DNA em células tratadas com ecteinascidinas. O artigo detalha os efeitos da combinação de trabectedina ou lurbinectedina com inibidores das vias de ATM-Chk2 e ATR-Chk1, em células de câncer cervical e câncer de ovário. De maneira interessante, foi demonstrado que existe uma necessidade de inibição dual de ATM e ATR para que as células sejam sensibilizadas pelas ecteinascidinas. O artigo ainda relata que somente a inibição dual de ATM e ATR promove o bloqueio do início da DDR e do reparo por recombinação homóloga em células de câncer cervical.

As atividades experimentais deste projeto foram desenvolvidas durante o estágio sanduíche no laboratório *Cancer Biology and Therapeutics*, localizado no *Centre de Recherche Saint-Antoine*, INSERM – UPMC (Paris, França). O artigo apresentado está publicado na revista *Oncotarget*.

## Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair

Michelle Lima<sup>1,2,\*</sup>, Hana Bouzid<sup>1,\*</sup>, Daniele G. Soares<sup>1,3</sup>, Frédéric Selle<sup>3</sup>, Claire Morel<sup>1</sup>, Carlos M. Galmarini<sup>4</sup>, João A. P. Henriques<sup>2,5</sup>, Annette K. Larsen<sup>1</sup>, Alexandre E. Escargueil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 938, Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universités, Paris, France

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Medical Oncology Department, Hospital Tenon, Public Assistance Hospitals of Paris (AP-HP), Alliance Pour la Recherche en Cancérologie (APREC), Paris, France

<sup>4</sup>Cell Biology Department, PharmaMar, Polígono Industrial La Mina, Avda. de los Reyes, Colmenar Viejo, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

\*These authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** Alexandre E. Escargueil, **e-mail:** Alexandre.Escargueil@inserm.fr

**Keywords:** DNA double strand breaks, DNA alkylators, DNA replication, homologous recombination, checkpoint abrogators

**Received:** November 29, 2015

**Accepted:** March 04, 2016

**Published:** March 23, 2016

### ABSTRACT

Trabectedin (Yondelis®, ecteinascidin-743, ET-743) is a marine-derived natural product approved for treatment of advanced soft tissue sarcoma and relapsed platinum-sensitive ovarian cancer. Lurbinectedin is a novel anticancer agent structurally related to trabectedin. Both ecteinascidins generate DNA double-strand breaks that are processed through homologous recombination repair (HRR), thereby rendering HRR-deficient cells particularly sensitive. We here characterize the DNA damage response (DDR) to trabectedin and lurbinectedin in HeLa cells. Our results show that both compounds activate the ATM/Chk2 (ataxia-telangiectasia mutated/checkpoint kinase 2) and ATR/Chk1 (ATM and RAD3-related/checkpoint kinase 1) pathways. Interestingly, pharmacological inhibition of Chk1/2, ATR or ATM is not accompanied by any significant improvement of the cytotoxic activity of the ecteinascidins while dual inhibition of ATM and ATR strongly potentiates it. Accordingly, concomitant inhibition of both ATR and ATM is an absolute requirement to efficiently block the formation of  $\gamma$ -H2AX, MDC1, BRCA1 and Rad51 foci following exposure to the ecteinascidins. These results are not restricted to HeLa cells, but are shared by cisplatin-sensitive and -resistant ovarian carcinoma cells. Together, our data identify ATR and ATM as central coordinators of the DDR to ecteinascidins and provide a mechanistic rationale for combining these compounds with ATR and ATM inhibitors.

### INTRODUCTION

Trabectedin (Yondelis®, ecteinascidin-743, ET-743) is a marine-derived natural product that is approved for treatment of patients with advanced soft tissue sarcoma and relapsed platinum-sensitive ovarian cancer [1]. Lurbinectedin (PM01183) is a novel ecteinascidin (ET) derivative in clinical development [2]. Lurbinectedin

is structurally similar to trabectedin except for a tetrahydroisoquinoline present in trabectedin that is replaced by a tetrahydro  $\beta$ -carboline in lurbinectedin [3]. This structural variation is accompanied by important modifications of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in cancer patients although the preclinical activities of lurbinectedin remain close to those observed for trabectedin [4,5].

Due to their original mechanism of action, trabectedin and lurbinectedin are associated with an unusual pattern of sensitivity in DNA repair-deficient cells [1]. Several studies have shown that in contrast to other DNA-targeted anticancer agents, TC-NER-deficient cells are 2 to 10 times more resistant to trabectedin and lurbinectedin [5–10]. It was also shown that homologous recombination repair (HRR), but not Non-Homologous End Joining (NHEJ), is important for trabectedin and lurbinectedin, since HRR-deficient cells were 50 to 100 times more sensitive to these drugs. The lack of HRR was associated with the persistence of unrepaired DSBs during the S phase of the cell cycle and apoptosis [5,11,12]. Importantly, the unique sensitivity of cells deficient in HRR has been confirmed in the clinic [13–15]. Interestingly, although HRR deficiency has proven relevant for both trabectedin and lurbinectedin [5], no strategy has been evaluated to inhibit this repair pathway although it would likely improve the activity of the ecteinascidins (ETs) by mimicking HRR deficiency. Moreover, inhibition of the cell cycle checkpoints that are activated in response to trabectedin might also prove useful in order to increase drug efficacy [16,17].

The major regulators of the DNA damage response (DDR) are two phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (PIKKs), ataxia-telangiectasia mutated (ATM) and ATM and RAD3-related (ATR) [18]. ATM initiates the cellular response to DSBs. ATM is activated through autophosphorylation of the Ser1981 residue and activates the distal transducer kinase, Chk2 [18–20]. The primary function of ATR is to monitor DNA replication and to regulate the repair of damaged replication forks [18,21]. ATR is recruited by the ATR-interacting protein (ATRIP) to regions of replication protein A (RPA)-coated stretches of single-stranded DNA (ssDNA) that are generated by decoupling of helicase and polymerase activities at stalled replication forks [22–24]. Once activated, ATR preferentially phosphorylates the distal kinase, Chk1 [18, 21]. Both ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways converge to inactivate members of the Cdc25 phosphatase family, which drives dividing cells through the cell cycle [25]. In addition to their specific substrates, ATM and ATR also share common ones, like the histone variant H2AX and the 32-kDa subunit of human RPA (RPA32). RPA32 phosphorylation, catalyzed by the PIKKs family as well as CDKs, plays an important role in stabilizing DNA replication forks and in promoting HRR in response to replication arrest [26,27]. RPA32 phosphorylation occurs at the site of damage where it marks the sites of DNA damage or DNA stress [28]. The phosphorylation of the histone variant H2AX leading to the formation of the so-called  $\gamma$ -H2AX might serve as docking sites for DNA damage/repair proteins, including MDC1, 53BP1 and BRCA1, and functions to promote DSB repair and genome stability [25,29,30]. In this process, the binding of MDC1 to H2AX acts as the first step where  $\gamma$ -H2AX-associated MDC1 recruits additional activated ATM,

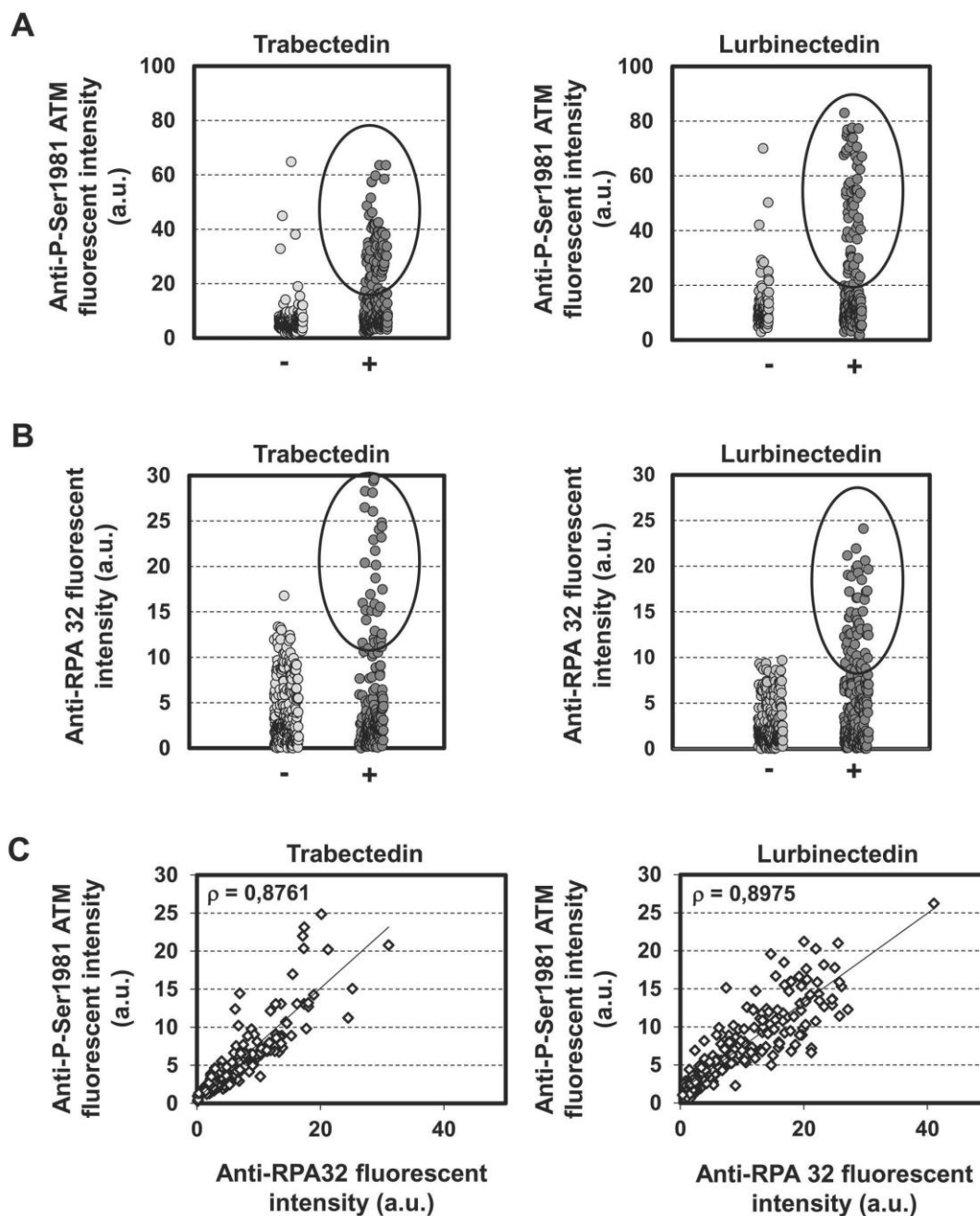
thereby establishing a positive feedback loop leading to  $\gamma$ -H2AX expansion along the DNA [31–33]. Importantly, MDC1 is also involved in ATR-dependent Chk1 activation by promoting accumulation of TopBP1 at stalled replication forks thus facilitating the efficient activation of ATR kinase activity [34]. In addition to recruiting MDC1,  $\gamma$ -H2AX helps recruiting BRCA1, a central constituent of HRR [30,35]. BRCA1 then promotes the recruitment of BRCA2 which in turn favors the recruitment of RAD51 for homologous recombination [35].

In this study, we characterize the DNA damage response to trabectedin and lurbinectedin in HeLa cells. Our results show that both compounds activate the ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways simultaneously which is accompanied by the formation of BRCA1 and Rad51 foci. Interestingly, the pharmacological inhibition of either Chk1/2 (AZD7762), ATR (VE-821, AZ20) or ATM (KU-60019) kinase is not accompanied by any significant increase in the cytotoxicity of trabectedin or lurbinectedin. In contrast, simultaneous inhibition of both ATM and ATR strongly potentiates the activity of the ETs. To explain this phenomenon, we show that concomitant inhibition of both ATR and ATM is an absolute requirement to efficiently block the formation of  $\gamma$ -H2AX, MDC1, BRCA1 and Rad51 foci suggesting a redundant or complementary function of the ATM and ATR pathways in the processing of ET-induced DSBs. Importantly, these results are not restricted to HeLa cells, but can also be extended to cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cell lines. Together, our data identify ATR and ATM as central coordinators of the DDR to trabectedin and lurbinectedin and provide a mechanistic rationale for combinations of these compounds with dual ATR and ATM inhibitors.

## RESULTS

### Trabectedin and lurbinectedin induce both ATM- and ATR-dependent DNA damage response pathways

Previous studies indicate that trabectedin induces replication-dependent DSBs [11]. To identify the key factors needed for the DDR to trabectedin and lurbinectedin, we first determined the activity of ATM. Immunofluorescence microscopy was used to determine the activation of ATM, as measured by ATM autophosphorylation of Ser1981 after 1 hour exposure to 20 nM trabectedin (Figure 1A, left panel) or lurbinectedin (Figure 1A, right panel) followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. The results show that both compounds induce the autophosphorylation of ATM, compared to untreated control cells (Figure 1A). Interestingly, only a subset of cells shows autophosphorylation of ATM (Figure 1A). These data are in agreement with previous reports demonstrating that ATM plays a role in the processing of replication-dependent DSBs induced by trabectedin [36]. Coherent with the results for ATM, both trabectedin and



**Figure 1: Trabectedin and lurbinedectin activate both ATM and ATR pathways.** A. HeLa cells were mock-treated or exposed to 20 nM trabectedin (left panel) or lurbinedectin (right panel) for 1 hour followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then processed for immunolabeling with an antibody directed against Ser1981-phosphorylated ATM. Fluorescence intensities in individual cells were quantified by Metamorph analysis and are indicated in arbitrary units (a.u.). B. Same as above except than the cells were pre-permeabilized with ice-cold CSK-lysis buffer to remove the soluble fraction of RPA32 before processing for immunolabeling with an antibody directed against RPA32. C. Same as above except than cells were processed for simultaneous staining of Ser1981-phosphorylated ATM and RPA32.  $\rho$  denotes the correlation coefficient between the intensities of Ser1981-phosphorylated ATM and RPA32.



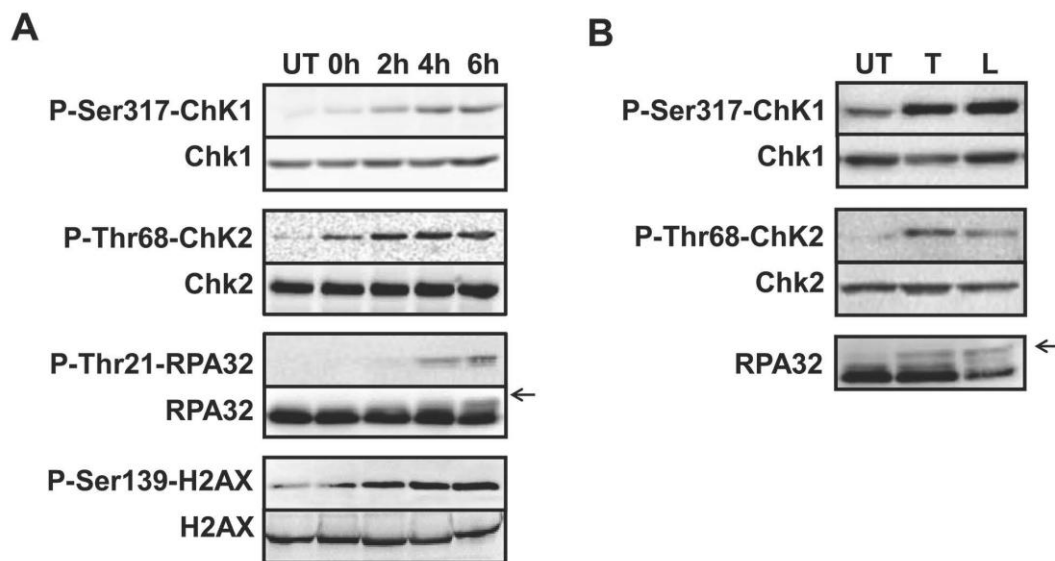
lurbinectedin treatments lead to the activation of Chk2 through phosphorylation on Thr68 (Figure 2). Together, our results indicate that the ATM/Chk2 pathway is activated in response to trabectedin and lurbinectedin.

To determine whether the ATR/Chk1 pathway also plays a role in the processing of trabectedin- or lurbinectedin-induced DNA lesions, we performed immunofluorescence microscopy to visualize chromatin recruitment of RPA32, one of the three RPA subunits (Figure 1B). RPA-coated single-stranded DNA (ssDNA) regions are required for recruitment of the ATR-ATRIP complex to damaged sites [22–24]. Our results show that 1 hour exposure to 20 nM trabectedin (Figure 1B, left panel) or lurbinectedin (Figure 1B, right panel) followed by 6 hours post-incubation in drug-free media is accompanied by strong chromatin recruitment of RPA32. Remarkably, the trabectedin- and lurbinectedin-induced RPA foci were mostly detected in cells where ATM was autophosphorylated (Figure 1C) suggesting that both pathways are activated simultaneously following exposure to the ETs. Chromatin recruitment of RPA32 was accompanied by rapid activation of ATR as indicated by the formation of phosphorylated Chk1 on the Ser317 residue (Figure 2). Interestingly, RPA32 as well as the H2AX histone variant are phosphorylated in response to trabectedin (Figure 2A and Supplementary

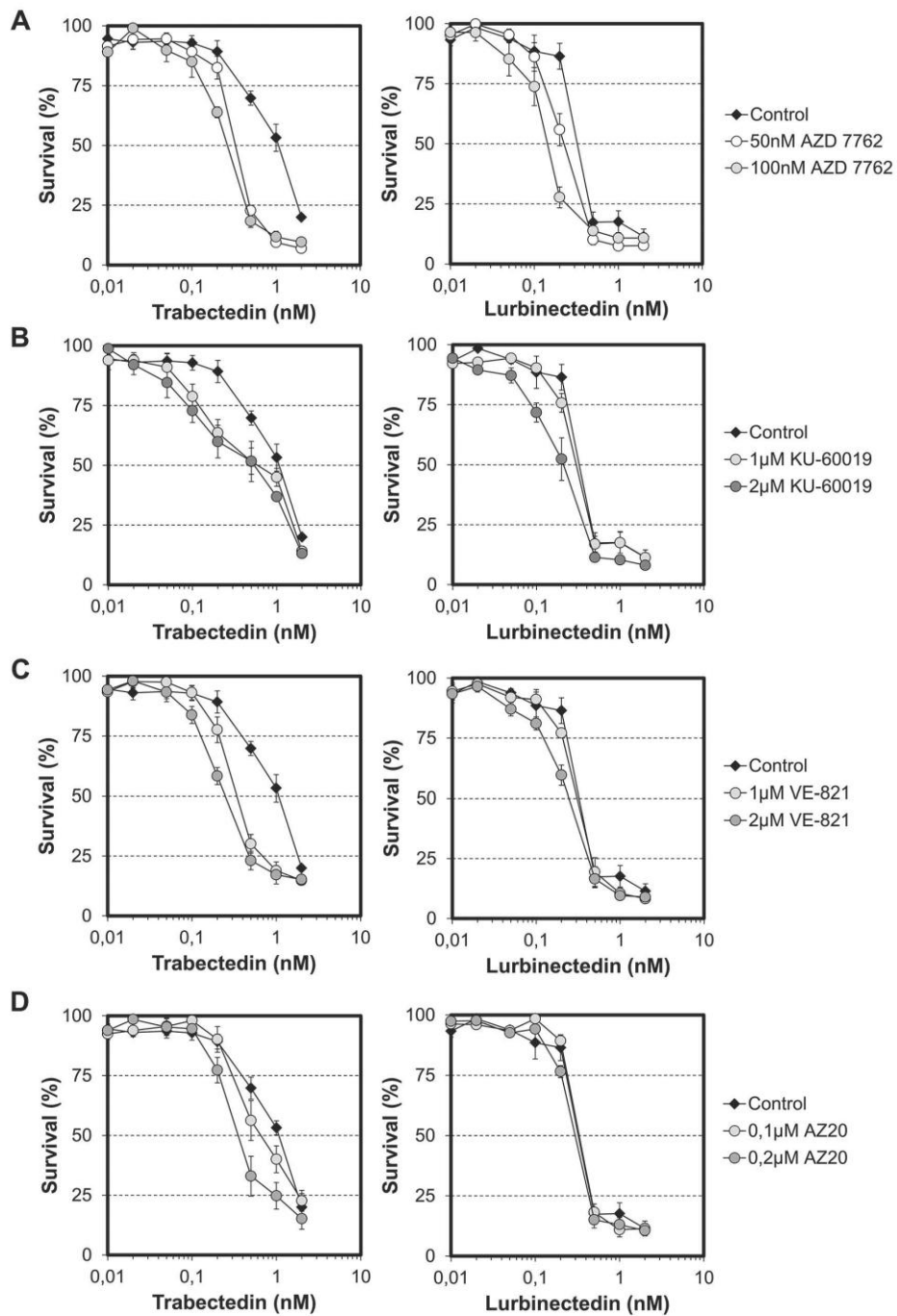
Figures S1A and S1B) or lurbinectedin (Figure 2B and Supplementary Figures S2A and S2B). This suggests that the damaged replicative sites are quickly recruiting proteins capable of stabilizing the replication fork and repairing the DSBs. In agreement, we show that BRCA1 is recruited to the chromatin following exposure to trabectedin (Supplementary Figure S1C) or lurbinectedin (Supplementary Figure S2C).

