

MARCELA TEATIN LATANCIA

**PAPEL DA SÍNTESE TRANSLEÇÃO NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA E TMZ EM  
CÉLULAS DE GLIOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências

Orientador: Prof Dr Carlos Frederico Martins  
Menck

Versão parcial

## Resumo

Latancia, MT. **Papel Da Síntese Translesão Na Resistência À Cisplatina E TMZ Em Células De Glioma.** 2022. no de folhas (137 f.). Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O glioblastoma é um câncer que, em geral, apresenta mau prognóstico, onde a recidiva é quase sempre certa. As polimerases de síntese translesão (TLS) são enzimas capazes de replicar o DNA contendo lesões não removidas por outros mecanismos de reparo. As células tumorais podem utilizar esse mecanismo para sobreviver a lesões causadas pelos quimioterápicos (QMT), sendo, portanto, um possível mecanismo de resistência aos tratamentos. Além disso, esse processo de TLS é sujeito a erro e pode levar à mutagênese, podendo aumentar o potencial de resistência das células tumorais. O tratamento com QMT, como cisplatina ou temozolomida (TMZ), por exemplo, induzem lesões no DNA a fim de induzir morte das células tumorais. Pouco é conhecido sobre o papel das polimerases TLS na resposta ao TMZ. Portanto, identificamos uma lista de genes associados à resistência ao TMZ, utilizando uma biblioteca de genes ativados ou nocauteados pelo sistema CRISPR-Cas9. Nesta lista, destaca-se a participação de algumas polimerases TLS, como, Pol  $\iota$  e Pol  $\kappa$ . Assim, nosso objetivo é compreender melhor o papel das polimerases TLS, em especial Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$  e Pol  $\kappa$ , na resistência à cisplatina e a TMZ, QMT utilizado em protocolos terapêuticos de glioma. Inicialmente, tratamos células *POLH* mutadas (XP-V) e células complementadas para este gene (XP-V comp) com TMZ. Observamos que células XP-V são mais sensíveis ao TMZ, indicando que Pol  $\eta$  deve ser importante para superar o dano no DNA. Desenvolvemos células de U251-MG nocautes para os genes das polimerases *POLK* e *POLI* pelo sistema CRISPR/Cas9. Essas células mutadas também tiveram sua viabilidade diminuída após tratamento com TMZ, aumento do estresse genotóxico e parada de ciclo celular, principalmente em fase G2, mas não em fase S - após 48 h de tratamento em todas as três células mutadas, não observado em células controle, selvagens para esses genes. Para aprofundarmos a investigação na replicação do DNA, realizamos ensaios de fibra de DNA, e, surpreendentemente, não observamos diferença entre as células mutadas para *POLK* e as células selvagens tratadas com TMZ. Concluímos que as polimerases TLS protegem as células tumorais do dano causado por TMZ, e, portanto, desempenham função importante em superar a resistência a este quimioterápico. Pretendemos ainda compreender como a replicação é afetada nas células tratadas com TMZ. A ausência de parada em fase

S, onde geralmente essas enzimas atuam, e a falta de efeito no progresso da forquilha de replicação indicam que o papel desempenhado por essas polimerases na resistência ao TMZ pode ser além da TLS. Estamos, portanto, buscando outras possíveis funções responsáveis pelos efeitos observados. Assim, queremos entender melhor o mecanismo de resistência promovido pelas polimerases de TLS e buscar novos alvos que colaborem com a quebra de resistência à TMZ utilizada na clínica para tratamento de glioma, para assim contribuir para melhorar o prognóstico dos pacientes com essa neoplasia.

**Palavras-chave:** Glioblastoma. Reparo de DNA. Síntese Translesão.

## Abstract

Latancia, MT. **The role of Translesion Synthesis Cisplatin and TMZ resistance in glioma cells.** 2022. number of pages (137 p.). Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Glioblastoma is a cancer that presents poor prognosis, with a high ratio of recurrence. Translesion synthesis (TLS) DNA polymerases are enzymes capable of replicating unrepaired DNA damage. Tumor cells can use this process to survive lesions caused by genotoxic chemotherapeutic drugs (CMT), contributing to the mechanisms of therapy resistance. In addition, TLS is error prone and can lead to mutagenesis, increasing the resistance potential of tumor cells. Treatment with CMT, such as cisplatin or temozolomide (TMZ), induces DNA damage to promote tumor cell death. Little is known about the role of TLS polymerases in the responses to TMZ. Preliminary results obtained by Dr. Clarissa R. R. Rocha, in our group, identified a list of genes associated with the resistance to TMZ, using a library of genes activated or knocked out by the CRISPR-Cas9 system. In this list, the participation of some TLS polymerases, such as, Pol  $\iota$  and Pol  $\kappa$ , are remarkable. Thus, our aim is to better understand the role of TLS polymerases, especially Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$  and Pol  $\kappa$ , in the resistance to cisplatin and TMZ, CMT used in therapeutic glioma protocols. At first, we treated mutated *POLH* cells (XP-V) and complemented cells for this gene (XP-V comp) with TMZ. We observed that XP-V cells are more sensitive to TMZ, indicating that Pol  $\eta$  must be important to overcome DNA damage promoted by TMZ. We developed U251-MG knockout cells for the *POLK* and *POLI* polymerase genes by CRISPR/Cas9. These mutated cells also had their viability impaired after treatment with TMZ, increased in genotoxic stress and cell cycle arrest, mainly in G2 phase, but not in S phase - after 48 h of treatment, in all three mutated cells, not observed in cells wild-type for these genes. To further investigate DNA replication, we performed DNA fiber assay, and, surprisingly, there was no difference between cells mutated to *POLK* and wild-type cells treated with TMZ. We conclude that TLS polymerases protect tumor cells from damage caused by TMZ, and, therefore, play an important role to overcome resistance to this chemotherapy. Now, we intend to understand how replication is affected in cells treated with TMZ. There is no S-phase arrest, where these enzymes generally act, and no difference in the progression fork replication indicating that the role played by these polymerases in the resistance to TMZ may be beyond TLS. Thus, we are looking for other possible functions responsible for the observed effects. In summary, we want to better understand the resistance mechanism promoted by TLS polymerases and

seek new targets that collaborate with the overcome of resistance to TMZ, used in the clinic for the glioma treatment, and contribute to improve the prognosis of patients with this neoplasia.

**Keywords:** Glioblastoma. DNA repair. Translesion Synthesis.