



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**SILENCIAMENTO DE XIAP POTENCIALIZA OS EFEITOS DA  
SUPEREXPRESSÃO DE TP53 NA REDUÇÃO DA  
PROLIFERAÇÃO E AUMENTO DA MORTE CELULAR EM  
GLIOMAS**

Porto Alegre – RS, Brasil

Março de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**SILENCIAMENTO DE XIAP POTENCIALIZA OS  
FEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DE TP53 NA  
REDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E AUMENTO  
DA MORTE CELULAR EM GLIOMAS**

---

**ANDREW OLIVEIRA SILVA**

Orientação: Guido Lenz

**Dissertação de Mestrado**

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular - UFRGS  
Departamento de Biofísica  
Instituto de Biociências  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Março de 2012

*Ào meu pai, por sempre me cobrar dedicação máscima nas atividades a que me sujeito desenvolver e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, mostrando apoio incondicional; E em especial à minha mãe, pela constante preocupação com o meu bem-estar, por sempre me motivar a nunca desistir nas horas ruins, sempre estar presente, seja à hora e o dia que for, independente do que eu precisar e, principalmente, por me ensinar os valores que hoje carrego comigo, além de me mostrar que tudo é possível se tivermos força e determinação. Obrigado por serem estes grandes exemplos de superação na vida e espero, um dia, retribuí-los por tudo que me proporcionaram.*

## ***Agradecimentos***

*Aos meus pais, Marinéz e Thomaz, por sempre me apoiarem nos caminhos que eu escolhi e que nunca mediram esforços para me dar todo o suporte que necessitei e para que eu pudesse ter um ensino de qualidade e dedicação exclusiva à minha formação;*

*Aos meus familiares e amigos que sempre me motivaram a seguir na vida acadêmica e que sempre acreditaram no meu sucesso profissional;*

*A minha namorada Daniela Kuhn, por todo o apoio motivacional e companheirismo, por estar presente em todos os momentos, sejam eles de dificuldades ou de vitórias, por sempre me dar forças em qualquer decisão que eu tomasse e sempre me incentivando a seguir em frente, me fazendo acreditar em um caminho repleto de sucesso pela frente, além de agüentar os momentos de estresse proporcionados por situações adversas ou de maior dificuldade;*

*Aos queridos colegas do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, em especial aos colegas Eduardo e José, pelas trocas de conhecimentos e de experiências de vida, além de proporcionarem um dos melhores ambientes de trabalho que eu já estive;*

*Ao Professor Dr. Guido Lenz, que serve cada vez mais como um exemplo de profissional a ser seguido por todos que trabalham com ele e que, para mim, é um excelente pesquisador e um orientador muito competente;*

*A minha estagiária de Iniciação Científica Michele Hütten, por todo o apoio técnico e científico, além da colaboração intelectual para a interpretação de dados e elaboração de experimentos;*

*Ao meu grande amigo Eduardo Chiela, por toda a força que tem me dado em qualquer situação que eu precise, pela ajuda intelectual na elaboração e resolução do presente trabalho, além de todo o conhecimento que ele, humildemente, compartilha comigo;*

*Aos professores Diego Bonatto e Fábio Klamt por fazerem parte da comissão de acompanhamento do presente trabalho, auxiliando no desenvolvimento deste, através de opiniões, sugestões e críticas construtivas para a melhor elaboração desta tese;*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 GLIOMAS</b>	<b>16</b>
1.1.1 <i>Características Gerais e Epidemiologia</i>	16
1.1.2 <i>Classificação dos Gliomas</i>	18
1.1.3 <i>Glioblastoma Multiforme (GBM)</i>	20
1.1.4 <i>Sinalização Celular – Principais Vias Alteradas em Gliomas</i>	24
1.1.4.a <i>Via da RTK/PI3K/AKT/PTEN</i>	27
1.1.4.b <i>Via da Rb1/CKD4/P16<sup>INK4A</sup></i>	29
1.1.4.c <i>Via da p53/MDM-2/p14</i>	32
<b>1.2 XIAP: O MAIS POTENTE INTEGRANTE DA FAMÍLIA DAS IAPs</b>	<b>37</b>
<b>1.3 A PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL p53</b>	<b>42</b>
1.3.1 <i>Características Gerais</i>	42
1.3.2 <i>Estrutura da p53</i>	43
1.3.3 <i>A Via da p53 e Suas Funções</i>	46
1.3.4 <i>p53 e Glioblastomas (GBM)</i>	54
1.3.5 <i>Interação Entre a Proteína Supressora Tumoral p53 e a             Proteína Anti-apoptótica XIAP</i>	58
<b>1.4 TERAPIAS APLICADAS PARA O TRATAMENTO DE GBM E A TERAPIA     GÊNICA COMO UMA ALTERNATIVA PARA O FUTURO</b>	<b>62</b>
1.4.1 <i>Terapia Gênica em Gliomas modulando p53 e XIAP</i>	67
<b>1.5 OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>2 TRABALHO EXPERIMENTAL / ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>70</b>
<b>2.1 ABSTRACT</b>	<b>72</b>
<b>2.2 INTRODUCTION</b>	<b>73</b>
<b>2.3 MATERIALS AND METHODS</b>	<b>77</b>
2.3.1 <i>Cell Culture</i>	77
2.3.2 <i>Plasmid Purification and Transfection</i>	77