### Combination of trabectedin and lurbinectedin with checkpoint abrogators

Previous reports have shown that individual checkpoint abrogators enhance the efficacy of DNA-targeting anticancer drugs as well as of radiotherapy [37–40]. To establish if this approach is also valid for the ETs, the influence of pharmacological concentrations of Chk1/Chk2 (AZD7762, 50 and 100 nM), ATM (KU60019, 1 and 2  $\mu$ M) or ATR (VE-821, 1 and 2  $\mu$ M; AZ20, 0.1 and 0.2  $\mu$ M) inhibitors on the cytotoxicity of the ETs was determined. However, the presence of a single checkpoint abrogator had only modest influence on the cytotoxicity of the ETs. Indeed, the activity of trabectedin was increased 4-, 2-, 4- and 3-fold by AZD7762, KU60019, VE-821 or AZ20, respectively (Figure 3, left panels). Similarly, the activity of lurbinectedin was only marginally increased



**Figure 2: Both trabectedin and lurbinectedin induce the DNA damage response.** **A.** HeLa cells were mock-treated (UT) or incubated for 1 hour with trabectedin (20 nM) followed by 0, 2, 4, 6 hours post-incubation in drug-free media as indicated. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabeling with antibodies directed against Ser317-phosphorylated Chk1, Thr68-phosphorylated Chk2, Thr21-phosphorylated RPA32 and Ser139-phosphorylated H2AX. Total Chk1, Chk2, RPA32 and H2AX were used as loading controls. **B.** HeLa cells were either untreated (UT) or incubated for 1 hour with 20 nM trabectedin (T) or lurbinectedin (L) followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabeling with antibodies directed against Ser317-phosphorylated Chk1, Thr68-phosphorylated Chk2 and RPA32. Total Chk1 and Chk2 were used as loading controls. On each panel, arrows indicate the main phosphorylated forms of RPA32.



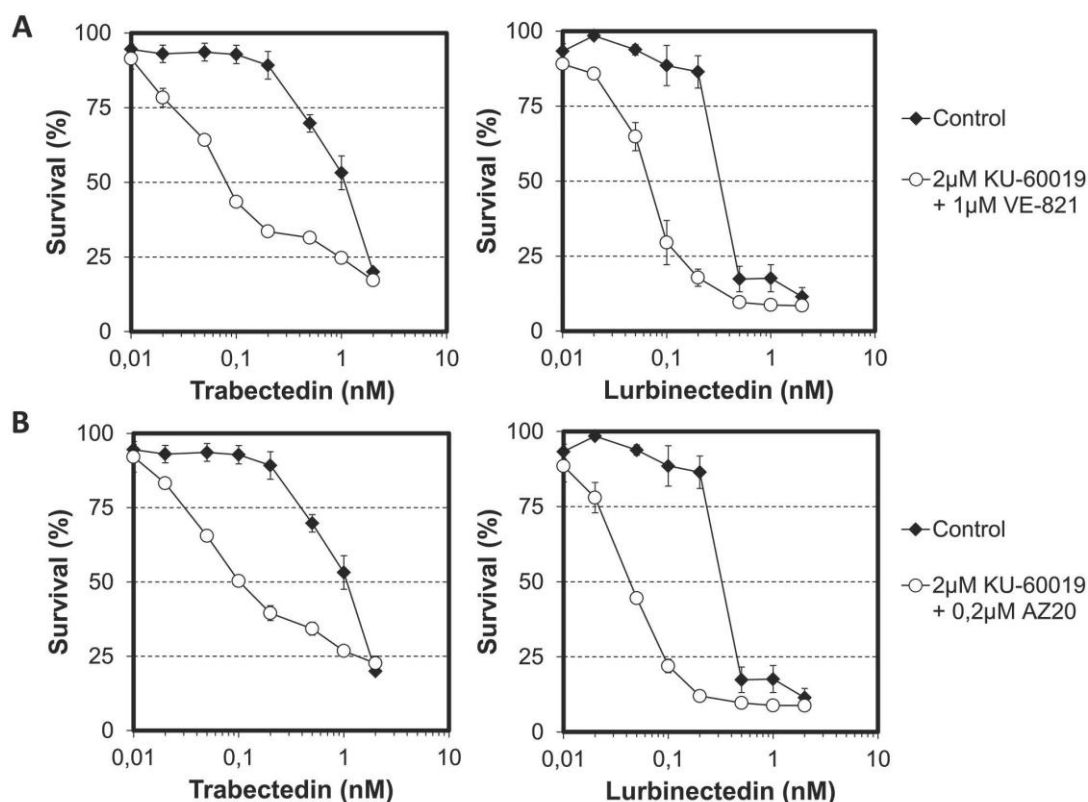
**Figure 3: Effect of single checkpoint abrogators on the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin.** HeLa cells were exposed for 1 hour to the indicated concentrations of checkpoint abrogators (A. AZD7762; B. KU-60019; C. VE-821; D. AZ20) before addition of either trabectedin (left panels) or lurbinectedin (right panels) at the indicated concentrations. Cells continuously exposed to trabectedin or lurbinectedin alone were included as control. AZD7762, KU-60019, VE-821 and AZ20 have no effects on HeLa cells growth when used alone up to 100 nM, 2 µM, 2 µM and 0.2 µM, respectively. Standard deviations (SD) are indicated by error bars and are indicated when they exceed symbol size.

when cells were co-incubated with AZD7762 (Figure 3, right panels). Together, these results show that the classical strategies of using a single checkpoint abrogator as chemo-sensitizer do not apply to the ETs and suggest either no role or, alternatively, functional overlap of the ATM and ATR pathways in the processing of ETs-induced DNA lesions.

#### Influence of dual ATM and ATR inhibition on the cytotoxicity of trabectedin and lurbinectedin

To distinguish between these two possibilities, we performed viability assays on HeLa cells that were treated with ETs in the absence or presence of dual ATM and ATR inhibition (with KU60019 and VE-821, respectively). We chose concentrations of checkpoint abrogators (2  $\mu$ M KU60019 and 1  $\mu$ M VE-821) with marginal toxicity toward HeLa cells ( $<IC_{20}$ ) when

combined. Interestingly, although inhibition of ATM or ATR only moderately increased the cytotoxic activity of trabectedin (Figures 3B and 3C, left panels), dual inhibition of ATM and ATR potentiated the cytotoxicity of trabectedin 14-fold (Figure 4A, left panel). Similarly, although inhibition of ATM or ATR alone had no effect on the cytotoxicity of lurbinectedin (Figures 3B and 3C, right panels), dual ATM and ATR inhibition markedly increased it (Figure 4A, right panel). Importantly, these observations were not limited to a specific type of cell cycle abrogator, since the combination of 2  $\mu$ M KU60019 with 0.2  $\mu$ M AZ20 also improved the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin by 11- and 8-fold, respectively (Figure 4B). These results strongly suggest that both ATM and ATR act in the signaling of ET-induced DNA damage and therefore, that both need to be inhibited in order to increase the cytotoxic activity of the ETs.



**Figure 4: Influence of combinations of checkpoint abrogators on the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin.** A. HeLa cells were first exposed for 1 hour to either no drug (black diamond) or a combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 (white circle) before addition of either trabectedin (left panel) or lurbinectedin (right panel) at the indicated concentrations. B. HeLa cells were first exposed for 1 hour to either no drug (black diamond) or a combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 0.2  $\mu$ M AZ20 (white circle) before addition of either trabectedin (left panel) or lurbinectedin (right panel) at the indicated concentrations. Both combinations of checkpoint abrogators, that is 2  $\mu$ M KU-60019 with 1  $\mu$ M VE-821 and 2  $\mu$ M KU-60019 with 0.2  $\mu$ M AZ20 have minor cytotoxic activity ( $<IC_{20}$ ) toward HeLa cells by themselves. SDs are indicated by error bars and are indicated when they exceed symbol size.

### **Both ATM and ATR are involved in the initial steps of the DDR**

To better characterize the molecular processes underlying the need for dual ATM/ATR inhibition to improve the activity of the ETs, we first determined the influence of 2  $\mu$ M KU60019, 1  $\mu$ M VE-821 or 2  $\mu$ M KU60019 in combination with 1  $\mu$ M VE-821 on the phosphorylation of histone H2AX following exposure to trabectedin or lurbinectedin (Figure 5A). Interestingly, our results show that the formation of  $\gamma$ -H2AX foci is, at the best, only moderately diminished in the presence of a single kinase inhibitor in response to the ETs. In clear contrast, dual inhibition of ATM and ATR was accompanied by a drastic reduction of  $\gamma$ -H2AX foci formation induced by trabectedin (Figure 5A, left panel) or lurbinectedin (Figure 5A, right panel). Accordingly, MDC1 chromatin recruitment and focalization was detectable when trabectedin- or lurbinectedin-treated cells were co-incubated in the presence of either KU60019 or VE-821 (Figure 5B and 5C) whereas the combination of both KU60019 and VE-821 completely inhibited the formation of MDC1 foci (Figure 5B and 5C). This observation was not limited to H2AX and MDC1, since RPA32 phosphorylation was also attenuated by dual, but not by single, inhibition of ATM or ATR (Supplementary Figure S3). It is interesting to note that single inhibition of either ATM or ATR generally has a more pronounced effect on trabectedin, compared to lurbinectedin, suggesting that the two compounds induce a similar, but not identical response. Together, these data suggest that both the ATM and the ATR kinase play a role in the initial DNA damage response to the ETs.

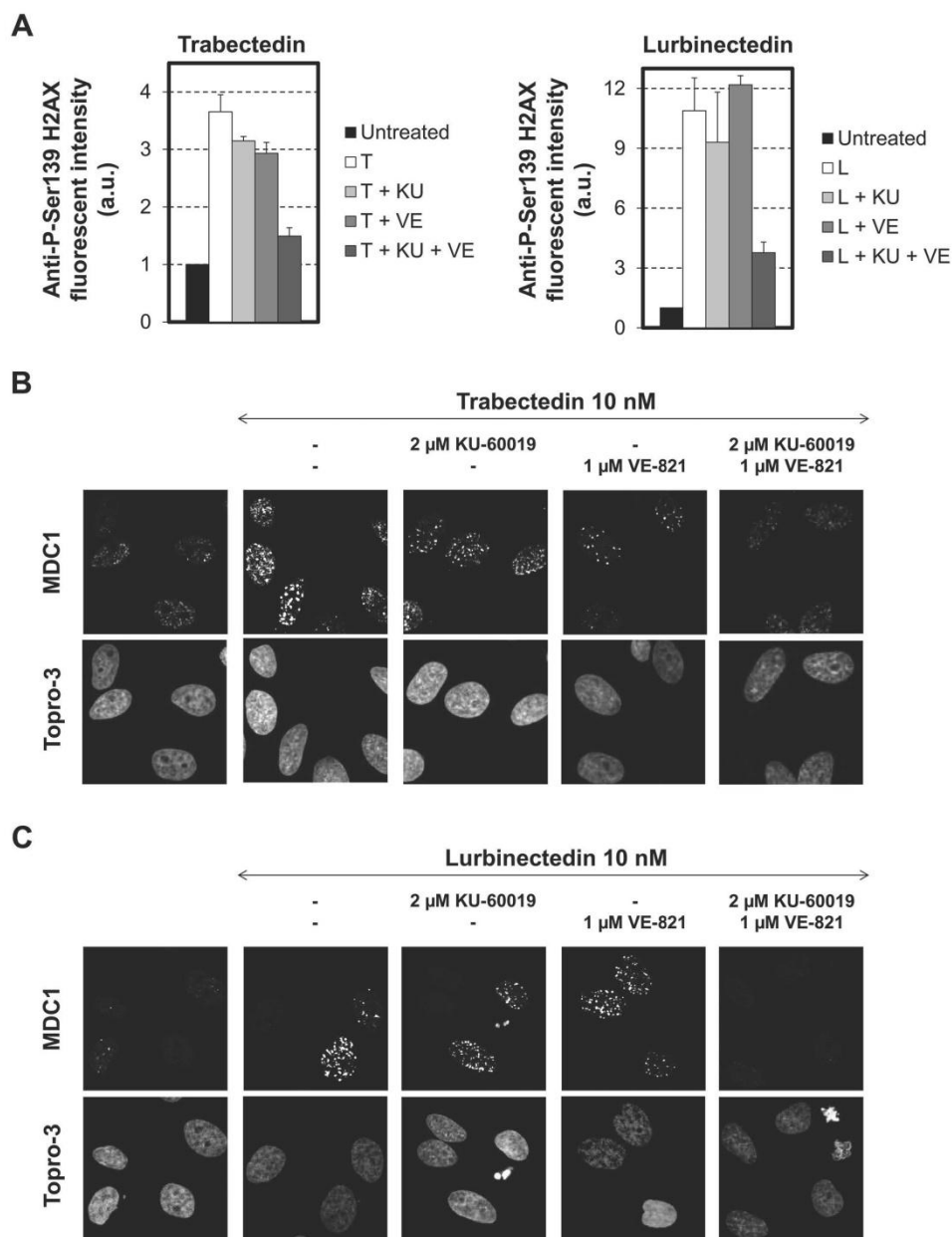
### **Both ATM and ATR are required for the recruitment of HRR proteins**

To determine if the inhibition of the early steps of the ETs-induced DNA-damage signaling is accompanied by a default in the recruitment of HRR proteins to the damaged DNA, we performed immunofluorescence microscopy to characterize the influence of ATM and ATR inhibition on the formation of BRCA1 and Rad51 foci (Figure 6). Again, we observed that the presence of a single kinase inhibitor only partly inhibited the formation of BRCA1 foci following trabectedin exposure (Figure 6A, left panel). In contrast, BRCA1 recruitment was not significantly influenced by ATM or ATR inhibition in response to lurbinectedin (Figure 6A, right panel) confirming the similar, but not fully identical, cellular response to the two ETs. In clear contrast, dual inhibition of both ATM and ATR almost completely inhibited the recruitment of BRCA1 to the chromatin following exposure to both trabectedin

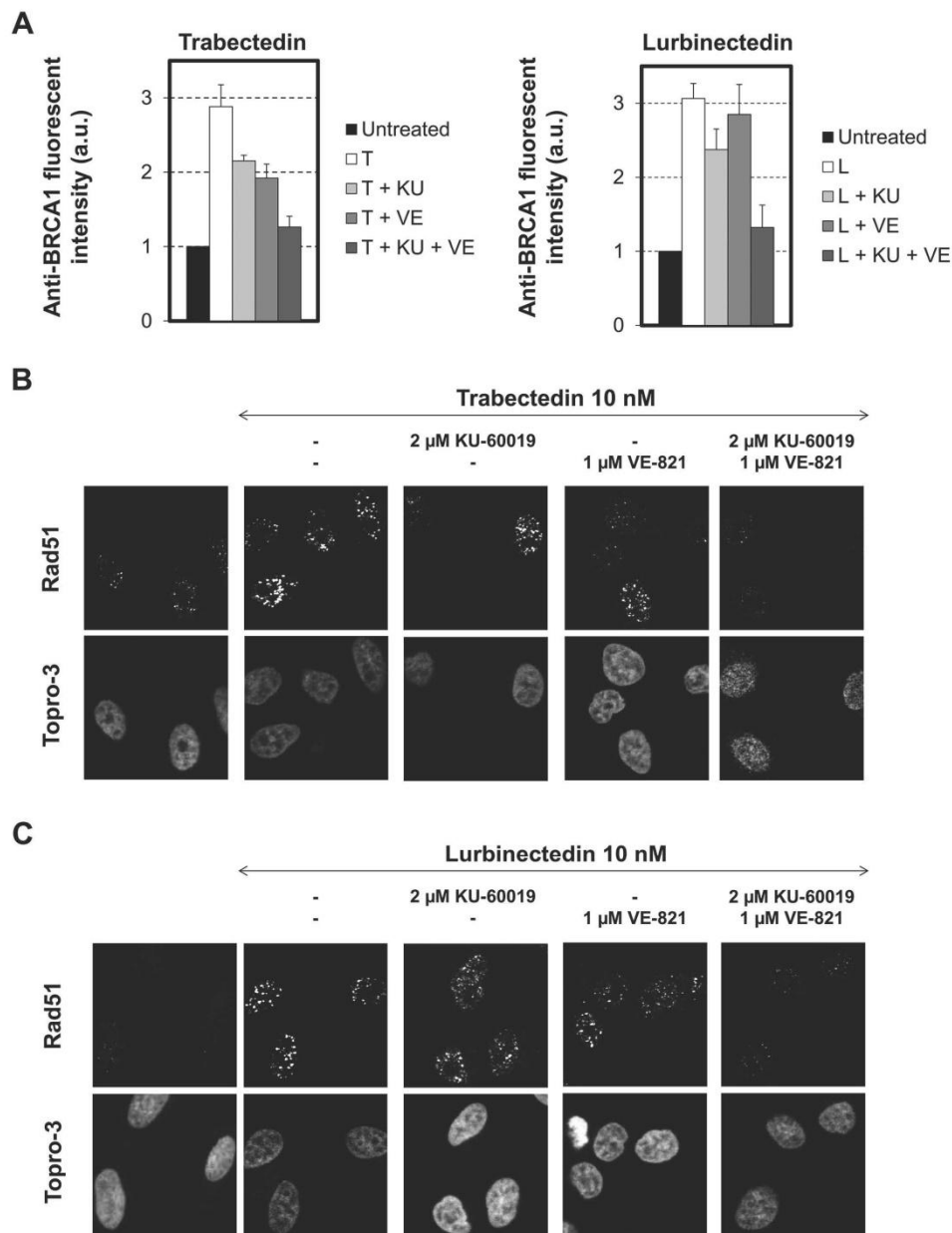
(Figure 6A, left panel) and lurbinectedin (Figure 6A, right panel). These results were not limited to BRCA1, since Rad51 focalization was also completely abrogated by dual, but not by single, inhibition of ATM and ATR (Figure 6B and 6C).

### **Dual inhibition of ATM and ATR increases chromosome damage induced by trabectedin and lurbinectedin**

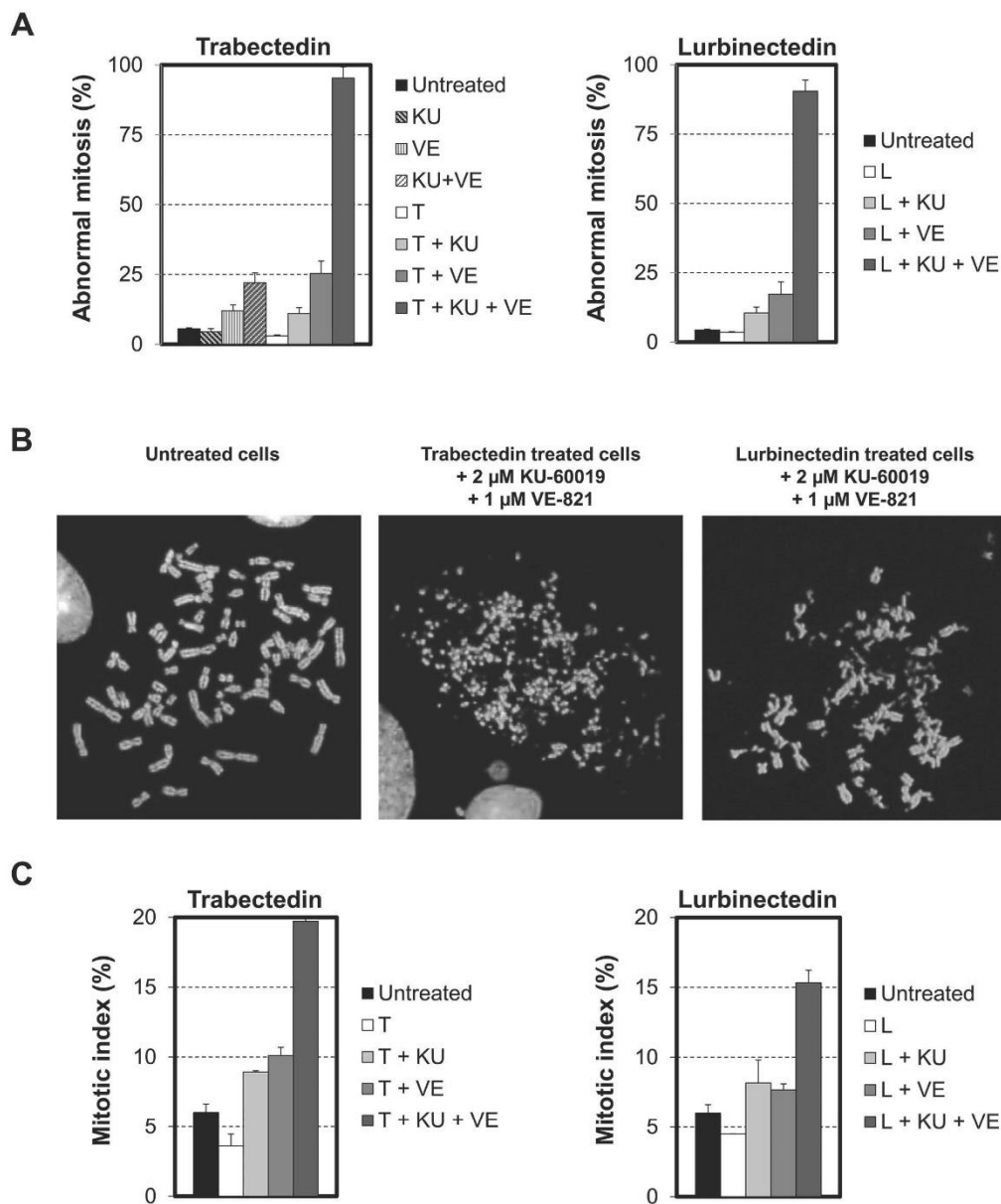
Unrepaired DSBs may lead to chromosomal abnormalities. To determine the influence of checkpoint abrogators on the karyotype of ETs-treated cells, HeLa cells were exposed for 1 hour to a non-toxic concentration (1 nM) of either trabectedin or lurbinectedin in the presence or absence of 2  $\mu$ M KU60019, 1  $\mu$ M VE-821 or a combination of the two checkpoint abrogators. HeLa cells were then post-incubated in the presence or absence of checkpoint abrogators for 24 hours and their karyotype analyzed (Figure 7). In agreement with our previous findings, we show that single kinase inhibition slightly increased the chromosomal damage induced by trabectedin or lurbinectedin (Figure 7A). In clear contrast, dual inhibition of both ATM and ATR is accompanied by a striking increase in chromosome breakage induced by trabectedin (Figure 7A, left panel) as well as by lurbinectedin (Figure 7A, right panel). Importantly, this increase was well above the effects seen for the two checkpoint abrogators when they were given alone or in combination to cells in the absence of ETs (Figure 7A, left panel). Remarkably, all metaphases examined in cells treated with ETs in the presence of dual ATM and ATR inhibition showed extensive chromosome breakage (Figure 7B). Previous findings show that exposure to trabectedin or lurbinectedin induced cell cycle arrest in G2, most likely to allow time for DNA repair [5]. Accordingly, in our chromosome-spread experiments, we observed a slight decrease in the number of mitotic cells after treatment with the ETs (Figure 7C). In contrast, when cells were exposed to trabectedin or lurbinectedin in the presence of both ATM and ATR inhibitors, the fraction of mitotic cells increased from 3.5% to 20% and from 4% to 15%, respectively. In comparison, single kinase inhibition only partly replicated these results (Figure 7C). Importantly, VE-821 and KU60019 did not alter the fraction of mitotic cells by themselves (data not shown). Together, our findings show that the simultaneous inactivation of both ATM and ATR is necessary to increase the cytotoxic activities of the ETs acting through a potent and complete inhibition of the early DDR, on the recruitment of HRR proteins as well as on the subsequent G2/M checkpoint arrest resulting in the accumulation of deadly DSBs and mitotic catastrophe.



**Figure 5: Influence of combinations of checkpoint abrogators on the phosphorylation of the histone variant H2AX and the focalization of MDC1 following exposure to trabectedin or lurbinectedin.** **A.** HeLa cells were exposed to 10 nM trabectedin (left panel, T) or lurbinectedin (right panel, L) for 1 hour in the absence (white columns) or presence of 2  $\mu$ M KU-60019 (+ KU, light grey columns), 1  $\mu$ M VE-821 (+ VE, medium grey columns) or a combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 (+ KU + VE, dark grey columns). Cells were then processed for immunolabeling with an antibody directed against Ser139-phosphorylated H2AX. Untreated cells were used as a negative control (black columns). The fluorescence intensities in single cells were quantified by Metamorph analysis and are expressed in arbitrary units (a.u.). Data are represented as means  $\pm$  SD. **B.** (trabectedin) and **C.** (lurbinectedin). Same as above, except that cells were pre-permeabilized with ice-cold CSK-lysis buffer before fixation and immunolabeling with a MDC1-directed antibody. DNA was counterstained with Topro-3 fluorescent dye. MDC1 focalization was visualized by confocal microscopy.



**Figure 6: Influence of combinations of checkpoint abrogators on the focalization of BRCA1 and Rad51 induced by trabectedin or lurbinectedin.** **A.** HeLa cells were exposed to 10 nM trabectedin (left panel, T) or lurbinectedin (right panel, L) for 1 hour in the absence (white columns) or presence of 2 μM KU-60019 (+ KU, light grey columns), 1 μM VE-821 (+ VE, medium grey columns) or a combination of 2 μM KU-60019 and 1 μM VE-821 (+ KU + VE, dark grey columns). This was followed by 24 hours post-incubation in the absence (white columns) or presence of 2 μM KU-60019 (+ KU, light grey columns), 1 μM VE-821 (+ VE, medium grey columns) or a combination of 2 μM KU-60019 and 1 μM VE-821 (+ KU + VE, dark grey columns). Cells were then pre-permeabilized with ice-cold CSK-lysis buffer, fixed and immunolabeled with a BRCA1-directed antibody. Untreated cells were used as a negative control (black columns). The fluorescence intensities in single cells were quantified by Metamorph analysis and are expressed in arbitrary units (a.u.). Data are represented as mean  $\pm$  SD. **B.** (trabectedin) and **C.** (lurbinectedin). Same as above, except that cells were directly fixed and immunolabeled with a Rad51-directed antibody. DNA was counterstained with Topro-3 fluorescent dye. Rad51 focalization was visualized by confocal microscopy.



**Figure 7: Influence of the combination of checkpoint abrogators on DSBs repair.** **A.** HeLa cells were exposed to 1 nM trabectedin (left panel, T) or lurbinectedin (right panel, L) for 1 hour in the absence (white columns) or presence of 2  $\mu$ M KU-60019 (+ KU, light grey columns), 1  $\mu$ M VE-821 (+ VE, medium grey columns) or a combination of 2  $\mu$ M KU-600019 and 1  $\mu$ M VE-821 (+ KU + VE, dark grey columns). This was followed by 24 hours post-incubation in the absence (white columns) or presence of 2  $\mu$ M KU-60019 (+ KU, light grey columns), 1  $\mu$ M VE-821 (+ VE, medium grey columns) or a combination of 2  $\mu$ M KU-600019 and 1  $\mu$ M VE-821 (KU + VE, dark grey columns). Cells were then processed for karyotype analysis. Untreated cells were used as a negative control (black columns). The left panel shows the influence on HeLa cells of 2  $\mu$ M KU-60019 (KU, light grey dashed column), 1  $\mu$ M VE-821 (VE, medium grey dashed column) or a combination of 2  $\mu$ M KU-600019 and 1  $\mu$ M VE-821 (KU + VE, dark grey dashed column) when they were given in the absence of ETs. Data are represented as mean  $\pm$  SD. **B.** Typical metaphase in untreated HeLa cells and cells treated for 1 hour with 1 nM of either trabectedin or lurbinectedin combined with a combination of 2  $\mu$ M KU-600019 and 1  $\mu$ M VE-821 and post-incubated for 24 hours in the presence of a combination of 2  $\mu$ M KU-600019 and 1  $\mu$ M VE-821. **C.** The mitotic index was determined on the microscopy slides used for karyotype analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

### **Influence of dual ATM/ATR inhibition on the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin toward ovarian cancer cell lines**

To confirm that our data might have some rapid clinical application, we applied our strategy to 3 different ovarian cancer cell lines. Remarkably, while ATM or ATR single inhibition increased the cytotoxic activity of trabectedin toward IGROV1 cells by 4- and 2-fold, respectively (Figure 8A, left panel, white triangle and white square), the combination of trabectedin with 2  $\mu$ M KU60019 and 1  $\mu$ M VE-821 strongly potentiated it 27-fold (Figure 8A, left panel, white circle). Similarly, while both ATM and ATR single inhibition improved the cytotoxic activity of lurbinectedin 3-fold each (Figure 8A, right panel, white triangle and white square), their combination markedly increases it 16-fold (Figure 8A, right panel, white circle). Importantly, these results were also found for A2780 cells as well as for their cisplatin-resistant A2780/CP70 counterparts (Figure 8B and 8C). Specifically, ATM and ATR dual inhibition increased the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin toward A2780 cells 13- and 10-fold, respectively, and 11-fold for both ETs toward A2780/CP70 cells. It is noteworthy that A2780/CP70 cells were more sensitive to dual kinase inhibition than the parental cells. Indeed, to reach a similarly low toxicity as for A2780 or IGROV1 cells ( $<IC_{20}$ ), A2780/CP70 cells had to be pre-incubated with 1  $\mu$ M KU60019 and 1  $\mu$ M VE-821 instead of 2  $\mu$ M KU60019 and 1  $\mu$ M VE-821. Taken together, our data demonstrate that combining ETs with dual ATM and ATR inhibition represent a promising approach to significantly improve the clinical efficacy of this unique class of DNA-targeting chemotherapeutics, in particular for patients with functional HRR.

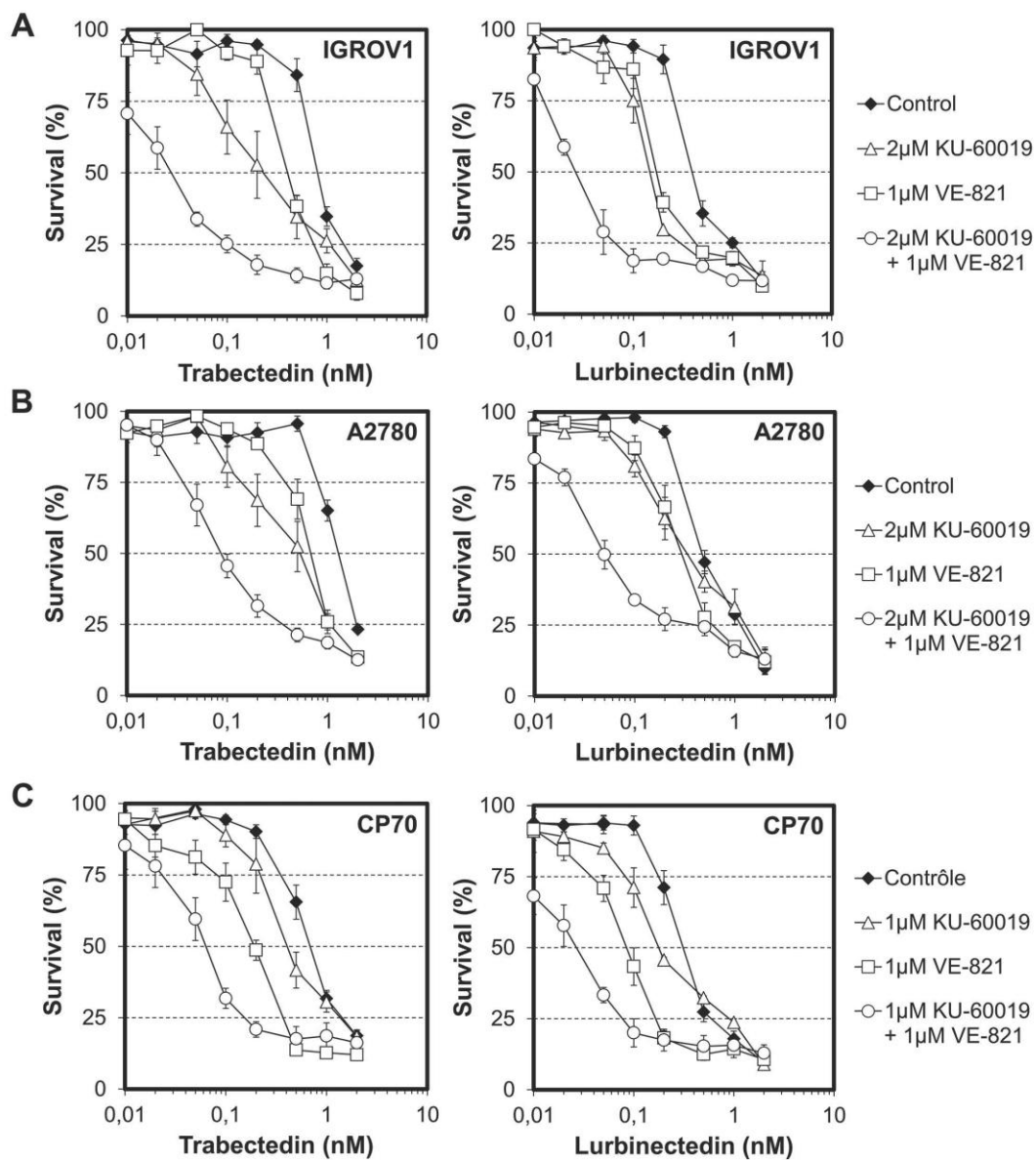
### **DISCUSSION**

Although HRR deficiency has proven to be highly relevant for both trabectedin and lurbinectedin [5,11], no strategy has been evaluated so far to inhibit this repair pathway, although it would likely increase the antitumor activity of the ETs by mimicking HRR deficiency. This is likely because initial findings showed that ATM deficiency, which is believed to initiate the DDR following trabectedin exposure, only moderately increased the activity of both trabectedin and lurbinectedin in cellular models [5, 36]. In agreement, we here show that pharmacological inhibition of ATM by KU-60019, an ATP-competitive inhibitor, only marginally increased the cytotoxic activity of the ETs. The modest influence of ATM inhibition might be due to activation of alternative processes [41]. In agreement, we here report that ATM inhibition with KU-60019 only slightly inhibited  $\gamma$ -H2AX foci formation as well as chromatin recruitment of MDC1, BRCA1 and Rad51 following exposure to trabectedin or lurbinectedin. One might speculate that DNA-PK would be redundant

with ATM as being the case for ionizing radiation [42]. However, in the case of trabectedin, DNA-PK is only involved in the processing of transcription-dependent, but not replication-dependent, DSBs. Furthermore, loss of DNA-PK has been associated with resistance, rather than increased sensitivity, to trabectedin thereby making DNA-PK a risky target [11,36].

Alternatively, one could imagine that ATR activation would be responsible for the modest influence of pharmacological inhibition or genetic loss of ATM. In agreement, our data show that the dual inhibition of both ATM and ATR is required to fully inhibit  $\gamma$ -H2AX foci formation and recruitment of HRR proteins 24 hours after exposure to trabectedin or lurbinectedin. Importantly, this is accompanied by a marked increase in the capacity of both ETs to induce chromosome damage and cell death. It is likely that ATR does not play an important role in the early phosphorylation of the histone variant H2AX since it has been reported that ATM inhibition leads to the almost complete loss of H2AX phosphorylation 6 hours after trabectedin exposure [36]. Preliminary data in our laboratory confirm that assumption (data not shown). This suggests that HRR starts at frank DSBs, leading to rapid ATM auto-phosphorylation and pathway activation. Accordingly, it has been suggested that by interfering specifically with the TC-NER process, trabectedin and lurbinectedin-induced DNA adducts are capable of forming ternary complexes that are not removed by the NER machinery, although the XPF/ERCC1 nuclease is able to cleave the strand opposite to the lesion thereby inducing SSBs [12,43]. Such SSBs could then be transformed into DSBs by the replication fork thus quickly activating the ATM pathway. Alternatively, the lack of early activation of the ATR pathway could lead to unstable replication forks leading to their collapse [36,44]. In agreement, both trabectedin and lurbinectedin form DNA adducts that stabilize double-stranded DNA (dsDNA) and functionally mimic covalent DNA cross-links thereby preventing the uncoupling of the helicase and polymerase activities needed for activation of ATR [3,43,45,46]. Interestingly, the role of ATM in dealing with replicative problems is not limited to ETs. In particular, it was shown that exposure to the hexavalent chromium [Cr(VI)] compounds results in generation of S phase-dependent DNA DSBs, which activate ATM independently of ATR [47]. Similarly, iriflufen specifically induces the ATM/Chk2 signaling pathway in replicating cells [48,49]. More recently, it has been reported that low formaldehyde doses, by inducing chromatin perturbations, also causes a strong and rapid activation of ATM in human cells, which was ATR-independent and restricted to S-phase [50]. Together, these data show that ATM can deal with different types of replicative problems besides replicative stress. However, processing of stalled replication forks through either the FA pathway or replication fork regression might generate single-stranded DNA later





**Figure 8: Influence of combinations of checkpoint abrogators on the cytotoxic activities of trabectedin and lurbinectedin toward ovarian cancer cell lines.** A. IGROV1 cells were first exposed for 1 hour to either no drug (black diamond), 2  $\mu$ M KU-60019 (white triangle), 1  $\mu$ M VE-821 (white square) or a combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 (white circle) before addition of either trabectedin (left panel) or lurbinectedin (right panel) at the indicated concentrations. The combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 had a minor effect ( $<IC_{20}$ ) on IGROV1 cells while 2  $\mu$ M KU-60019 or 1  $\mu$ M VE-821 alone had no toxicities. B. A2780 cells were first exposed for 1 hour to either no drug (black diamond), 2  $\mu$ M KU-60019 (white triangle), 1  $\mu$ M VE-821 (white square) or a combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 (white circle) before addition of either trabectedin (left panel) or lurbinectedin (right panel) at the indicated concentrations. The combination of 2  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 as well as 2  $\mu$ M KU-60019 or 1  $\mu$ M VE-821 alone have no toxicity toward A2780 cells. C. A2780/CP70 cells were first exposed for 1 hour to either no drug (black diamond), 1  $\mu$ M KU-60019 (white triangle), 1  $\mu$ M VE-821 (white square) or 1  $\mu$ M KU-60019 in combination with 1  $\mu$ M VE-821 (white circle) before addition of either trabectedin (left panel) or lurbinectedin (right panel) at the indicated concentrations. The combination of 1  $\mu$ M KU-60019 and 1  $\mu$ M VE-821 has a minor effect ( $<IC_{20}$ ) on A2780/CP cells growth while either 1  $\mu$ M KU-60019 or 1  $\mu$ M VE-821 alone have no toxicities. SDs are indicated by error bars and are indicated when they exceed symbol size.

capable of recruiting RPA thereby activating the ATR pathway [45,51,52]. The coexistence of different pathways to manage the stress induced by ETs is supported by our observation showing that both ATM and ATR pathways are activated within a single cell in response to ET-exposure. Interestingly, single inhibition of either ATM or ATR is likely to generate substrates capable of activating the remaining pathway. Indeed, the inhibition of ATM is likely to generate single-stranded DNA regions through the activation of endonucleases thereby activating the ATR pathway [53–55]. Conversely, the absence of ATR would promote replication fork collapse and activation of ATM [52]. Thus, the dual inhibition of both ATM and ATR is an absolute requirement to inhibit HRR and to potentiate ETs' activities.

Interestingly, a recent report has shown that the pharmacologic inhibition of ATR or ATM increased the response to ionizing radiation in human cervical, endometrial and ovarian carcinoma cell lines, with a further increase in ionizing radiation sensitization by coordinated inhibition of both kinases [56]. In contrast, selective inhibition of ATR, but not ATM, synergized with platinum in all three types of cellular models, while the combined inhibition of ATR and ATM does not enhance the response to platinum agents above that seen with the ATR inhibitor alone. These results, together with ours, demonstrate the need to precisely characterize the mechanism of action of each anticancer agent to establish new rationales and thereby to improve cancer patients' care. Until recently, clinical attempts to inhibit the DDR in order to ameliorate the activity of DNA-targeted agents were limited by the high general toxicity and lack of specificity of available compounds. However, new and selective inhibitors are currently under development and some have recently entered phase I clinical trials in combination with either radiotherapy or DNA-targeting agents [18,41]. Despite the fact that no ATM inhibitors are yet in clinical development and no ATR inhibitors have reached approval, the *in vitro* studies carried out to date clearly show that pharmacological inhibition of ATM and ATR has great potential in cancer therapy in combination with radiotherapy or certain chemotherapeutic drugs including trabectedin and lurbinectedin. One might speculate that inhibiting both ATM and ATR might have severe toxic effects on normal tissues when combined with DNA-targeting agents. Determining whether non-replicating cells are equally sensitized to ETs by dual inhibition of ATR and ATM than actively replicating tumor cells might be part of the answer. However, measuring the expression levels of ATR and ATM in tumors with functional HRR might also help to solve that issue. Tumors with low expression levels of ATR are indeed likely to respond to ETs when combined with ATM inhibitors while tumors with low expression levels of ATM are likely to respond to ETs when combined with ATR inhibitors. This approach might improve the therapeutic index of ETs on

tumors with functional HRR by selectively targeting the tumor cells. Obviously, additional work on animal models is required to validate our combinations and to evaluate toxicities in a living context.

In summary, our findings demonstrate that pharmacological inhibition of either the Chk1/2, the ATR or the ATM kinase is not accompanied by any significant improvement of the cytotoxic activity of trabectedin or lurbinectedin. In clear contrast, dual ATM/ATR inhibition strongly potentiates the activity of both ETs against human cervical and ovarian carcinoma cells by efficiently blocking the formation of  $\gamma$ -H2AX, MDC1, BRCA1 and Rad51 foci following ET-exposure thereby resulting in extensive chromosome damage. Together, our data identify ATR and ATM as central coordinators of the DDR to trabectedin and lurbinectedin and provide a mechanistic rationale for combining these compounds with ATR and ATM inhibitors in future clinical trials.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Trabectedin and lurbinectedin were provided by PharmaMar (Madrid, Spain). AZD7762 (<http://www.selleckchem.com/products/AZD7762.html>), AZ20 (<http://www.selleckchem.com/products/az20.html>), VE-821 (<http://www.selleckchem.com/products/ve-821.html>) and KU-60019 (<http://www.selleckchem.com/products/KU-60019.html>) were purchased from Selleckchem.

### Cells

HeLa-M cervical carcinoma cells were a gift from Andrzej Skladanowski (Gdansk, Poland). Parental A2780 and cisplatin resistant A2780/CP70 ovarian carcinoma cells were kindly provided by Robert Brown (Bearsten, UK), whereas IGROV1 ovarian carcinoma cells were provided by Alain Pierré (Croissy sur Seine, France). HeLa cells were grown in DMEM GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Perbio Science). A2780, A2780/CP70 and IGROV1 were grown in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Perbio Science). Media were supplemented with 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (PanPharma). All cell lines were regularly tested for Mycoplasma contamination using Mycoplasma Detection Kit Myco Alert® (Lonza).

### Antibodies

Antibodies directed against P-Thr68-Chk2 (# 2661), Chk2 (clone 1C12, # 3440), P-Ser317-Chk1 (# 2344), Chk1 (clone 2G1D5, # 2360), P-Ser1981-ATM (clone 10H11.E12, # 4526) and RPA32 (clone 4E4, # 2208) were

purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Antibodies against phospho-Thr21-RPA32 (# ab61065) and MDC1 (# ab11169) were from Abcam while the H2AX (# 07-627) and  $\gamma$ -H2AX (# 05-636) -directed antibodies were purchased from Millipore (Lake Placid, NY). Antibodies against BRCA1 (# sc-6954) and RAD51 (# sc-8349) were from Santa Cruz Biotechnology. HRP (horseradish peroxidase) and fluorescent dye-conjugated antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, ME).

### Viability assays

Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide) assay as described previously [57]. Briefly, cells were exposed to the indicated concentrations of trabectedin or lurbinectedin for five doubling times. For drug combinations, cells were pre-incubated for 1 hour with checkpoint abrogators, followed by co-incubation with trabectedin or lurbinectedin for five doubling times. All values are averages of at least three independent experiments, each done in duplicate.

### Immunoblotting

HeLa cells were incubated with trabectedin or lurbinectedin for 1 hour and post-incubated in drug free medium for up to 6 hours at 37°C. Cells were then washed in PBS and lysed in lysis buffer (0.5% NP40, 20 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M aprotinin, 1 mM orthovanadate and 1 mM DTT) as described [58]. Proteins were resolved on SDS/PAGE (10 or 15%) and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were saturated by TBST-milk [50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20 and 5% dehydrated skimmed milk] and the antigens were revealed by immunolabeling. Antigens were detected using an enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad) using the Chemidoc system (Bio-Rad).

### Immunofluorescence and microscopy

HeLa cells were incubated with the indicated concentrations of trabectedin or lurbinectedin for 1 hour at 37°C and post-incubated for 6 or 24 hours. For drug combinations, cells were exposed for 1 hour to trabectedin or lurbinectedin in the presence or absence of checkpoint abrogators followed by 24 hours in the presence or absence of checkpoint abrogators alone. Immunofluorescence experiments were carried out as described previously [59]. When indicated, coverslips were washed twice in PBS and resuspended in ice-cold CSK-lysis buffer (100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X100, 50 mM HEPES pH 7.4 and 300 mM sucrose) and kept at 4°C for 5 minutes before fixation in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, U.S.A.). The antigens were revealed by using the indicated

primary antibodies. DNA was counterstained by DAPI for fluorescent microscopy (# H-1200, Vector Laboratories) and TO-PRO-3 iodide for confocal analysis (# T3605, ThermoFisher Scientific). Images were collected using a BX61 fluorescent microscope and cell F imaging software (Olympus) or an inverted LEICA TCS SP2 confocal microscope. Fluorescence intensities were measured by MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). The background over noncellular regions was subtracted. At least 100 cells were analyzed per sample. Values represent the averages of at least three independent experiments.

### Chromosome spread

HeLa cells were exposed for 1 hour to the indicated concentrations of trabectedin or lurbinectedin in the presence or absence of checkpoint abrogators. Cells were then washed with PBS and post-incubated for 24 hours in the presence or absence of checkpoint abrogators. Chromosome spreads were prepared as described previously [60]. Briefly, cells were first treated with colchicine (0.2  $\mu$ g/mL) for 90 minutes at 37°C, washed with PBS and incubated for 20 min at 37°C in hypotonic conditions (56 mM KCl). Cells were then fixed twice for 10 min at room temperature by acetic acid and methanol (1:3). After fixation, cells were dropped onto microscopy slide and DNA counterstained with DAPI. Images were collected using a BX61 microscope and cell F imaging software (Olympus). One hundred metaphases per treatment condition were evaluated. Cells presenting more than five chromosome breakages were considered as abnormal mitotic cells. The total number of cells in mitosis or in interphase was counted on each microscopy slides and the fraction of mitotic cells (mitotic index) was determined.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CAPES/COFECUB (French-Brazilian collaborative research grant No. 583/07) and PharmaMar. Michelle Lima was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. Hana Bouzid was supported by a fellowship from La Ligue Contre le Cancer, France.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest.

### REFERENCES

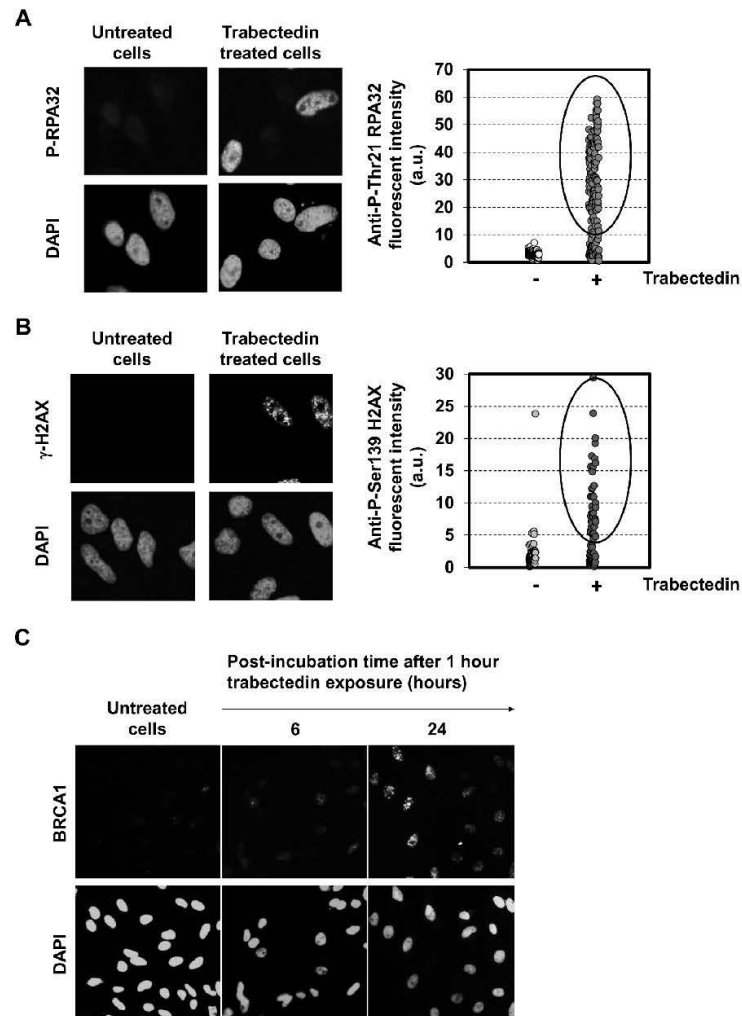
1. Larsen AK, Galmarini CM, D'Incalci M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; in press doi 10.1007/s00280-015-2918-1.

2. Elez ME, Tabernero J, Geary D, Macarulla T, Kang SP, Kahatt C, Pita AS, Teruel CF, Siguero M, Cullell-Young M, Szyldergemajn S, Ratain MJ. First-in-human phase I study of Lurbinectedin (PM01183) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 2205-14.
3. Leal JF, Martínez-Diez M, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, Negri A, Gago F, Guillén-Navarro MJ, Avilés P, Cuevas C, García-Fernández LF, Galmarini CM. PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity. *Br J Pharmacol.* 2010; 161: 1099-110.
4. Soares DG, Machado MS, Rocca CJ, Poindessous V, Ouaret D, Sarasin A, Galmarini CM, Henriques JA, Escargueil AE, Larsen AK. Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10: 1481-9.
5. Romano M, Frapolli R, Zangarini M, Bello E, Porcu L, Galmarini CM, García-Fernández LF, Cuevas C, Allavena P, Erba E, D'Incalci M. Comparison of in vitro and in vivo biological effects of trabectedin, lurbinectedin (PM01183) and Zalypsis® (PM00104). *Int J Cancer.* 2013; 133: 2024-33.
6. Damia G, Silvestri S, Carrassa L, Filiberti L, Faircloth GT, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int J Cancer.* 2001; 92: 583-8.
7. Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama SI, Popescu N, Kraemer KH, Pommier Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med.* 2001; 7: 961-6.
8. Herrero AB, Martín-Castellanos C, Marco E, Gago F, Moreno S. Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res.* 2006; 66: 8155-62.
9. Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guily J, Soria JC, Fouret P. Excision repair cross complementation group I immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3855-9.
10. Rocca CJ, Poindessous V, Soares DG, Quadrani KE, Sarasin A, Guérin E, de Gramont A, Henriques JA, Escargueil AE, Larsen AK. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80: 335-43.
11. Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JA, Larsen AK. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 13062-7.
12. Tavecchio M, Simone M, Erba E, Chiolo I, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M, Damia G. Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer.* 2008; 44: 609-18.
13. Schöffski P, Taron M, Jimeno J, Grosso F, Sanfilippo R, Casali PG, Le Cesne A, Jones RL, Blay JY, Poveda A, Maki RG, Nieto A, Tercero JC, Rosell R. Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: a retrospective multicentric study. *Eur J Cancer.* 2011; 47: 1006-12.
14. Monk BJ, Ghatage P, Parekh T, Henitz E, Knoblauch R, Matos-Pita AS, Nieto A, Park YC, Cheng PS, Li W, Favis R, Ricci D, Poveda A. Effect of BRCA1 and XPG mutations on treatment response to trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced ovarian cancer: exploratory analysis of the phase 3 OVA-301 study. *Ann Oncol.* 2015; 26: 914-20.
15. Balmaña J, Cruz C, Garber J, Perez Fidalgo JA, Lluch A, Tung N, Antolin S, Fernandez C, Kahatt C, Szyldergemajn S, Soto Matos A, Extremera S, Baselga J, Isakoff SJ. Lurbinectedin (PM01183) activity in BRCA1/2-associated or unselected metastatic breast cancer. Interim results of an ongoing phase II trial. *Cancer Res.* 2015; 75: Abstract nr P3-13-01.
16. Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer.* 2001; 37: 97-105.
17. Simoens C, Korst AE, De Pooter CM, Lambrechts HA, Pattyn GG, Faircloth GT, Lardon F, Vermorken JB. In vitro interaction between ecteinascidin 743 (ET-743) and radiation, in relation to its cell cycle effects. *Br J Cancer.* 2003; 89: 2305-11.
18. Benada J, Macurek L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules.* 2015; 5: 1912-37.
19. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003; 421: 499-506.
20. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature.* 2005; 434: 605-11.
21. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 616-27.
22. Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science.* 2001; 294: 1713-6.
23. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 2003; 300: 1542-8.
24. Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 2005; 19: 1040-52.

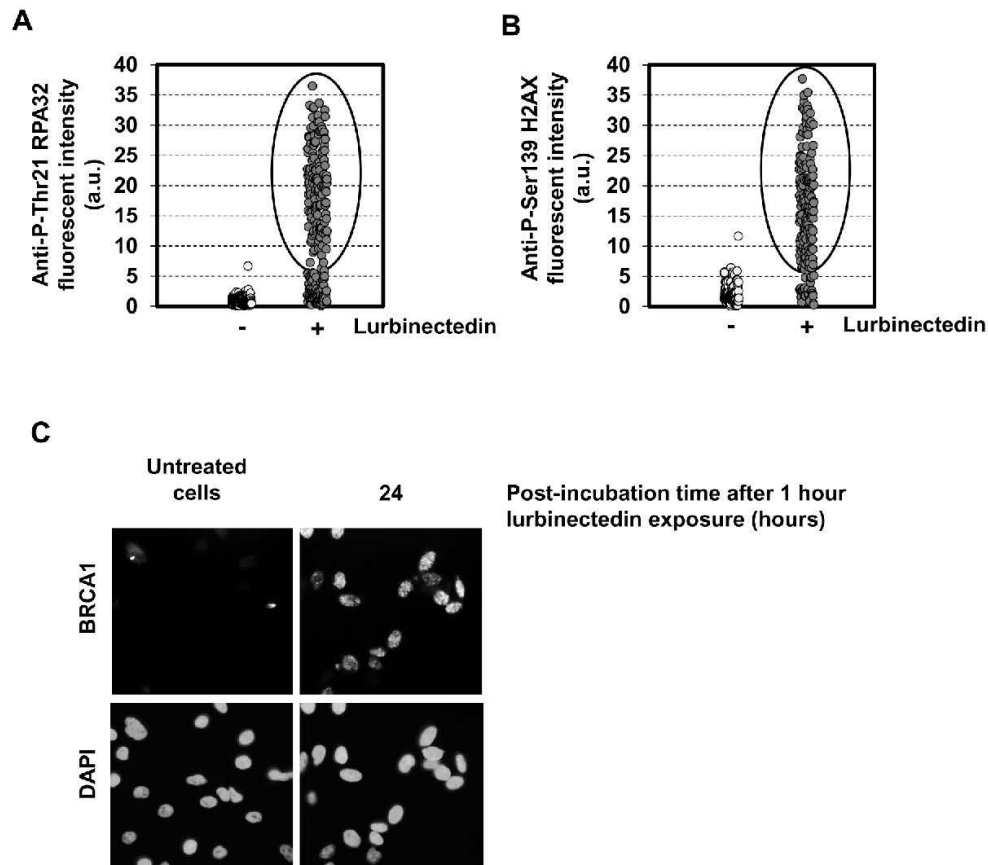
25. Reinhardt HC, Yaffe MB. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21: 245-55.
26. Shi W, Feng Z, Zhang J, Gonzalez-Suarez I, Vanderwaal RP, Wu X, Powell SN, Roti Roti JL, Gonzalo S, Zhang J. The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. *Carcinogenesis.* 2010; 31: 994-1002.
27. Murphy AK, Fitzgerald M, Ro T, Kim JH, Rabinowitsch AI, Chowdhury D, Schildkraut CL, Borowiec JA. Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *J Cell Biol.* 2014; 206: 493-507.
28. Oakley GG, Patrick SM. Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2010; 15: 883-900.
29. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.* 2010; pii: 920161.
30. Deem AK, Li X, Tyler JK. Epigenetic regulation of genomic integrity. *Chromosoma.* 2012; 121: 131-51.
31. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature.* 2003; 421: 961-6.
32. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2005; 123: 1213-26.
33. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell.* 2006; 21: 187-200.
34. Wang J, Gong Z, Chen J. MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. *J Cell Biol.* 2011; 193: 267-73.
35. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7:a016600.
36. Guirouilh-Barbat J, Redon C, Pommier Y. Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Mol Biol Cell.* 2008; 19: 3969-81.
37. Zabludoff SD, Deng C, Grondine MR, Sheehy AM, Ashwell S, Caleb BL, Green S, Haye HR, Horn CL, Janefka JW, Liu D, Mouchet E, Ready S, Rosenthal JL, Queva C, Schwartz GK, Taylor KJ, Tse AN, Walker GE, White AM. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 2955-66.
38. Golding SE, Rosenberg E, Valerie N, Hussaini I, Frigerio M, Cockcroft XF, Chong WY, Hummersone M, Rigoreau L, Menear KA, O'Connor MJ, Povirk LF, van Meter T, Valerie K. Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8: 2894-902.
39. Soares DG, Battistella A, Rocca CJ, Matuo R, Henriques JA, Larsen AK, Escargueil AE. Ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase drives both the early and the late DNA-damage response to the monofunctional antitumour alkylator S23906. *Biochem J.* 2011; 437: 63-73.
40. Prevo R, Fokas E, Reaper PM, Charlton PA, Pollard JR, McKenna WG, Muschel RJ, Brunner TB. The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13: 1072-81.
41. Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther.* 2015; 149: 124-38.
42. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004; 64: 2390-6.
43. Feuerhahn S, Giraudon C, Martínez-Diez M, Bueren-Calabuig JA, Galmarini CM, Gago F, Egly JM. XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids. *Chem Biol.* 2011; 18: 988-99.
44. Paulsen RD, Cimprich KA. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair.* 2007; 6: 953-66.
45. Martínez S, Pérez L, Galmarini CM, Aracil M, Tercero JC, Gago F, Albella B, Bueren JA. Inhibitory effects of marine-derived DNA-binding anti-tumour tetrahydroisoquinolines on the Fanconi anaemia pathway. *Br J Pharmacol.* 2013; 170: 871-82.
46. Bueren-Calabuig JA, Giraudon C, Galmarini CM, Egly JM, Gago F. Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 8248-57.
47. Ha L, Ceryak S, Patiemo SR. Generation of S phase-dependent DNA double-strand breaks by Cr(VI) exposure: involvement of ATM in Cr(VI) induction of gamma-H2AX. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 2265-74.
48. Wang J, Wiltshire T, Wang Y, Mikell C, Burks J, Cunningham C, Van Laar ES, Waters SJ, Reed E, Wang W. ATM-dependent CHK2 activation induced by anticancer agent, irrofulven. *J Biol Chem.* 2004; 279: 39584-92.
49. Wang Y, Wiltshire T, Senft J, Reed E, Wang W. Irofulven induces replication-dependent CHK2 activation related to p53 status. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 469-80.
50. Ortega-Atienza S, Wong VC, DeLoughery Z, Luczak MW, Zhitkovich A. ATM and KAT5 safeguard replicating chromatin against formaldehyde damage. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 198-209.

51. Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto K, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 6930-41.
52. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol.* 2014; 16: 2-9.
53. Raynard S, Niu H, Sung P. DNA double-strand break processing: the beginning of the end. *Genes Dev.* 2008; 22: 2903-7.
54. Tomimatsu N, Mukherjee B, Burma S. Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep.* 2009; 10: 629-35.
55. Duursma AM, Driscoll R, Elias JE, Cimprich KA. A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment. *Mol Cell.* 2013; 50: 116-22.
56. Teng PN, Bateman NW, Darcy KM, Hamilton CA, Maxwell GL, Bakkenist CJ, Conrads TP. Pharmacologic inhibition of ATR and ATM offers clinically important distinctions to enhancing platinum or radiation response in ovarian, endometrial, and cervical cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2015; 136: 554-61.
57. Koepfel F, Poindessous V, Lazar V, Raymond E, Sarasin A, Larsen AK. Irofulven cytotoxicity depends on transcription-coupled nucleotide excision repair and is correlated with XPG expression in solid tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5604-13.
58. Ouaret D, Larsen AK. Protein kinase C  $\beta$  inhibition by enzastaurin leads to mitotic missegregation and preferential cytotoxicity toward colorectal cancer cells with chromosomal instability (CIN). *Cell Cycle.* 2014; 13: 2697-706.
59. Escargueil AE, Larsen AK. Mitosis-specific MPM-2 phosphorylation of DNA topoisomerase IIalpha is regulated directly by protein phosphatase 2A. *Biochem J.* 2007; 403: 235-42.
60. Rocca CJ, Soares DG, Bouzid H, Henriques JA, Larsen AK, Escargueil AE. BRCA2 is needed for both repair and cell cycle arrest in mammalian cells exposed to S23906, an anticancer monofunctional DNA binder. *Cell Cycle.* 2015; 14: 2080-90.

## SUPPLEMENTARY FIGURES

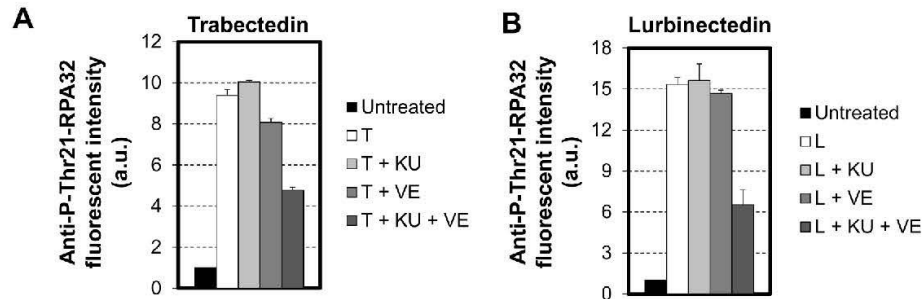


**Supplementary Figure S1: Trabectedin induces phosphorylation of RPA32 and H2AX that is followed by focalization of BRCA1.** **A.** HeLa cells were mock-treated or exposed to 20 nM trabectedin for 1 hour followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then fixed and processed for immunolabeling with an antibody directed against Thr21-phosphorylated RPA32. Left panel shows a typical image of Thr21-phosphorylated RPA32 obtained after exposure to trabectedin (trabectedin-treated cells) or no drug (untreated cells). The fluorescence intensities are indicated in arbitrary units (a.u.). At least 100 cells were analyzed for each condition. **B.** HeLa cells were mock-treated or exposed to 20 nM trabectedin for 1 hour followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then fixed and processed for immunolabelling with an antibody directed against Ser139-phosphorylated H2AX. Left panel shows a typical picture of Ser139-phosphorylated H2AX immunolabeling obtained after cells exposure to trabectedin (trabectedin treated cells) or no drug (untreated cells). The right panel shows the fluorescence intensities in single cells as quantified by Metamorph analysis. The fluorescence intensities are indicated in arbitrary units (a.u.). At least 100 cells were analyzed for each condition. **C.** HeLa cells were either untreated or incubated for 1 hour with trabectedin (20 nM) followed by 6 or 24 hours of post-incubation in drug-free media. Cells were then pre-permeabilized with ice-cold CSK-lysis buffer, fixed and immunolabeled with a BRCA1-directed antibody.



**Supplementary Figure S2: Lurbinedectin induces phosphorylation of RPA32 and H2AX that is followed by focalization of BRCA1.** **A.** HeLa cells were mock-treated (-) or exposed to 20 nM lurbinedectin (+) for 1 hour followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then fixed and processed for immunolabeling with an antibody directed against Thr21-phosphorylated RPA32. The fluorescence intensities in each single cell were quantified by Metamorph analysis and indicated in arbitrary units (a.u.). At least 100 cells were analyzed for each condition. **B.** HeLa cells were mock-treated (-) or exposed to 20 nM lurbinedectin (+) for 1 hour followed by 6 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then fixed and processed for immunolabelling with an antibody directed against Ser139-phosphorylated H2AX. The fluorescence intensities in individual cells were quantified by Metamorph analysis and are indicated in arbitrary units (a.u.). At least 100 cells were analyzed for each condition. **C.** HeLa cells were either untreated or incubated for 1 hour with lurbinedectin (20 nM) followed by 24 hours post-incubation in drug-free media. Cells were then pre-permeabilized with ice-cold CSK-lysis buffer, fixed and immunolabeled with a BRCA1-directed antibody.





**Supplementary Figure S3: Effect of checkpoint abrogators on the phosphorylation status of RPA32.** **A.** HeLa cells were exposed to 10 nM trabectedin for 1 hour in the absence (T, white column) or presence of 2  $\mu$ M KU-60019 (T + KU, light grey column), 1  $\mu$ M VE-821 (T + VE, medium grey column) or [2  $\mu$ M KU-60019 + 1  $\mu$ M VE-821] (T + KU + VE, dark grey column). This was followed by 24 hours post-incubation in the absence (T, white column) or presence of 2  $\mu$ M KU-60019 (T + KU, light grey column), 1  $\mu$ M VE-821 (T + VE, medium grey column) or [2  $\mu$ M KU-60019 + 1  $\mu$ M VE-821] (T + KU + VE, dark grey column). Cells were then fixed and immunolabeled with a Thr21-phosphorylated RPA32 directed antibody. Untreated cells were used as a negative control. The fluorescence intensities in individual cells were quantified by Metamorph analysis and are indicated in arbitrary units (a.u.). At least 100 cells were analyzed for each condition. Values represent the averages of at least two independent experiments and data are represented as mean  $\pm$  SD. **B.** Same as above, except that cells were treated with lurbinectedin.

---

## ***CAPÍTULO II***

---

#### **4 CAPÍTULO II - *Autophagy modulation influences oxaliplatin tolerance of colorectal cancer cells under low glucose environment***

### **APRESENTAÇÃO**

Neste capítulo está apresentado um manuscrito em fase de preparação que aborda a modulação da autofagia em células tratadas com oxaliplatina. O manuscrito demonstra que células de câncer colorretal tratadas com oxaliplatina em baixa disponibilidade de glicose apresentam maior viabilidade em comparação a células tratadas em alta concentração de glicose. Também é demonstrado que em condições de baixa glicose ocorre uma maior ativação da via autofágica nas células tratadas com oxaliplatina. O envolvimento da autofagia na resistência das células à oxaliplatina em baixa glicose foi testado através de modulação gênica e farmacológica desta via. O silenciamento de um gene essencial para a autofagia não foi suficiente para sensibilizar as células de câncer colorretal, sugerindo um mecanismo de resistência parcialmente independente da via autofágica. O manuscrito ainda apresenta dados que mostram êxito na sensibilização das células tratadas em baixa glicose através da super estimulação da autofagia com um indutor farmacológico.

O manuscrito será submetido para a revista *Biochemical Pharmacology*.

## **Autophagy modulation influences oxaliplatin tolerance of colorectal cancer cells under low glucose environment**

Diana L. Bordin<sup>1\* a</sup>, Michelle S. Lima<sup>1 a</sup>, Guido Lenz<sup>1</sup>, Marcos P. Thomé<sup>1</sup>, Daniele G. Soares<sup>2</sup>, Annette K. Larsen<sup>3,4,5</sup>, Lisiane B. Meira<sup>6</sup>, Alexandre E. Escargueil<sup>3,4,5, b</sup>, João A. P. Henriques<sup>1,7, b</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Alliance Pour la Recherche En Cancérologie (APREC), Hospital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France.

<sup>3</sup> Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris 75571, France.

<sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris, France.

<sup>5</sup> Institut Universitaire de Cancérologie, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universities, Paris, France.

<sup>6</sup> Faculty of Health and Medical Sciences, AY Building, University of Surrey, Guildford, Surrey GU2 7XH, United Kingdom.

<sup>7</sup> Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

\*New address: Department of Cancer Research and Molecular Medicine, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway.

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>b</sup>These authors share senior authorship

**Running title:** Autophagy modulation influences oxaliplatin tolerance of colorectal cancer cells under low glucose environment

**Keywords:** autophagy, low glucose, colorectal cancer, tumor microenvironment, oxaliplatin

**To whom correspondence should be addressed:**

Dr. João A.P. Henriques

Laboratório de Reparo de DNA em Eucariotos, Avenida Bento Gonçalves 9500, 43422/sala 210, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: + 55 51 33087602

Email: [pegas.henriques@gmail.com](mailto:pegas.henriques@gmail.com)

**Financial Support**

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (143345/2008-7 to D.L. Bordin), PRONEX/FAPERGS/CNPq (10/0044-3 to J.A.P. Henriques), CAPES/COFECUB [French-Brazilian collaborative research grant 583/07 to J.A.P. Henriques and A.K. Larsen].

**Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

The authors declare no potential conflicts of interest.

## ABSTRACT

Low glucose characterizes the microenvironment of solid tumors. Such condition can activate autophagy and contribute to tumor metabolism adaptation and survival. More recently, DNA damage has also been implicated in autophagy induction. Despite being chiefly a cell survival mechanism, chronic activation of autophagy may lead to cell death. Given this dual role, we assessed the contribution of autophagy to cell survival after oxaliplatin treatment in a panel of colorectal cancer cell lines cultured under low or high glucose environments. Low glucose significantly increased resistance to oxaliplatin in a subset of cell lines and induced autophagy through activation of AMPK and inhibition of mTOR. Surprisingly, genetic inhibition of autophagy by ATG7 knockdown did not significantly sensitize HCT-116 cells to oxaliplatin. Since overstimulation of autophagy can lead to cell death, we assessed the effect of rapamycin on oxaliplatin-treated cells, showing that rapamycin significantly sensitized cells to oxaliplatin in low glucose. Collectively, our data demonstrate that low glucose environment contributes to resistance to oxaliplatin treatment, and that this mechanism is only partly dependent of autophagy. Moreover, pharmacological activation of autophagy alongside oxaliplatin treatment under low glucose may represent an attractive chemotherapeutic strategy for colorectal cancer.

**Implication:** Low glucose environment contributes to resistance to oxaliplatin treatment, but this event can be attributed to activation of autophagy only to a certain extent. Still, pharmacological activation of autophagy combined with oxaliplatin promotes sensitivity to colorectal cancer cells treated in low glucose conditions.

## INTRODUCTION

The microenvironment of solid tumors represents a hostile condition to cancer cells. Rapid cell proliferation and poor vascularization result in low availability of oxygen and nutrients to cancer cells (Dang 2012). The mechanisms in which cancer cells survive this tumor microenvironment stress, maintain the metastatic spread and develop chemoresistance upon treatment, have been recently proposed (Semenza 2013; Mowers et al. 2018). Cells exposed to stress factors in the tumor microenvironment frequently activate autophagy as a pro-survival strategy (Mazure and Pouyssegur 2010; Fred and Vassiliki 2012; Das et al. 2018). Autophagy is a highly conserved process with an important role in cellular homeostasis. Autophagy acts by removing and recycling damaged/superfluous organelles and biomolecules in the cell (Mizushima and Levine 2010). Autophagy, therefore, represents not only a mechanism of stress response but also an alternative source of cellular energy in periods of starvation (Rosenfeldt and Ryan 2011). Thus, the high-energy demands of cancer cells combined with low nutrient availability features a state of metabolic stress that can be alleviated by autophagy.

Autophagy is initiated by the formation of the autophagosome, a double membrane structure that engulfs cytoplasmic components to be degraded. The next step is the fusion of autophagosomes with lysosomes, leading to autolysosome formation. The lysosomal hydrolases then digest the autolysosome cargo, releasing sugars, amino acids, nucleosides/nucleotides and fatty acids, back to the cytosol. Autophagy regulation is complex and involves multiple signaling pathways. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is the central control of autophagy, which is a downstream effector of PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt (Protein kinase B) pathway (Li et al. 2012). The mTOR/PI3K/Akt pathway acts in concert with AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase), an energy sensor kinase responsible for activating autophagy (Yang et al. 2011). mTOR and AMPK are able to oppositely regulate Ulk1/2 (UNC-51 like kinase 1 and 2) activity by direct phosphorylation. Activated mTOR inhibits autophagy through direct phosphorylation of the complex initiator of autophagy

Ulk1/2-Atg13 (Autophagy-related protein 13)-FIP200 (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD) (Akers et al. 2012). AMPK is activated by upstream kinases, such as LKB1 (Liver kinase B1), and inhibits mTOR mainly by phosphorylation of TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) and promotes autophagy by directly activating Ulk1 (Kim et al. 2011). Autophagy is also controlled by p53, which can inhibit mTOR and/or activate AMPK (Maiuri et al. 2009).

Autophagy can be activated not only in the context of tumor microenvironment but also in the presence of DNA damage induced by anti-cancer drugs (Rodriguez-Rocha et al. 2011). Cells under genotoxic stress trigger the DNA damage response (DDR), which coordinates many downstream processes including DNA repair, cell cycle checkpoints and cell death pathways. Increasing evidence suggest that the complex connection between DDR and autophagy involves several pathways including PARP (Poly (ADP-ribose polymerase), p53, JNK (c-Jun N-terminal kinase) and ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (Vessoni et al. 2013; Eliopoulos et al. 2016). Autophagy activation is generally considered as a pro-survival strategy employed by cells under stress (Yang et al. 2011; Roos et al. 2016). On the other hand, excessive autophagy caused by severe and prolonged stress leads to progressive degradation of cellular components which compromise cell viability and may contribute to cell death (Shen et al. 2012). However, the functional role of autophagy in the induction of cell death is still debated. Autophagy may precede another form of cell death or result from exhaustive attempt of the cells to survive stress, characterizing cell death with autophagic aspects (Shimizu et al. 2014). Since autophagy can have both cytoprotective and cytotoxic role, it becomes important to define its role in the response to different anti-cancer therapies. Therefore, a greater understanding of how cancer cells respond to stress conditions like those imposed by the tumor microenvironment and the genotoxic anticancer agents, as well as the role of autophagy in this context, can provide valuable information for the development of therapeutic strategies against solid tumors.



As previously mentioned, low concentrations of glucose can induce metabolic adjustments, such as autophagy, and interfere with the effectiveness of anticancer agents. Most investigations that evaluated autophagy induction by anticancer drugs were carried out in a nutrient-rich environment. Considering glucose, the conventional culture media can be considered a hyperglycemic environment as it contains 25 mM of glucose, compared with the concentration of glucose in the plasma which typically is around 5.5 mM (Güemes et al. 2016). Furthermore, tumor glucose concentrations can vary from 3 to 10-fold lower than non-tumor tissues, probably as a consequence of high glucose uptake and low tumor vascularization (Urasaki et al. 2012). In colon tissues, for example, Harayama *et al.* (Hirayama et al. 2009) found an average glucose concentration of  $1220 \pm 150$  and  $123 \pm 43$  nmol/g for normal and tumour tissues, respectively. Therefore, the availability of glucose for normal and tumor cells *in vivo* may differ widely and *in vitro* conditions are often not representative of the tumor microenvironment. The goal of this study was to evaluate the response of colorectal cancer cell lines to oxaliplatin (Ox) treatment continuously grown under low glucose (LG), a common condition present in the microenvironment of solid tumors. Ox is a third generation alkylating agent derived from platinum and has been effective in treating tumors unresponsive to cisplatin, especially colorectal cancer (Alcindor and Beauger 2011). In addition, we intended to establish whether oxaliplatin-induced autophagy is a cytoprotective or a cytotoxic mechanism employed by colorectal cancer cells under low levels of glucose. Our results showed that low levels of glucose contribute to the tolerance of colorectal cancer cell lines to Ox treatment and increase autophagy induction when compared to cells in a glucose-rich environment. The inhibition of autophagy by silencing ATG7 did not significantly sensitize cells under low glucose, suggesting that autophagy is not the main mechanism involved in Ox resistance. However, the overstimulation of autophagy by combining Ox and rapamycin, showed to be a promising alternative to the increased resistance to Ox in low glucose condition.

## **METHODS**

**Reagents and antibodies.** Oxaliplatin (Eloxatin) was obtained from Sanofi-Aventis. Chloroquine (CQ, #C6628), 3-methyladenine (3MA, #M9281), Rapamycin (Rap, #R0395), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, #M2128) and acridine orange (AO, #318337) were purchased from Sigma-Aldrich. The primary antibodies used in this study were: Atg7 (1:1000, #2631); mTOR (1:1000, #7C10); phospho-mTOR (Ser2448) (1:500, #5536); AMPK $\alpha$  (1:500, #23A3); phospho-AMPK (Thr172) (1:500, #2535), all from Cell Signaling Technology.  $\beta$ -actin (1:2000, #A1978) was used as loading control and was obtained from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies were goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5000, #sc-2004) or goat anti-mouse IgG-HRP (1:5000, #sc-2005) from Santa Cruz Biotechnology.

**Cell Culture.** Colorectal cancer wild-type (WT) cell line HCT-116 was a kind gift from Bert Vogelstein (Baltimore, MD) while HT-29 was kindly provided by Richard Camalier, (National Cancer Institute, Bethesda, MD). SW0-480 colon carcinoma cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and DLD-1 was kindly provided by Richard Hamelin (Paris, France). All cell lines were periodically tested for *Mycoplasma* contamination. HCT-116 and HT29 cell lines were authenticated at DNA Diagnostics Center (DDC) from Public Health England (PHE) using short tandem repeat (STR) methodology and reference sample comparison to ATCC STR profile database. All cells were used within 5 months of thawing a frozen vial. Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen) containing high glucose (HG, 25 mM glucose), a standard glucose concentration in culture media, or low glucose (LG, 2.5 mM glucose), a glucose concentration 10 fold lower than that used for standard cell culture. To obtain LG concentration, DMEM containing HG was diluted with DMEM without glucose (Invitrogen). Both media were supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

**Generation of ATG7 silenced cell line with lentiviral infection.** Knockdown (KD) of ATG7 gene in HCT-116 cells was achieved by transduction with lentiviral vectors produced with the plasmid clone NM\_028835.3-1655s21c1 from the

Mission RNAi library (Sigma-Aldrich). Non-target (PLKO.1-puro) sequence was used as control. Cells expressing control scrambled short hairpin (sh) RNA were denoted shCtrl and knockdown (KD) cells were denoted shATG7. Stable cells were selected with puromycin (4 µg/ml) and the Atg7 levels were detected by western blotting.

**Clonogenic assay.** We assessed the ability of HCT-116 WT cells exposed to different glucose concentrations to form colonies on a monolayer surface of a six-well plate. Cells were plated in 25 mM of glucose (HG media) and in three lower concentrations of glucose, namely 0.5, 2.5 and 5 mM. We also assessed the difference in colony formation between HCT-116 shCtrl and shATG7 treated with oxaliplatin for 120h in LG and HG. Cells were plated at a density of 200 cells / well and allowed to adhere, the culture media was replaced with fresh media and then cells were grown for 10 to 12 days. To visualize the colonies, media was removed, cells were fixed in 96% ethanol for 10 min and stained with a mixture of 0.5% crystal violet/20% methanol.

**Cell survival assay.** To compare the sensitivity to Ox of colorectal cancer cells cultured in HG and LG, HCT-116 WT, shCtrl and shATG7 cells were seeded at a density of  $7 \times 10^3$  cells per well in a 24 well-plate and treated continuously with different concentrations of Ox for 120 h. To evaluate cell survival of HCT-116 WT cells cultured in LG and treated with Ox in the presence or absence of Rap, cells were plated at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well in 24 well-plates and treated with Ox for 48 h. In order to stimulate autophagy with Rap, cells were treated with Ox for 24 h and then Rap (1 µM) was added into the media for an additional 24 h (48 h time point relative to Ox treatment). Prior to analysis, cells were kept in drug-free medium for additional 72 h. Following any of the treatments applied, cells were incubated with 0,4 mg/ml MTT salt for 2-3 h and the absorbance was measured at a wavelength of 540 nm. Cell survival curves obtained from this assay were used to calculate the IC<sub>50</sub> of Ox for HG and LG conditions.

**Flow cytometric quantification of acidic vesicular organelles (AVOs).** HCT-116 WT cells were treated during 48 h with increasing concentrations of Ox representing the IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> values derived from the MTT assay for HG and

LG conditions. HCT-116 shCtrl and shATG7 cells were treated during 48 h with concentrations of Ox representing the IC<sub>25</sub> values derived from the MTT assay for HG and LG conditions. Cells were harvested by trypsinization, washed in PBS and then stained with 1 µg/ml acridine orange (AO) for 15 min. AO fluorescence was measured immediately after staining by flow cytometry (GUAVA EasyCyte, Guava Technologies, Hayward, CA). Analysis was conducted as described in Thomé *et al.* (Thomé *et al.* 2016).

**GFP-LC3 overexpression and autophagosome detection.** Autophagosome formation was evaluated by transfection of HCT-116 WT cells with pEGFP-LC3 plasmid DNA (Addgene plasmid #21073), kindly provided by Dr. Tamotsu Yoshimori, using Lipofectamine™ LTX according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Transfected cells were treated with IC<sub>50</sub> of Ox for 48 h, fixed with 4% paraformaldehyde and then analyzed by fluorescence microscopy. The percentage of cells with at least 5 clear green dots in the cytosol was quantified by counting 100 green cells/sample.

**Apoptosis analysis.** Apoptosis was detected using the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC (1 µg/ml) and propidium iodide (PI, 1 µg/ml) (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). Cells were treated with IC<sub>50</sub> of Ox alone or in combination with Rap (1 µM) up to 48 h. After exposure to the different experimental conditions, cells were trypsinized and incubated with PI and Annexin V-FITC for 15 min at 37°C. The samples were then analyzed by flow cytometry (GUAVA EasyCyte, Guava Technologies, Hayward, CA).

**Western blot analysis.** Cells were washed with PBS and collected from plates with lysis buffer containing 10% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 6.8 and 1:10 w/v cocktail protease inhibitor (Roche Diagnostics). Proteins were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Equal amounts (30 µg) of proteins was resolved in a SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech). After transfer, membranes were blocked in 5% skimmed milk powder with 0.1% Tween 20. The blots were then probed at 4 °C overnight with the primary antibody. The primary antibody was detected by using a horseradish peroxidase (HRP) linked-secondary antibody.

Signals were detected using ECL western blotting substrate system or SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific) and X-ray films exposition (Kodak-Xmat).  $\beta$ -actin or comassie blue staining were used as loading controls.

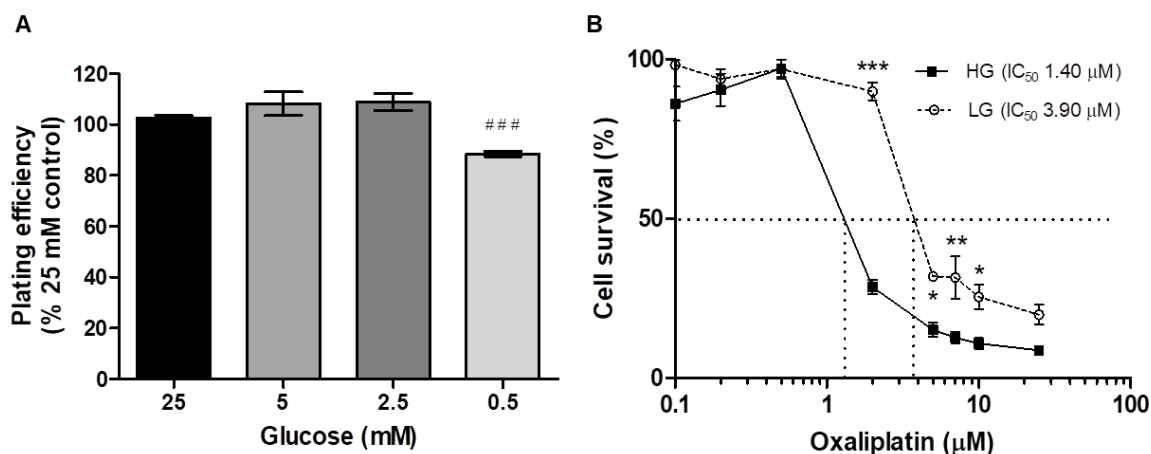
**Statistical analysis.** Data were expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. Each experiment was carried out at least in triplicate. Statistical analysis was conducted by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. 'P' value under 0.05 was considered significant. The IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> of Ox were determined using Nonlinear Regression (curve fit) test. All analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, CA, USA).

## RESULTS

**Low Glucose environment favors resistance to Ox treatment.** We first determined if the colony forming ability of colorectal cancer cells would be affected by glucose availability (Fig. 1A). For this, we performed clonogenic assays of HCT-116 cells grown either in low or high concentrations of glucose. We found that only the lowest concentration of glucose (0.5 mM), representing fifty times less glucose than that found in HG media, reduced colony forming ability of the cells. However, no difference in clonogenic capacity was observed for the concentrations of 5 and 2.5 mM of glucose, indicating that even in an environment containing 10 times less glucose (2.5 mM), HCT-116 cells can form colonies as efficiently as those cultured with high availability of glucose. Based on this result, 2.5 mM of glucose was selected for the experiments and will be hereafter referred simply as low glucose (LG).

Next, we evaluated survival of HCT-116 cells treated with different doses of Ox in HG and LG conditions. Cells treated in LG showed increased survival compared to cells treated in HG and demonstrated a 2.4-fold increase in the IC<sub>50</sub> of Ox (Fig. 1B). We also evaluated whether Ox resistance is induced by the LG environment for other colorectal cancer cell lines. Among the cell lines we tested,

SW-480 (Suppl. 1A) also showed higher survival when treated with Ox in LG, whereas DLD-1 (Suppl. 1B) and HT-29 (Suppl. 1C) cell lines showed a very similar pattern of sensitivity to Ox regardless the glucose concentration in the media.



**Figure 1. Impact of different levels of glucose on clonogenic survival and sensitivity to Ox. (A)** Clonogenic assay was performed with cells cultured continuously under HG (25 mM) and LG concentrations (5, 2.5 and 0.5 mM). **(B)** Cell survival determined by MTT assay in HCT-116 cells treated with Ox for 120 h in HG and LG. Data from three to four experiments are presented as mean  $\pm$  SE. ###  $P < 0.001$ , versus 25 mM of glucose, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  versus respective doses in HG.

**Ox induces autophagy in HCT116 cells treated under HG and LG conditions.**

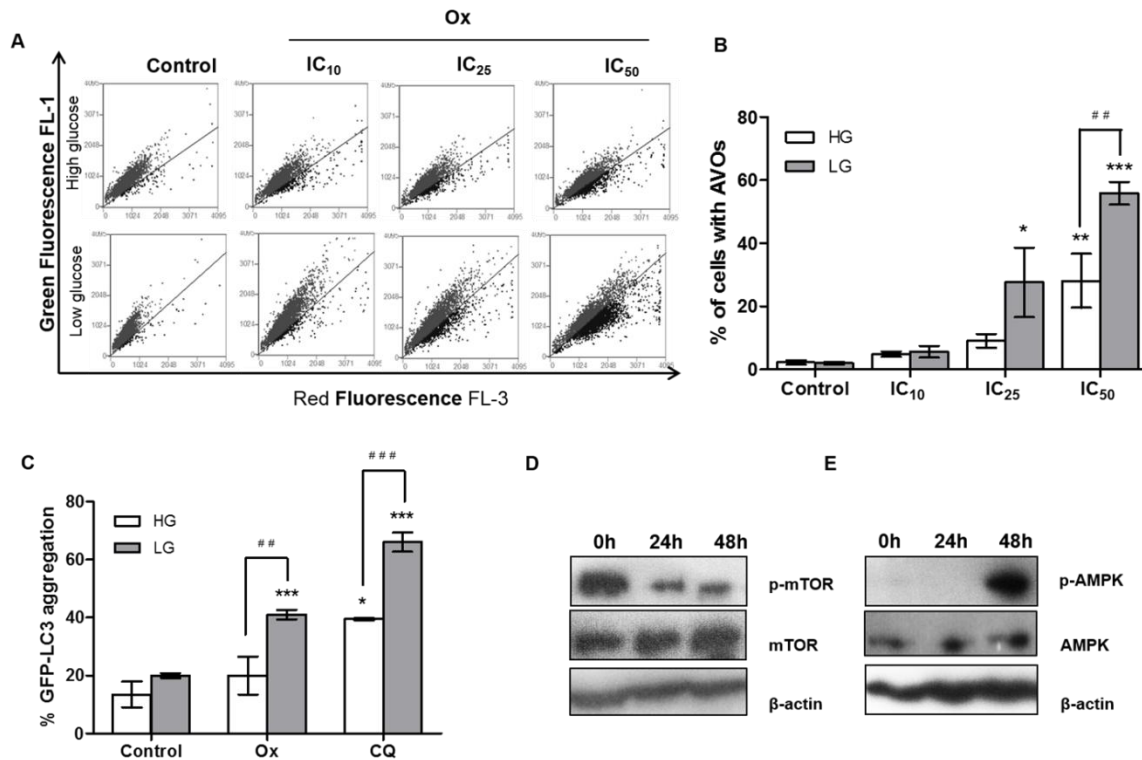
In order to evaluate whether autophagy activation may explain the cytoprotection observed when cells were treated with Ox under LG, we measured autophagy induction by acridine orange staining. Autophagy is characterized by the formation of acidic vesicular organelles (AVO) (Chen and Sanchez 2004) which increase the red fluorescence with acridine orange staining. Cells cultured in HG or LG were treated with different doses of Ox corresponding to the IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> values. AVO were detected 48 h after treatment as measured by flow cytometry under both glucose conditions, indicating that Ox can induce autophagy independently of the glucose concentration. However, a significant increase in AVO formation in

cells under HG conditions was detected only at the highest Ox dose tested (Fig. 2A, B), whereas AVO formation was significantly increased at lower Ox doses in cells under LG conditions. These results suggest that the LG environment favors autophagy activation in response to Ox. Moreover, it is noteworthy that, at the highest Ox dose tested, AVO formation was 2-fold higher under LG than HG condition (Fig. 2B).

Autophagy was also evaluated by assessment of autophagosome formation after Ox treatment. LC3, a mammalian orthologue of yeast Atg8, is post-translationally processed into LC3I, a cytoplasmic form of the protein. In the presence of an autophagic signal, LC3I is converted into the LC3II form, which associates with the autophagosome membranes (Mizushima et al. 2011). The conversion of LC3I to LC3II is considered a reliable marker of autophagy (Mizushima 2007). Transfection with the pEGFP-LC3 plasmid allows the visualization of the punctate aggregation and accumulation of GFP-LC3II by fluorescence microscopy, which indicates the formation of autophagosomes. After 48 h treatment with Ox, we observed a significant increase in the percentage of cells showing GFP-LC3 punctate aggregation in LG conditions when compared with control and HG conditions (Fig. 2C). As a positive control, cells cultured under HG and LG were treated with CQ. CQ is an intralysosomal neutralizer which prevents the fusion of lysosomes with autophagosomes and consequently causes an accumulation of autophagosomes preventing the degradation of its contents (Kimura et al. 2013). Significant higher levels of GFP-LC3 punctate aggregation were detected in LG in comparison to HG when cells were treated with CQ, which may suggest higher autophagy activity under LG condition.

**Ox treatment in LG environment leads to inhibition of mTOR phosphorylation and AMPK activation.** As discussed earlier, both mTOR/PI3K/Akt and AMPK pathways have been involved in the activation of autophagy. To determine whether Ox increases autophagy in LG conditions via mTOR/AMPK pathway, HCT-116 cells continuously cultured in LG were treated with Ox for 24 h and 48 h and both total and phosphorylated mTOR and AMPK levels were assessed by Western blotting. Compared to control, there was a

noticeable decrease in mTOR phosphorylation at 24 h and 48 h after Ox treatment (Fig. 2D). Strikingly, AMPK phosphorylation levels were increased 48 h after Ox treatment relative to levels found in control samples or samples from the 24 h time point (Fig. 2E). These results strongly suggest that the inhibition of mTOR combined with the activation of AMPK cooperate to induce autophagy in response to Ox in LG conditions.



**Figure 2. Autophagy induction by Ox in HCT-116 colorectal cancer cells and mTOR/AMPK expression in LG conditions.** Representative flow cytometry dot plots (A) and quantification (B) of AVO after acridine orange staining in cells treated with increasing doses of Ox for 48 h under either HG or LG conditions. (C) Quantification of GFP-LC3–transfected HCT-116 cells 48 h after Ox (IC<sub>50</sub>) treatment in HG and LG conditions. CQ (10 μM) was used as a positive control. (D) Reduced expression of p-mTOR and (E) activation of AMPK detected by western blot after 24 h and 48 h of Ox treatment. Results are shown as mean ± SE from three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  versus respective controls. ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$ .



**Autophagy inhibition by ATG7 knockdown does not significantly sensitize HCT-116 cells to Ox.** Autophagosomes are vesicles resulting from the elongation of the phagophore, which is elongated by two ubiquitin-like systems that require the action of the activating enzyme Atg7. In the first system, Atg12 and Atg5 are conjugated by Atg7 and Atg10. In the second one, Atg7 and Atg3 mediate the conjugation of PE (phosphatidylethanolamine) and LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3) to generate the lipidated form of LC3 (LC3-II) (Singh et al. 2017). Giving the key role of Atg7 protein in autophagy, we generated a stable ATG7 KD cell line with lentiviral infection in order to determine whether autophagy plays a role in the survival of Ox-induced DNA damage under LG conditions.

The levels of Atg7 protein were assessed by western blot (Fig. 3A). Control shCtrl and KD shATG7 cells were treated with Ox under LG and HG and autophagy induction was measured by acridine orange staining. Upon treatment of the dose of Ox tested ( $IC_{25}$ ), ATG7 silencing did not affect the amount of AVO formed in glucose-rich environment (Fig.3B). However, knockdown of ATG7 led to a significant reduction (approximately 50%) in AVO after Ox treatment in LG condition compared to shCtrl (Fig. 3C).

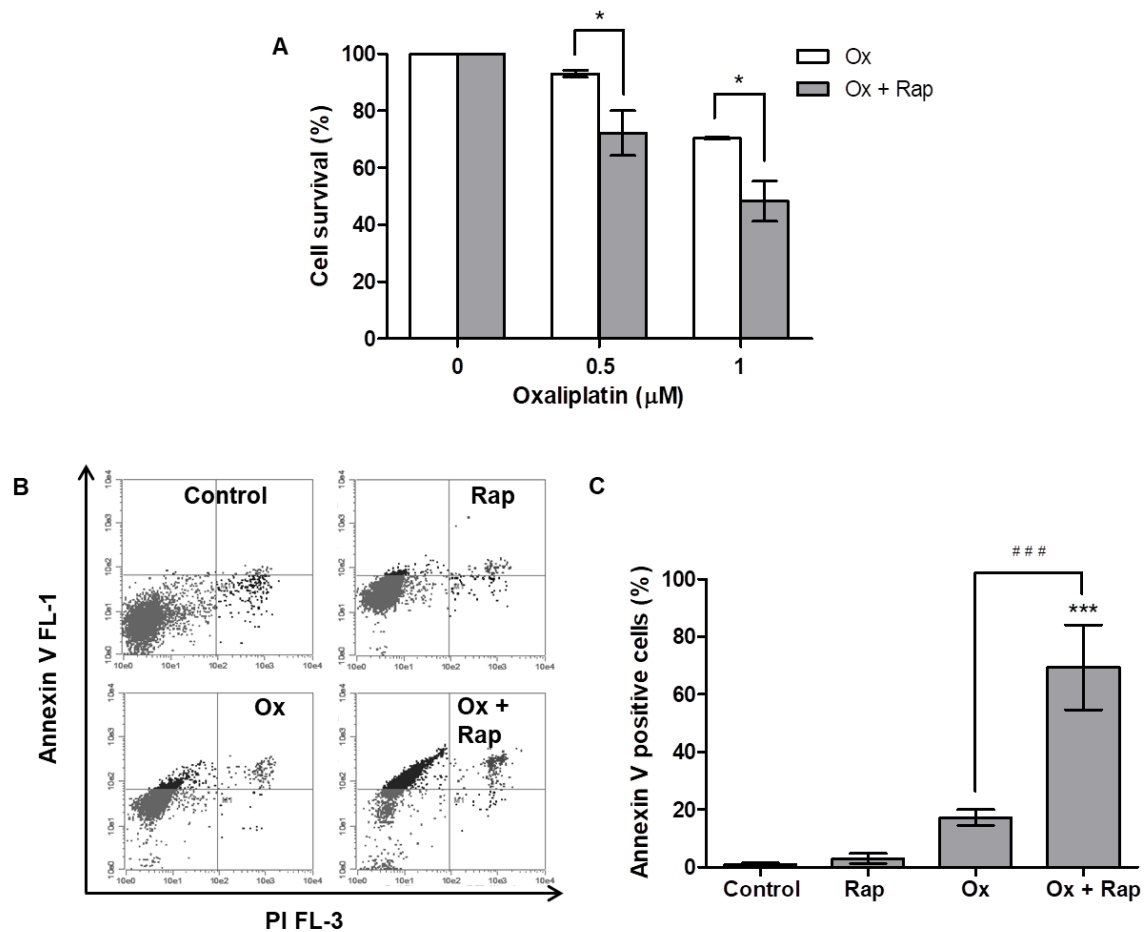
Next, we evaluated whether ATG7 KD could sensitize cells to Ox in cells constantly exposed to low glucose environment. Although ATG7 KD caused a significant decrease in autophagy induction upon Ox treatment in LG, no impact on cell viability was observed (Fig. 3D, E). In line with this survival assay, a similar result was obtained with colony formation capacity, which was not affected by ATG7 KD regardless the glucose concentrations (Fig. 3F,G). The lack or mild sensitivity detected upon ATG7 KD suggests that autophagy plays a minor role behind Ox resistance under LG at least under the glucose concentration tested. In parallel with ATG7 KD, we also verified the sensitivity of HCT-116 WT cells upon pharmacological inhibition of autophagy. For this purpose, WT cells were pre-treated with 3MA in order to inhibit the initial steps of autophagy, followed then by Ox treatment (Suppl. 2). Unlike ATG7 KD, 3MA was able to decrease cell viability

in response to Ox treatment and ATP supply (Suppl. 2A, D) as well as to increase the number of cells undergoing apoptosis (Suppl. 2E, F)

**Figure 3. ATG7 knockdown impairs autophagy activation in LG but does not sensitize cells to oxaliplatin.** (A) Reduced expression of Atg7 in ATG7 KD cells (shATG7). (B) Quantification of AVO after acridine orange staining in cells treated with IC25 doses of Ox for 48 h under HG and (C) LG conditions. (D) Cell survival determined by MTT assay in HCT-116 shCtrl and shATG7 cells treated with Ox for 120 h in HG and (E) LG. (F) Clonogenic survival after treatment with 1  $\mu$ M of Ox for 120 h in HG and (G) LG. \*,  $P < 0.05$  versus OxIC25 and control; #  $P < 0.05$  versus respective dose between shATG7 and shCtrl.

**Overstimulation of autophagy induces apoptotic cell death in Ox-treated cells under LG conditions.** Modulation of autophagy has become a strategy of great interest in cancer treatment in order to enhance the effects of chemotherapy (Yang et al. 2011). Stressful environmental conditions may lead to constant activation of the autophagic pathway and subsequently cell death. In an attempt to sensitize HCT116 cells to Ox in low glucose condition, we thus examined the effect of overstimulation of this pathway in cells cultured under LG conditions by combining Rap with Ox. Rap is a conventional inducer of autophagy acting via mTOR inhibition (Jung et al. 2010). The inhibition of mTOR induced by Rap combined with the reduced phosphorylation of mTOR observed after Ox treatment in LG conditions should lead to a drastic decrease of mTOR activity.

We evaluated the effect of mTOR inhibition using Rap in combination with Ox on cell viability and apoptosis induction in cells cultured in LG. Co-treatment of cells with Ox and Rap led to a significant decrease in cell survival when compared to cells treated only with Ox (Fig. 4C). This phenomenon was accompanied by a strong apoptosis induction as shown by the 4-fold increase in the population of Annexin-V positive cells with combined Ox + Rap treatment, compared to cells exposed to Ox alone (Fig. 4D, E). Together, these data demonstrate that Rap sensitizes cells to Ox treatment under LG conditions by enhancing autophagy and eliciting apoptosis.



**Figure 4. Effect of Rap combined with Ox on cell survival and apoptosis induction in LG conditions. (A)** Cell survival of HCT-116 cells treated with Ox in the presence or absence of Rap. **(B)** Flow cytometric analysis of apoptotic cells after treatment with Ox in the presence or absence of Rap. **(C)** Quantification of the data presented in (B). Data are representative of at least three independent replicates. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  versus control; ###,  $P < 0.001$ .

## DISCUSSION

Solid tumors display regional differences in glucose and oxygen levels due to insufficient blood supply (Zeng et al. 2015). In order to survive and sustain proliferation in such hostile environment, cancer cells undergo metabolic adjustments which can interfere with the response to chemotherapy and lead to

chemoresistance (Berardi and Fantin 2011). Therefore, a better understanding of the metabolic adaptations employed by cancer cells is needed for the development of more effective cancer treatment. Based on this, we analyzed the response of colorectal cancer cell lines cultured continuously under HG or LG environments to the chemotherapeutic agent Ox. We show that LG significantly altered the sensitivity to Ox of HCT-116 and SW-480 cells, rendering them more resistance to Ox treatment. However, similar results were not observed for the other cell lines we examined, namely HT-29 and DLD-1, which both showed a similar response to Ox regardless of the glucose concentration. It has been recently shown that the genetic profile of tumors can influence cancer cell metabolism and consequently alter the sensitivity to chemotherapy (Yuneva et al. 2013). Furthermore, different responses to glucose limitation among cancer cell lines could also be attributed to defects in glucose utilization and mitochondrial function (Birsoy et al. 2014). Although glucose availability modulated the response to Ox treatment only in a subset of our cell lines, it is noteworthy that LG rendered the affected cell lines more resistant to Ox treatment. This clearly shows that glucose levels can influence the response of colorectal cancer cells to chemotherapy warranting further investigation. One possible explanation could be the fact that glucose transporters are often deregulated in several types of cancer due to high energy demands. Therefore, it is likely that GLUT1 and GLUT3 are overexpressed in the case of glucose deprivation and that this overexpression could contribute to treatment resistance (Ancey et al. 2018).

Other adaptive mechanism adopted by cancer cells in the response to a non-favorable tumor microenvironment is activation of autophagy (Amaravadi et al. 2016). The low availability of glucose in the tumor microenvironment is one cause of autophagy upregulation (Moruno et al. 2012). Glucose is an important source of energy and autophagy activation can restore intracellular ATP levels in case of glucose shortage. Besides tumor microenvironmental factors, DNA damaging agents can also trigger autophagy usually in a cytoprotective manner (Bordin et al. 2013). The stimulation of autophagy after DNA damage contributes to enhancing the production of ATP to be used in DNA repair processes, thereby preventing genomic instability or cell death (Rodriguez-Rocha et al. 2011). DNA

damaging drugs, such as cisplatin and 5-fluorouracil, were found to increase the formation of autophagosomes in hepatocarcinoma cell lines. Moreover, pharmacological or genetic autophagy inhibition led to loss of mitochondrial membrane potential and a significant increase in apoptotic cell death, indicating that autophagy played a pro-survival role in response to genotoxic stress (Pan et al. 2011). Similar findings have reported that autophagy induction after DNA damage delays apoptosis and prolongs cell survival (Guo et al. 2012).

Here, we show that Ox treatment activated autophagy in HCT-116 cells cultured under both glucose conditions tested. However, autophagy induction was more prominent in cells treated under LG as evidenced by higher AVO formation and number of autophagosomes when compared to HG conditions. Ox has been previously implicated in the induction of autophagy via generation of reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma (Ding et al. 2011). Furthermore, it has been shown that autophagy activation prevents apoptosis in a variety of cancer cell lines such as gastric cancer and hepatocellular carcinoma and may function importantly in resistance to Ox (Ding et al. 2011; Xu et al. 2011).

We also demonstrated that Ox treatment and LG environment synergized to activate AMPK and reduce the phosphorylation of mTOR under LG conditions. It has been previously demonstrated that Ox treatment significantly inhibits mTOR phosphorylation and activates autophagy in gastric cancer MGC803 cells (Lee et al. 2011). mTOR serves as a major negative regulator of autophagy and its inhibition may occur by genotoxic stress even when the cell is properly supplied with energy (Budanov and Karin 2009; Maiuri et al. 2009). In addition, low levels of nutrients are mainly sensed by AMPK and its activation also contributes to inhibit mTOR and upregulate autophagy (Hardie et al. 2012).

Based on these findings we decided to modulate autophagy in order to investigate if the resistance observed in cells treated in LG conditions is due to autophagy activation. Modulation was achieved by genetic and pharmacological inhibition means. Regarding genetic inhibition, it is important to note that the profile of higher cell viability when cells are treated in LG is also present in shCtrl and shATG7 cells. Surprisingly, autophagy impairment by ATG7 KD had no significant

impact on cell viability (Fig. 3). These data suggest that the mechanism of resistance to Ox in LG conditions can be partly independent of the autophagic pathway. The idea of pharmacological inhibition may be attractive to overcome resistance, but when we consider the off-targets of inhibitors it can be challenging to predict the exact mechanism of cell death. 3MA for instance, can lead to autophagy impairment by inhibition of class III PI3K, but it can also induce cell death by mechanisms independent of autophagy (Zheng et al. 2015). Studies demonstrate that 3MA can even inhibit class I PI3K and also depress drug efflux transporters (Zou et al. 2014).

The stage at which autophagy is inhibited may also lead to diverse outcomes (Bhat et al. 2018). In this scenario, our group has recently showed that the inhibition of temozolomide-induced autophagy at early stages with 3MA triggered apoptosis in glioblastoma, while the inhibition of late stage autophagy with bafilomycin had no effect (Filippi-chiela et al. 2015). Therefore, the outcome of autophagy inhibition may be related to the cellular context, such as the autophagy stimuli and the extent of damage.

In general, autophagy has been associated with resistance to chemotherapy, but conflicting results have been found depending on cell type, drug used and extent of cellular damage (Wilde et al. 2018). Autophagy inhibition has been shown effective in increasing chemosensitivity of different tumor models *in vivo* and *in vitro* (Choi 2012). However, under conditions of prolonged stress, overstimulation of autophagy can also serve as a strategy to promote cell death (Coates et al. 2010). Rapamycin, an mTOR inhibitor and well-known autophagy activator, was shown to increase the efficacy of selected anticancer therapies in *in vivo* and *in vitro* models (Granville et al. 2007; Xie and Dong 2013). We found that Rap significantly reduced cell survival and strikingly increased apoptotic cell death when combined to Ox treatment. Therefore, autophagy modulation by overstimulating this pathway may be a viable therapeutic option for cancer cells treated with DNA damaging agents under a nutrient-deficient microenvironment. Moreover, confirming that mTOR inhibition is a promising target for cancer therapy, everolimus, a targeted mTOR inhibitor, has shown to be effective alone

and to potentiate the antitumor effect of drugs such as cisplatin and doxorubicin *in vivo* (O'Reilly et al. 2011).

In conclusion, our data show that LG environment can confer resistance to colorectal cancer cells treated with the alkylating agent Ox and that autophagy activation may be only partly involved in the tolerance of HCT-116 cells to Ox. This study also shows that autophagy modulation by overstimulation of this pathway represents a potential useful tool to sensitize colorectal cancer cells to Ox treatment.

## REFERENCES

- Alcindor T and Beauger N (2011) Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol* 18:18–25.
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S and Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32:2–11.
- Amaravadi R, Kimmelman AC and White E (2016) Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* 30:1913–30.
- Ancey P-B, Contat C and Meylan E (2018) Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *The FEBS Journal*
- Berardi MJ and Fantin VR (2011) Survival of the fittest: Metabolic adaptations in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 21:59–66.
- Bhat P, Kriel J, Shubha B, Swamy N and Loos B (2018) Modulating autophagy in cancer therapy : Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol* 147:170–182.
- Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, Wang T, Chen WW, Clish CB and Sabatini DM (2014) Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *508:108–112.*
- Bordin DL, Lima M, Lenz G, Saffi J, Meira LB, Mésange P, Soares DG, Larsen AK, Escargueil AE and Henriques JAP (2013) DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat Res Rev Mutat Res* 753:91–99.
- Budanov A V and Karin M (2009) The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling. *Cell* 134:451–460.
- Chen Y and Sanchez Y (2004) Chk1 in the DNA damage response: Conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair* 3:1025–1032.
- Choi KS (2012) Autophagy and Cancer. *Exp Mol Med* 44:109–120.
- Coates JM, Galante JM and Bold RJ (2010) Cancer therapy beyond apoptosis: Autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *J Surg Res* 164:301–308.
- Dang C V. (2012) Links between metabolism and cancer. *Genes Dev* 26:877–890.
- Das CK, Mandal M and Kögel D (2018) Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metast Rev* 1–18.
- Ding Z Bin, Hui B, Shi YH, Zhou J, Peng YF, Gu CY, Yang H, Shi GM, Ke AW, Wang XY et al. (2011) Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen



species modulation. *Clin Cancer Res* 17:6229–6238.

Eliopoulos AG, Havaki S and Gorgoulis VG (2016) DNA damage response and autophagy: A meaningful partnership. *Front Genet* 7:1–13.

Filippi-chiela EC, Manssur M, Thom MP and Lenz G (2015) Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 11:1099–1113.

Fred L and Vassiliki K (2012) Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 23:395–401.

Granville CA, Warfel N, Tsurutani J, Hollander MC, Robertson M, Fox SD, Veenstra TD, Issaq HJ, Linnoila RI and Dennis PA (2007) Identification of a highly effective rapamycin schedule that markedly reduces the size, multiplicity, and phenotypic progression of tobacco carcinogen - Induced murine lung tumors. *Clin Cancer Res* 13:2281–2289.

Güemes M, Rahman SA and Hussain K (2016) What is a normal blood glucose? *Arch Dis Child* 101:569–574.

Guo X-L, Li D, Hu F, Song J-R, Zhang S-S, Deng W-J, Sun K, Zhao Q-D, Xie X-Q, Song Y-J et al. (2012) Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 320:171–9.

Hardie DG, Ross FA and Hawley SA (2012) AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:251–262.

Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M et al. (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69:4918–4925.

Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM and Kim D-H (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584:1287–1295.

Kim J, Kundu M, Viollet B and Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132–41.

Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A and Isaka Y (2013) Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 73:3–7.

Lee S-J, Ryter SW, Xu J-F, Nakahira K, Kim HP, Choi AMK and Kim YS (2011) Carbon Monoxide Activates Autophagy via Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:867–873.

Li Y, Zhang J, Chen X, Liu T, He W, Chen Y and Zeng X (2012) Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer. *Am J Med Sci* 343:155–161.

Maiuri MC, Malik SA, Morselli E, Kepp O, Criollo A, Mouchel P-L, Carnuccio R and Kroemer G (2009) Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle* 8:1571–6.

Mazure NM and Pouyssegur J (2010) Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival? *Curr Opin Cell*

Biol 22:177–180.

Mizushima N (2007) Autophagy : process and function. *Genes Dev* 21:2861–2873.

Mizushima N and Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12:823–830.

Mizushima N, Yoshimori T and Ohsumi Y (2011) The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132.

Moruno F, Pérez-Jiménez E and Knecht E (2012) Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells. *Cells* 1:372–395.

Mowers EE, Sharifi MN and Macleod KF (2018) Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J* 285:1751–1766.

O'Reilly T, McSheehy PMJ, Wartmann M, Lassota P, Brandt R and Lane HA (2011) Evaluation of the mTOR inhibitor, everolimus, in combination with cytotoxic antitumor agents using human tumor models in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 22:58–78.

Pan Y, Gao Y, Chen L, Gao G, Dong H, Yang Y, Dong B and Chen X (2011) Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy. *Clin Cancer Res* 17:3248–58.

Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI and Franco R (2011) DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 711:158–166.

Roos WP, Thomas AD and Kaina B (2016) DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 16:20–33.

Rosenfeldt MT and Ryan KM (2011) The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 32:955–63.

Semenza GL (2013) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33:207–214.

Shen S, Kepp O and Kroemer G (2012) The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8:1–3.

Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M and Arakawa S (2014) Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci* 15:3145–53.

Singh SS, Vats S, Chia AY-Q, Tan TZ, Deng S, Ong MS, Arfuso F, Yap CT, Goh BC, Sethi G et al. (2017) Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 37:1142–1158.

Thomé MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Migliavaca CB, Onzi GR, Felipe KB and Lenz G (2016) Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science* 129:4622–4632.

Urasaki Y, Heath L and Xu CW (2012) Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B

monoubiquitination in tumors. PLoS ONE 7:1–5.

Vessoni AT, Filippi-chiela EC, Menck CFM and Lenz G (2013) Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ* 20:1444–1454.

Wilde L, Tanson K, Curry J and Martinez-Outschoorn U (2018) Autophagy in cancer : a complex relationship. *Biochem J* 475:1939–1954.

Xie Z-G and Dong Q-R (2013) Inhibition of the mammalian target of rapamycin leads to autophagy activation and cell death of MG63 osteosarcoma cells. *Oncol Lett* 1465–1469.

Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ and Zhang Y (2011) Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer* 30:490–496.

Yang ZJ, Chee CE, Huang S and Sinicrope F a (2011) The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 10:1533–41.

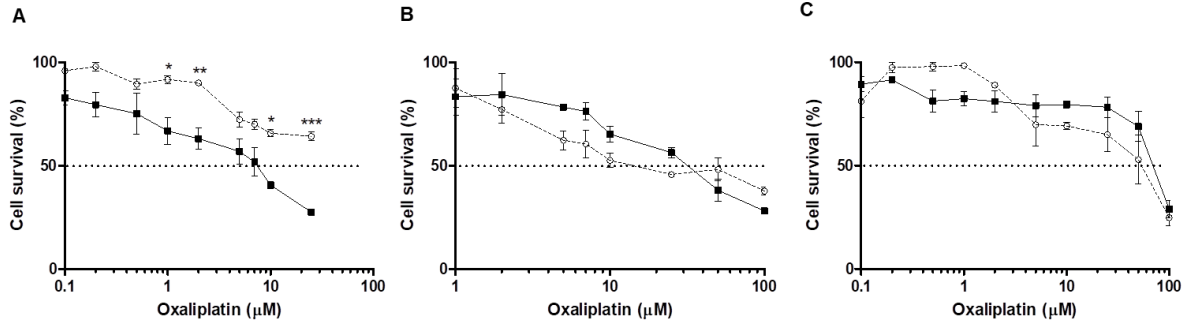
Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Dana V, Tsukamoto T, Matés JM, Alonso FJ, Wang C, Seo Y et al. (2013) The Metabolic Profile of Tumors Depends on both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metab* 15:157–170.

Zeng W, Liu P, Pan W, Singh SR and Wei Y (2015) Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. *Cancer Lett* 356:263–267.

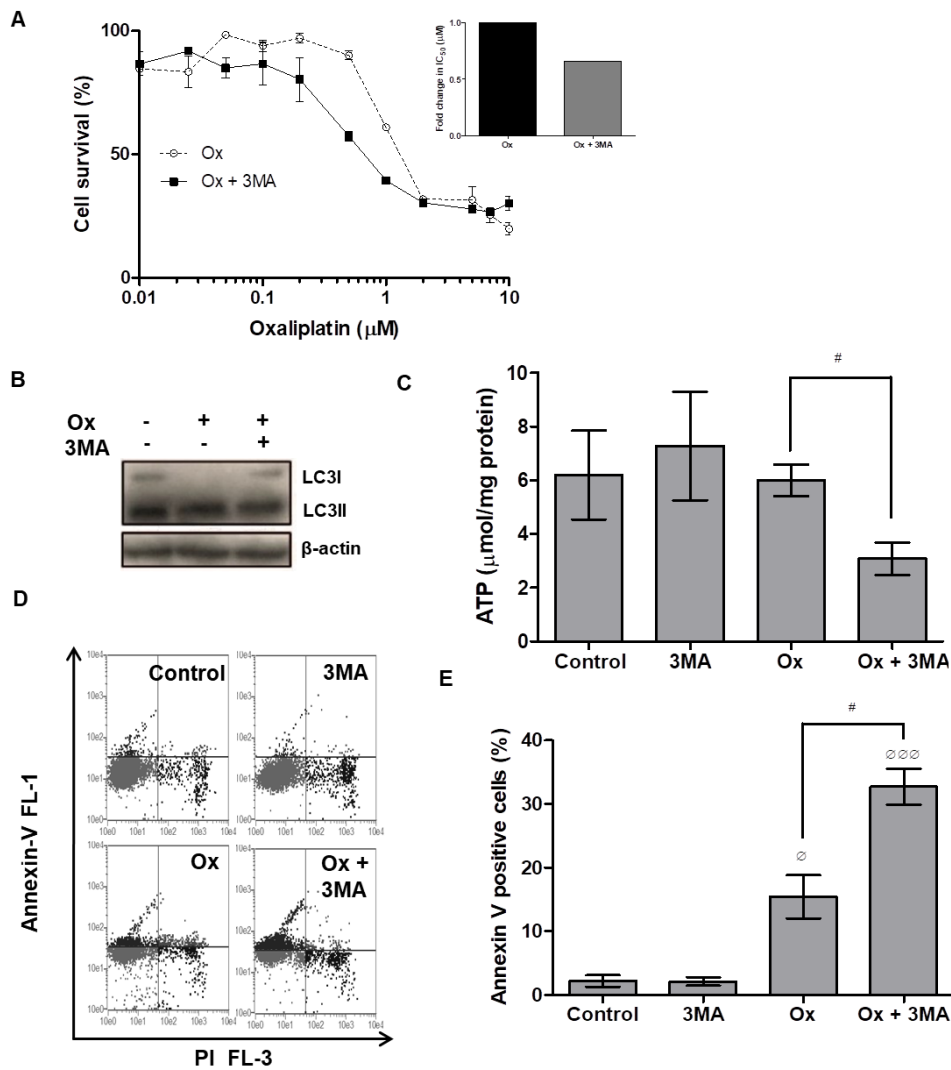
Zheng XY, Li LJ, Li W, Jiang PF, Shen HQ, Chen YH and Chen X (2015) Low concentrations of chloroquine and 3-methyladenine suppress the viability of retinoblastoma cells synergistically with vincristine independent of autophagy inhibition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253:2309–2315.

Zou Z, Zhang J, Zhang H, Liu H, Li Z, Cheng D, Chen J, Liu L, Ni M, Zhang Y et al. (2014) 3-Methyladenine can depress drug efflux transporters via blocking the PI3K-AKT-mTOR pathway thus sensitizing MDR cancer to chemotherapy. *J Drug Target* 22:839–848.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Supplementary Figure 1. Impact of glucose levels on the sensitivity to Ox treatment in different colorectal cancer cell lines.** Cell survival was determined by MTT assay for **(A)** SW-480; **(B)** DLD-1 and **(C)** HT-29 cells treated with Ox for 120 h in HG (squares) and LG (circles). Results are from three to four independent experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , versus the corresponding doses under HG conditions.



**Supplementary Figure 2. Autophagy inhibition with 3MA sensitizes HCT-116 cells treated with Ox in LG condition. (A)** Cell survival under LG conditions to Ox treatment in the presence or not of 3MA or CQ and fold change in  $IC_{50}$  of Ox. **(B)** Survival of cells cultured in HG and treated during 48 h with Ox in the presence or absence of 3MA and fold change in  $IC_{50}$  of Ox. **(C)** Western blot analysis of LC3II/LC3I expression in Ox + 3MA treated cells in LG. **(D)** Intracellular levels of ATP in cells treated in LG in the presence or absence of 3MA. **(E)** Flow cytometric dot plots of Annexin-V positive cells after Ox treatment in the presence or absence of 3MA. **(F)** Quantification of the data presented in (E). Data are presented as mean  $\pm$  SE based on at least three independent experiments.  $\emptyset$ ,  $P < 0.05$ ;  $\emptyset\emptyset\emptyset$ ,  $P < 0.001$ , versus respective controls. #,  $P < 0.05$ .

---

## ***DISCUSSÃO GERAL***

---

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Na tentativa de melhorar a eficácia das terapias anticâncer, a modulação de vias que são ativadas em resposta ao tratamento surge como estratégia promissora. A administração de quimioterápicos que causam danos no DNA pode ser feita em combinação com moduladores da DDR. A DDR é uma rede orquestrada que envolve múltiplos sensores de dano, fatores de sinalização que ativam os pontos de checagem do ciclo celular e ativação de vias de reparo. Desta forma, a ativação da DDR na célula tumoral se dá como forma de lidar com o dano provocado pelo quimioterápico e sua modulação pode ser eficiente na sensibilização do tumor (Goldstein and Kastan 2015).

A DDR é controlada pelas cinases ATM e ATR, responsáveis por ativar os pontos de checagem, levando à parada no ciclo celular e à ativação de mecanismos de reparo (Blackford and Jackson 2017). No trabalho apresentado no Capítulo I, os resultados mostram que as ecteinascidinas (ETs) trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>) e lurbinectedina (PM01183) levaram à ativação da DDR dependente de ATM e ATR em células HeLa (Fig. 1). A trabectedina é utilizada no tratamento de sarcomas de tecido mole e câncer de ovário recidivo sensível à platina em combinação com doxorrubicina lipossomal pequilada (Newman and Cragg 2014). Foi inicialmente isolada da ascídia marinha *Ecteinascidia turbinata*, porém atualmente é produzida de forma sintética (Larsen et al. 2016). A lurbinectedina é um derivado sintético da trabectedina, porém com atividade antitumoral mais elevada devido à presença de uma tetrahydro  $\beta$ -carbolina no lugar da tetrahydroisoquinolina na subunidade C (Takahashi et al. 2016). Na Figura 1 do Capítulo I é possível observar o aumento na fosforilação de ATM (Fig. 1A), e de RPA32 (Fig. 1B), uma das três subunidades de RPA, proteína requerida no recrutamento de ATR para o local do dano. Além disso, é possível observar uma correlação entre as intensidades de fluorescência medidas para as duas proteínas em uma mesma célula (Fig. 1C). A ativação das vias de ATM e de ATR também é confirmada pelos resultados de western blotting que mostram o aumento na fosforilação de Chk1, principal substrato de ATR; Chk2, principal substrato de ATM e H2AX, alvo comum das duas vias (Fig. 2). Análises de imunofluorescência

também confirmam a fosforilação de H2AX e de RPA32 na presença dos fármacos, além do aumento no recrutamento de BRCA1, proteína chave no reparo por HR (Figs. Suplementares 1 e 2).

A utilização de inibidores da DDR e das vias de sinalização dos pontos de checagem é uma área emergente no que diz respeito ao manejo da eficácia na quimioterapia. Vários estudos têm demonstrado que o uso individual de inibidores das vias de ATR-Chk1 e de ATM-Chk2 pode ser eficiente na sensibilização de células aos quimioterápicos. Recentemente, neste cenário, Tu *et al.*, mostraram que o inibidor de ATR VX-970 é capaz de sensibilizar células e modelos xenográficos de câncer de mama triplo negativo à radioterapia (Tu et al. 2018). Outro estudo recente sugeriu que o uso do inibidor de Chk1/2 AZD7762 é eficaz na sensibilização de células de câncer de bexiga ao tratamento com gencitabina (Isono et al. 2017). No entanto, no trabalho apresentado no Capítulo I, foi demonstrado que os inibidores de Chk1/Chk2 (AZD7762), de ATM (KU60019) ou de ATR (VE821 e AZ20), quando utilizados individualmente, apresentam pouca influência na toxicidade das ETs (Fig. 3). Desta forma, o uso de um único inibidor não se adequa ao tratamento combinado com as ETs, pois é provável que ocorra uma sobreposição das vias de ATM e ATR no processamento das lesões provocadas por estes fármacos. Para confirmar ou eliminar esta hipótese foi feito o tratamento combinado dos inibidores de ATM e de ATR em doses pouco tóxicas (<IC<sub>20</sub>) com trabectedina ou lurbinectedina em células HeLa. De fato, existe uma necessidade em inibir ambas as vias para que o efeito citotóxico das ETs seja potenciado (Fig. 4). É importante mencionar que o mesmo resultado foi observado para as células de câncer de ovário IGROV1, A2780 e sua equivalente resistente à cisplatina A2780/CP70, (Fig. 8), indicando uma aplicabilidade clínica para esta medida de tratamento.

A fim de se investigar os mecanismos por trás desta necessidade de inibição dual de ATM e ATR, primeiramente foi determinada a influência dos inibidores na fosforilação de H2AX e de MDC1. MDC1 é uma das proteínas chave no início da DDR, pois além de estar envolvida na sinalização de ATM, ligando-se a  $\gamma$ H2AX e recrutando mais ATM ativada para amplificar o sinal da via, também



está implicada na ativação de Chk1 dependente de ATR (Lou et al. 2006; Ciccia and Elledge 2010). Como é possível observar na Figura 5 do Capítulo I, os níveis de fosforilação de H2AX e de MDC1 diminuíram drasticamente na presença de ambos os inibidores de ATM (KU60019) e de ATR (VE-821) em combinação com as ETs, assim como os níveis de RPA32 fosforilado (Fig. Suplementar 3). O conjunto desses resultados confirma o papel de ATM e de ATR no início da resposta de dano a estes fármacos.

As ecteinascidinas possuem um mecanismo de ação complexo que difere da maioria dos agentes alquilantes de DNA. A trabectedina é capaz de ligar-se covalentemente a uma base guanina na fenda menor do DNA e, ao mesmo tempo, interagir com proteínas da maquinaria do TC-NER. A trabectedina impede a transcrição através do bloqueio direto da RNA polimerase II e, portanto, atua mimetizando uma ICL. Na tentativa de reparar esta lesão, são geradas quebras de fita dupla que podem ser reparadas por recombinação homóloga (Larsen et al. 2016). Assim, células deficientes nesta via de reparo são especialmente sensíveis à ação da trabectedina. A lurbinectedina possui um mecanismo de ação similar, porém a modificação estrutural entre as duas ETs confere diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas importantes (Soares et al. 2011).

Para avaliar se o efeito da inibição de ATM e ATR estende-se para a via de reparo por HR, o recrutamento das proteínas BRCA1 e Rad51 também foi mensurado. Em concordância com os resultados observados para o recrutamento de proteínas do início da DDR, apenas o uso combinado dos dois inibidores foi capaz de reduzir quase por completo a formação de foci de BRCA1 e também de Rad51 (Fig. 6). O uso isolado dos inibidores de ATM ou ATR mostrou ainda menor influência no recrutamento das proteínas em células tratadas com lurbinectedina (Fig. 6A e C), evidenciando um mecanismo de ação similar para as duas ETs, porém não idêntico. Estes resultados sugerem que DSBs provocadas pelas ETs não seriam reparadas, levando ao surgimento de aberrações cromossômicas na presença de ambos os inibidores. Esta hipótese foi confirmada com a análise do cariótipo de células expostas às diferentes condições de tratamento (Fig. 7). Em células tratadas com ambos os inibidores, os danos

cromossômicos são muito mais frequentes do que na presença de um inibidor (Fig. 7A e B). Isto ocorre porque a inibição dual de ATM e ATR impede a ativação do checkpoint G2/M, não conferindo tempo para o reparo e possibilitando a continuação do ciclo celular (Fig. 7C).

Estes resultados são bastante promissores no que diz respeito à sensibilização de células tumorais aos tratamentos já existentes. Entretanto, é importante que seja determinada a toxicidade em células não tumorais para que se possa inferir a severidade dos efeitos da combinação de inibidores de ATM e ATR. Inibidores mais potentes e específicos estão sendo desenvolvidos e testados em combinação com radioterapia e quimioterapia (Clinicaltrials.gov). Além disso, estes inibidores também podem ser administrados como monoterapia, atendendo ao princípio da letalidade sintética no caso de células que portam defeitos na DDR e contam com vias de reparo secundárias para sobreviver (Fang 2014).

Na linha de modulação de mecanismos que são ativados em células tumorais em resposta a tratamentos convencionais, o manejo da via autofágica tem sido motivo de controversos e extensos debates (Bishop and Bradshaw 2018). Devido ao papel dual da autofagia no câncer, é possível que tanto inibidores quanto ativadores sejam usados na modulação da via na tentativa de sensibilizar células tumorais. Os diversos estágios da via autofágica podem servir de alvo, desde as primeiras etapas de sinalização até a degradação lisossomal. Neste sentido, diversos estudos com moduladores da autofagia mostram resultados divergentes. Zhao et al. por exemplo, observaram que a inibição de autofagia por CQ, em combinação com bevacizumab, inibiu o crescimento tumoral em um modelo xenográfico de câncer colorretal (Zhao et al. 2018). Enquanto isso, Zielke et al. encontraram morte celular dependente de autofagia em células de glioma tratadas com os fármacos loperamide, pimozide e STF-62247 (Zielke et al. 2018; para uma revisão, ver, Bishop and Bradshaw 2018).

A autofagia pode ser ativada na presença de diversos estressores, como fármacos que causam lesão no DNA. Além disso, características encontradas no contexto do microambiente tumoral, como o baixo nível de nutrientes, também

podem levar à ativação da autofagia (Yang et al. 2015). No Capítulo II desta tese, células de câncer colorretal foram cultivadas continuamente em baixos níveis de glicose com o objetivo de mimetizar um aspecto do microambiente tumoral e obter possíveis respostas que não seriam observadas em condições normais de cultura. Foi escolhida uma concentração de glicose 10 vezes menor (2,5 mM) do que a encontrada no meio de cultura DMEM (alto nível de glicose, 25 mM), pois esta foi a menor concentração que não reduziu a capacidade de sobrevivência clonogênica das células HCT-116 (wild type, WT) (Fig. 1A). A seguir, as células foram expostas ao quimioterápico oxaliplatina (Ox) em condições de alta glicose (HG) e baixa glicose (LG). A oxaliplatina é um fármaco platinado de terceira geração utilizado no tratamento do câncer colorretal, gástrico e pancreático, além de estar em fase de testes clínicos para outros tipos de tumores como câncer de mama e ovário (Martinez-Balibrea et al. 2015; Clinicaltrials.gov). O mecanismo de ação da Ox ocorre pela sua ligação a sítios nucleofílicos como RNA e proteínas, mas preferencialmente ao DNA. Ao ligar-se no DNA, forma principalmente pontes intracadeia entre dois resíduos de guanina adjacentes ou de guanina e adenina, levando ao bloqueio da replicação e da transcrição (Martinez-Balibrea et al. 2015). Na Figura 1B é possível observar um aumento na viabilidade das células tratadas com Ox em baixos níveis de glicose, sugerindo uma possível resistência a esta condição. Visto que os fármacos que causam dano no DNA atuam preferencialmente em células proliferativas (Swift and Golsteyn 2014), é importante mencionar que as células HCT-116 cultivadas em LG e HG dividem-se na mesma proporção e que, portanto, esta resistência à Ox em meio LG não poderia ser explicada por possíveis diferenças nas velocidades de proliferação entre as células.

Os níveis de autofagia foram medidos nestas condições de tratamento e foi observado um aumento na porcentagem de células autofágicas em resposta ao tratamento com Ox em LG (Fig. 2A, B, C). Também foi demonstrado que a indução de autofagia pela Ox em baixa glicose ocorre por uma redução nos níveis de mTOR fosforilado, acompanhada de um aumento na fosforilação de AMPK (Fig. 2D, E). Considerando que os níveis de autofagia e a viabilidade estavam aumentados em baixa glicose, supôs-se que a ativação de autofagia poderia estar

contribuindo para a resistência ao fármaco nesta condição. Para que esta hipótese pudesse ser verificada, decidiu-se modular a autofagia por inibição gênica e farmacológica. Em relação à inibição gênica, foi gerada uma linhagem por infecção lentiviral silenciada para ATG7 (autophagy related 7), gene que codifica para a proteína Atg7, fundamental na formação do autofagossomo. Esta linhagem foi denominada HCT-116 shATG7, enquanto seu controle foi denominado HCT-116 CtrlATG7.

Ao contrário do esperado, mesmo com uma redução na ativação de autofagia nas células silenciadas em LG (Fig. 3C), a porcentagem de células viáveis não foi diferente entre células shATG7 e shCtrl tratadas com Ox (Fig. 3E). De maneira interessante, o perfil de sobrevivência ainda é maior para células em LG do que em HG, sugerindo que os mecanismos de resistência à Ox em condições de baixa glicose não podem ser totalmente explicados pela autofagia. Entretanto, para células HCT-116 WT tratadas com 3MA na presença de Ox, houve uma redução da viabilidade em LG, que pode ser explicada por uma queda nos níveis de ATP e um aumento na porcentagem de células apoptóticas nestas condições (Fig. Suplementar 2). O conjunto desses resultados pode parecer bastante contraditório em um primeiro momento, pois estudos sugerem que a 3MA é capaz de sensibilizar células de tumor por diminuir a ativação de autofagia (Filippi-chiela et al. 2015; Chiu et al. 2018). Porém, no presente estudo, é possível que os efeitos sensibilizadores do tratamento com este fármaco não sejam somente em decorrência da inibição autofágica, dada a sua inespecificidade em relação ao bloqueio da via. Outros estudos também mostram que 3MA é capaz de causar morte celular por outros mecanismos, como no estudo de Zheng et al., no qual baixas doses de 3MA e CQ inibem o crescimento de células de retinoblastoma em sinergismo com vincristina independentemente da autofagia (Zheng et al. 2015).

No estudo apresentado no Capítulo II, além da inibição da autofagia, também foi realizada a indução da autofagia com rapamicina (Rap), um conhecido inibidor de mTOR. Em condições de baixa disponibilidade de glicose, o tratamento com Rap levou à diminuição na viabilidade celular e ao aumento na porcentagem

de células apoptóticas, indicando uma sensibilização ao tratamento com Ox (Fig. 4). Como o tratamento com Ox leva à indução da autofagia, é provável que a combinação de Ox e Rap em baixa glicose provoque uma super estimulação desta via, aumentando os níveis de estresse e levando à morte celular.

Muitas questões permanecem em aberto quando o assunto é modulação da autofagia e o uso combinado de moduladores também pode ser levado em consideração. Neste cenário, Bhat et al. sugerem que em casos em que a autofagia esteja contribuindo para a resistência à quimioterapia, pode ser interessante uma modulação combinada iniciando com uma breve indução da autofagia, o que levaria ao acúmulo de autofagossomos, seguida de inibição com um agente lisossomotrópico. Isto resultaria na desativação de um maior número de autofagossomos e no bloqueio mais eficiente da resposta autofágica ao quimioterápico, superando a resistência (Bhat et al. 2018).

Não existe um consenso sobre a real aplicabilidade da modulação de autofagia no combate ao câncer, pois esta modulação deve ser feita de maneira muito precisa e delicada a fim de se evitar a interferência direta em outras vias. Ainda assim, é inegável que a autofagia tenha um papel importante na tumorigênese, mesmo que dual. Portanto, o desenvolvimento de moduladores mais específicos, bem como sua utilização no contexto adequado podem servir como medida terapêutica relevante.

Os dados apresentados nesta tese, em conjunto, apontam para a importância de se desvendar mecanismos de ação decorrentes da modulação da DDR ou da autofagia, para que novas medidas de tratamento contra o câncer possam ser sugeridas. Os resultados também propõem uma nova medida para aprimorar o efeito das ecteinascidinas, além de discutir a pertinência da modulação da autofagia no câncer colorretal.

---

## ***CONCLUSÕES***

---

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Conclusão geral

Neste trabalho foi possível concluir que a modulação de vias que são ativadas na presença de quimioterápicos, como a DDR e a via autofágica, pode ser uma ferramenta válida para a sensibilização de células tumorais, proporcionando uma melhor resposta ao tratamento.

### 6.2 Conclusões específicas

- As ecteinascidinas ativam a DDR em células HeLa.
- O uso de um único inibidor das vias de ATM-Chk2 ou ATR-Chk1 não é suficiente para sensibilizar células HeLa e de câncer de ovário ao tratamento com as ecteinascidinas.
- A inibição dual de ATM e ATR é necessária para sensibilizar células HeLa e de câncer de ovário ao tratamento com as ecteinascidinas.
- A inibição dual de ATM e ATR interfere no início da DDR e também no reparo dos danos causados pelas ecteinascidinas por recombinação homóloga.
- O índice mitótico e os danos cromossômicos são aumentados com a inibição dual de ATM e ATR na presença das ecteinascidinas.
- Células HCT-116 são mais resistentes ao tratamento com oxaliplatina em condições de baixa glicose.
- A oxaliplatina ativa a autofagia em células HCT-116 em condições de baixa glicose via inibição de mTOR e ativação de AMPK.
- A inibição da autofagia pela redução nos níveis de Atg7 não é suficiente para sensibilizar as células HCT-116 à oxaliplatina.
- A superestimulação da autofagia com rapamicina sensibiliza as células HCT-116 à oxaliplatina em baixa glicose.

---

# ***PERSPECTIVAS***

---



## 7 PERSPECTIVAS

Este trabalho gerou dados importantes em relação à modulação da DDR para a otimização do tratamento com ecteinascidinas. Além disso, foram obtidos resultados sobre o papel da autofagia na resistência ao tratamento com oxaliplatina em células de câncer colorretal cultivadas em ambiente contendo baixos níveis de glicose. Ao considerarmos a modulação de autofagia, alguns resultados necessitam de confirmação para que se possa concluir de forma mais precisa a função da autofagia e o efeito de sua modulação na resistência à oxaliplatina. Para tal, pretende-se:

- Confirmar os resultados de inibição da autofagia com as linhagens HCT-116 shCtrl e shATG7 tratadas com diferentes doses de oxaliplatina ( $IC_{10}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ).
- Corroborar os resultados de inibição de autofagia em células HCT-116 shCtrl e shATG7 através da verificação dos níveis das proteínas LC3 e p62.
- Avaliar o papel de transportadores de glicose em células tratadas em meio contendo alta e baixa concentração de glicose.

---

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8 REFERÊNCIAS

- Adamowicz M (2018) Breaking up with ATM. *J Immunol Sci* 2:26–31.
- Alagpulinsa DA, Ayyadevara S and Shmookler Reis RJ (2014) A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin. *Front Oncol* 4:1–11.
- Awasthi P, Foiani M and Kumar A (2016) ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci* 129:1285–1285.
- Basu B, Yap TA, Molife LR and De Bono JS (2012) Targeting the DNA damage response in oncology: Past, present and future perspectives. *Curr Opin Oncol* 24:316–324.
- Batey MA, Zhao Y, Kyle S, Richardson C, Slade A, Martin NMB, Lau A, Newell DR and Curtin NJ (2013) Preclinical Evaluation of a Novel ATM Inhibitor, KU59403, In Vitro and In Vivo in p53 Functional and Dysfunctional Models of Human Cancer. *Mol Cancer Ther* 12:959–967.
- Bhat P, Kriel J, Shubha B, Swamy N and Loos B (2018) Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol* 147:170–182.
- Bishop E and Bradshaw TD (2018) Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol* 0:1–10.
- Blackford AN and Jackson SP (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* 66:801–817.
- Blasina A, Price BD, Turenne GA and McGowan CH (1999) Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol* 9:1135–1138.
- Bordin DL, Lima M, Lenz G, Saffi J, Meira LB, Mésange P, Soares DG, Larsen AK, Escargueil AE and Henriques JAP (2013) DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat Res Rev Mutat Res* 753:91–99.
- Byun S, Lee E and Lee KW (2017) Therapeutic implications of autophagy inducers in immunological disorders, infection, and cancer. *Int J Mol Sci* 18:
- Carrassa L and Damia G (2017) DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 60:139–151.
- Chaudhuri L, Vincelette ND, Koh BD, Naylor RM, Flatten KS, Peterson KL, McNally A, Gojo I, Karp JE, Mesa RA et al. (2014) CHK1 and WEE1 inhibition combine synergistically to enhance therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia ex vivo. *Haematol* 99:688–696.
- Cheung-Ong K, Giaever G and Nislow C (2013) DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: Serendipity and chemical biology. *Chem and Biol* 20:648–659.
- Chiu Y-H, Hsu S-H, Hsu H-W, Huang K-C, Liu W, Wu C-Y, Huang W-P, Chen J, Chen B-H and Chiu C-C (2018) Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy. *Int J Oncol* 1967–1979.
- Choi AMK, Ryter SW and Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *N Engl J med* 368:651–62.
- Ciccia A and Elledge SJ (2010) The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell* 40:179–204.
- Cline SD and Hanawalt PC (2003) WHO ' S ON FIRST IN THE CELLULAR RESPONSE TO DNA

DAMAGE ? Mol Cell Biol 4:361–372.

Clinicaltrials.gov U.S. National Library of Medicine. <https://clinicaltrials.gov/> (September, 2018).

Cuevas C (2009) Development of Yondelis Ò ( trabectedin , ET-743 ). A semisynthetic process solves the supply problem. Nat Prod Rep 322–337.

Das CK, Mandal M and Kögel D (2018) Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. Cancer Metast Rev

Desai A, Yan Y and Gerson S (2018) Advances in therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer. DNA Repair 24–29.

Dianov GL and Hu U (2013) Mammalian Base Excision Repair : the Forgotten Archangel. Nucleic Acids Res 41:3483–3490.

Ding Z, Hui B, Shi Y, Zhou J, Peng Y, Gu C and Yang H (2011) Autophagy Activation in Hepatocellular Carcinoma Contributes to the Tolerance of Oxaliplatin via Reactive Oxygen Species Modulation. Clin Cancer Res 6229–6239.

Do K, Doroshow J and Kummar S (2013) Wee1 kinase as a target for cancer therapy. Cell Cycle 12:3159–3164.

Douwel DK, Boonen R, Long D, Szybowska A, Raschle M and Knipscheer P (2014) XPF-ERCC1 acts in unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. Molecular Cell 54:460–471.

Eliopoulos AG, Havaki S and Gorgoulis VG (2016) DNA damage response and autophagy: A meaningful partnership. Front Genet 7:1–13.

Fang B (2014) Development of Synthetic Lethality Anticancer Therapeutics. J Med Chem 57:7859–7873.

Filippi-chiela EC, Manssur M, Thom MP and Lenz G (2015) Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. Autophagy 11:1099–1113.

Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL and Lenz G (2011) Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. PloS one 6:e20849.

Fishel R (2015) Mismatch repair. J Biol Chem 290:26395–26403.

Friedberg EC (2003) DNA damage and repair. Nature 421:436–440.

Gavande NS, Vandervere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS and Turchi JJ (2016) DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? Pharmacol Ther 160:65–83.

Gewirtz DA, Tyutyunyk-massey L and Landry JW (2018) The potentially conflicting cell autonomous and cell non-autonomous functions of autophagy in mediating tumor response to cancer therapy. Biochem Pharmacol 1–5.

Goldstein M and Kastan MB (2015) The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. Annu Rev Med 66:129–143.

Gomes LR, Vessoni AT and Menck CFM (2016) Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy. Pharmacol Res 107:300–307.

Hanaoka F and Sugawara K (2016) DNA Replication, Recombination, and Repair; Molecular

Mechanisms and Pathology. Springer Japan

Hanawalt PC (2015) Historical perspective on the DNA damage response. *DNA Repair* 36:1–6.

Helena JM, Joubert AM, Grobbelaar S, Nolte EM, Nel M, Pepper MS, Coetzee M and Mercier AE (2018) Deoxyribonucleic acid damage and repair: Capitalizing on our understanding of the mechanisms of maintaining genomic integrity for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci* 19:1148.

Islam MA, Sooro MA and Zhang P (2018) Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 19:1405.

Isono M, Hoffmann MJ, Pinkerneil M, Sato A, Michaelis M, Cinatl J, Niegisch G and Schulz WA (2017) Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine. *J Exp Clin Cancer Res* 36:1–12.

Jain R, Aggarwal AK and Rechkoblit O (2018) Eukaryotic DNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 53:77–87.

Janji B, Berchem G and Chouaib S (2018) Targeting Autophagy in the Tumor Microenvironment: New Challenges and Opportunities for Regulating Tumor Immunity. *Front Immunol* 9:887.

Jeggo PA and Lo M (2007) DNA double-strand breaks : their cellular and clinical impact ? *Oncogen* 26:7717–7719.

Kakarougkas A and Jeggo PA (2014) DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* 87:1–8.

Khanna KK and Shiloh Y (2009) *The DNA Damage Response: Implications on Cancer Formation and Treatment*, Springer.

Kim H-J, Min A, Im S-A, Jang H, Lee KH, Lau A, Lee M, Kim S, Yang Y, Kim J et al. (2017) Anti-tumor activity of the ATR inhibitor AZD6738 in HER2 positive breast cancer cells. *Int J Cancer* 140:109–119.

Korzhev DM and Hadden MK (2016) Targeting the Translesion Synthesis Pathway for the Development of Anti-Cancer Chemotherapeutics. *J Med Chem* 59:9321–9336.

Krokan HE and Bjoras M (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–22.

Kunkel TA and Erie DA (2015) Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Gen* 49:291–313.

Larsen AK, Galmarini CM and D'Incalci M (2016) Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemother Pharmacol* 77:663–671.

Le VH, Inai M, Williams RM, Kan T and Collins F (2016) Ecteinascidins. A Review of the Chemistry, Biology and Clinical Utility of Potent Tetrahydroisoquinoline Antitumor Antibiotics. *Nat Prod Rep* 32:328–347.

Lee NS, Kim S, Jung YW and Kim H (2018) Eukaryotic DNA damage responses: Homologous recombination factors and ubiquitin modification. *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen* 809:88–98.

Lehmann AR (2011) DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair* 10:730–733.

Lemaître C and Soutoglou E (2015) DSB (Im)mobility and DNA Repair Compartmentalization in Mammalian Cells. *J Mol Biol* 427:652–658.

Lieber MR (2010) The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181–211.

- Lindahl T and Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:127–133.
- Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, Van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT et al. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21:187–200.
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L and Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 39:211–227.
- Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Gines A, Ruiz de Porras V, Moutinho C, Layos L, Manzano JL, Buges C, Bystrup S, Esteller M et al. (2015) Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther* 14:1767–1776.
- Mason JM, Dusad K, Wright WD, Grubb J, Budke B, Heyer WD, Connell PP, Weichselbaum RR and Bishop DK (2015) RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Res* 43:3180–3196.
- Menck CFM and Munford V (2014) DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol* 37:220–233.
- Minchom A, Aversa C and Lopez J (2018) Dancing with the DNA damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* 10:1–18.
- Monkkonen T and Debnath J (2018) Inflammatory signaling cascades and autophagy in cancer. *Autophagy* 14:190–198.
- Montecucco A, Zanetta F and Biamonti G (2015) Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J* 14:95–108.
- Mowers EE, Sharifi MN and Macleod KF (2018) Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J* 285:1751–1766.
- Munari FM, Guecheva TN, Bonatto D and Henriques JAP (2013) New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 60:122–132.
- Nalepa G and Clapp DW (2018) Fanconi anaemia and cancer: An intricate relationship. *Nat Rev Cancer* 18:168–185.
- Nam E a. and Cortez D (2013) ATR signaling: more than meeting at the fork Edward. *Biochem J* 436:527–536.
- Newman DJ and Cragg GM (2014) Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Mar Drugs* 12:255–278.
- Ngabire D and Kim G-D (2017) Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 18:1–15.
- O'Connor MJ (2015) Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell* 60:547–560.
- Pace P, Mosedale G, Hodskinson M, Rosado I, Sivasubramaniam M and Patel K (2010) Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* 329:219–223.
- Pannunzio NR, Watanabe G and Lieber MR (2017) Nonhomologous DNA End Joining for Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Biol Chem* 293:10512–24.
- Pearl LH, Schierz AC, Ward SE, Al-Lazikani B and Pearl FMG (2015) Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat Rev Cancer* 15:166–180.

- Pellegrini P, Strambi A, Zipoli C, Hägg-Olofsson M, Buoncervello M, Linder S and De Milito A (2014) Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: Implications for cancer therapies. *Autophagy* 10:562–571.
- Penna LS, Henriques JAP and Bonatto D (2017) Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacol Ther* 173:67–82.
- Pommier Y (2014) Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chemical Biology* 8:82–95.
- Puigvert JC, Sanjiv K and Helleday T (2016) Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. *FEBS J* 283:232–245.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-arencibia M, Green-thompson ZW, Jimenez-sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S et al. (2010) Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 90:1383–1435.
- Ray-Coquard I (2017) Trabectedin mechanism of action and platinum resistance: molecular rationale. *Future Oncol* 1:17–21.
- Riddell IA and Lippard SJ (2018) Cisplatin and oxaliplatin: Our current understanding of their actions.
- Riley T, Sontag E, Chen P and Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:402–412.
- Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LFZ, Carvalho H, Henriques JAP, Sary A, Menck CFM and Sarasin A (2010) Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair* 9:40–47.
- Sale JE (2012) Competition, collaboration and coordination - determining how cells bypass DNA damage. *J Cell Sci* 125:1633–1643.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K and Linn S (2004) Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39–85.
- Sanchez H, Reuter M, Yokokawa M, Takeyasu K and Wyman C (2014) Taking it one step at a time in homologous recombination repair. *DNA Repair* 20:110–118.
- Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M and Arakawa S (2014) Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci* 15:3145–53.
- Singh SS, Vats S, Chia AY-Q, Tan TZ, Deng S, Ong MS, Arfuso F, Yap CT, Goh BC, Sethi G et al. (2017) Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 37:1142–1158.
- Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JAP and Larsen AK (2007) Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *PNAS* 104:13062–7.
- Soares DG, Machado MS, Rocca CJ, Poindessous V, Ouaret D, Sarasin A, Galmarini CM, Henriques J a P, Escargueil AE and Larsen AK (2011) Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells. *Mol Cancer Ther* 10:1481–1489.
- Spivak G (2015) Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 36:13–18.
- Sumpter R and Levine B (2017) Emerging functions of the Fanconi anemia pathway at a glance. *J Cell Sci* 130:2657–2662.
- Swift LH and Golsteyn RM (2014) Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA

damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci* 15:3403–3431.

Takahashi R, Mabuchi S, Kawano M, Sasano T and Matsumoto Y (2016) Preclinical Investigations of PM01183 (Lurbinectedin) as a Single Agent or in Combination with Other Anticancer Agents for Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *1183*:1–17.

Tiwari M (2012) Antimetabolites : Established cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 8:

Tu X, Kahila M, Zhou Q, Yu J, Kalari K, Wang L, Harmsen W, Boughey J, Goetz M, Sarkaria J et al. (2018) ATR inhibition is a promising radiosensitizing strategy for chemotherapy-resistant triple negative breast cancer. *AACR Meet*

Vessoni a T, Filippi-Chiela EC, Menck CF and Lenz G (2013) Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ* 20:1444–54.

Wallace SS (2014) Base excision repair: A critical player in many games. *DNA Repair* 19:14–26.

Ward A, Khanna KK and Wiegmans AP (2015) Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer Treat Rev* 41:35–45.

Weber AM and Ryan AJ (2015) ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 149:124–138.

Wilde L, Tanson K, Curry J and Martinez-Outschoorn U (2018) Autophagy in cancer : a complex relationship. *Biochem J* 475:1939–1954.

Woods D and Turchi JJ (2013) Chemotherapy induced DNA damage response Convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* 14:379–389.

Wyatt MD and Iii DMW (2009) Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci* 66:788–799.

Xie L, Zhao T, Cai J, Su Y, Wang Z and Dong W (2016) Methotrexate induces DNA damage and inhibits homologous recombination repair in choriocarcinoma cells. *Onco Targets Ther* 7:115–122.

Yang X, Yu D, Yan F, Jing Y, Han Z, Sun K, Liang L and Hou J (2015) The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci* 1–11.

Zafar MK and Eoff RL (2017) Translesion DNA Synthesis in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Chem Res Toxicol* 30:1942–1955.

Zhao Z, Xia G, Li N, Su R, Chen X and Zhong L (2018) Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *J Cancer* 9:3407–3416.

Zheng XY, Li LJ, Li W, Jiang PF, Shen HQ, Chen YH and Chen X (2015) Low concentrations of chloroquine and 3-methyladenine suppress the viability of retinoblastoma cells synergistically with vincristine independent of autophagy inhibition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253:2309–2315.

Zielke S, Meyer N, Mari M, Abou-El-Ardat K, Reggiori F, van Wijk SJL, Kögel D and Fulda S (2018) Loperamide, pimozone, and STF-62247 trigger autophagy-dependent cell death in glioblastoma cells. *Cell Death Dis* 9:994.