2.3.3	<i>Cumulative Population Doubling Assay</i>	79
2.3.4	<i>Lactate Dehydrogenase (LDH) Release Assay</i>	79
2.3.5	<i>AnnexinV/Propidium Iodide Assay</i>	80
2.3.6	<i>Cell Cycle Analysis</i>	80
2.3.7	<i>Analysis of autophagosome formation by LC3-GFP protein</i>	81
2.3.8	<i>Quantification of Acidic Vacuolar Organelles (AVOs) by Acridine Orange (AO) staining</i>	81
2.3.9	<i>Western blotting Analysis</i>	82
2.3.10	<i>Statistical Analysis</i>	83
<b>2.4</b>	<b>RESULTS</b>	<b>84</b>
2.4.1	<i>Combination of XIAP Downregulation and p53 Overexpression Reduces Cell Proliferation Rates in U87 Glioma Cell Line</i>	84
2.4.2	<i>p53 overexpression enhances the cytotoxicity in XIAP downregulated U87 cells</i>	86
2.4.3	<i>p53 overexpression causes cell death by apoptosis in U87 with XIAP downregulated</i>	89
2.4.4	<i>The Combined Treatment Does Not Affect Cell Cycle Distribution.</i>	92
2.4.5	<i>XIAP Downregulation Enhance Autophagy and p53 Overexpression Reverses This Mechanism.</i>	94
<b>2.5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>97</b>
<b>2.6</b>	<b>ACKNOWLEDGEMENT</b>	<b>105</b>
<b>2.7</b>	<b>SUPPLEMENTARY FIGURE LIST</b>	<b>107</b>
2.7.1	<i>Supplementary Figure 1</i>	107
2.7.2	<i>Supplementary Figure 2</i>	108
2.7.3	<i>Supplementary figure 3</i>	109
2.7.4	<i>Supplementary Figure 4</i>	110
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>114</b>

# LISTA DE ABREVIATURAS

AIP1 – ASK1-Interacting Protein 1

AKT - v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene (or PKB)

AML – Acute Myeloid Leukemia

AMPK - AMP-activated Protein Kinase

AO – Acridine Orange

APAF-1 - Apoptotic Protease Activating Factor 1

Arg – Arginina

ATCC - American Type Culture Collection

Atg8 - Autophagy-related Protein 8

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

AVO - Acidic Vacuolar Organelles

B23 – Nucleophosmin B23

BAK - Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer

Bax – Bcl-2-associated X Protein

Bcl-2 - B-cell Lymphoma 2

Bcl-xL - B-Cell Lymphoma Extra Large

BER – Base Excision Repair

BH – BCL-2 Homology

Bid - BH3 Interacting Domain Death Agonist

BIR - Baculovirus IAP Repeat

BIRC - Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein

BMP - Bone Morphogenetic Protein

BP1 – Beta Protein 1

CASPASE - Cysteine-aspartic-acid Proteases

CBTRU - Central Brain Tumor Registry of the United States

CD95 – Cluster of Differentiation 95 (ou FAS)

CDC-2 - Cell Division Control Protein 2 Homolog

CDK - Cyclin-dependent Kinase

CDK2 - Cyclin-dependent Kinase 2

CDK4 - Cyclin-dependent Kinase 4

CDKN1A - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A (p21)

CDKN1B - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B (p27)

CDKN2A - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A (p16)

cDNA - Complementary DNA

CKI - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

CMF - Hank's Solution Calcium-Magnesium Free

CMV – Citomegalovirus

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS – Central Nervous System

COP1 - Constitutive Photomorphogenic 1

DAP-K1 - Death-Associated Protein Kinase 1

DIABLO – Direct IAP Binding Protein With Low pI

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium



DNA-PK - DNA-dependent Protein Kinase

DR4 e DR5 - Death Receptor 4 e 5

DRAM1 - DNA-damage Regulated Autophagy Modulator 1

E2F – E2 Transcription Factor

ECL - Enhanced Chemiluminescence

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid

EGF - Epidermal Growth Factor

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

EUA – Estados Unidos da América

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FBS – Fetal Bovine Serum

GADD45 - Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45

GBM – Glioblastoma Multiforme

GFP - Green Fluorescent Protein

Gly – Glycine

Hek293T - Human Embryonic Kidney 293 cells

hILP – human Inhibitor of Apoptosis Like Protein-2

HOXA5 - Homeobox A5

HRP - Horseradish Peroxidase

IAP - Inhibitor of Apoptosis Protein

IARC - International Agency for Research on Cancer

INK4 - Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase 4

IP – Iodeto de Propídeo

IP2 - Fosfatidilinositol-4,5-difosfato

JNK1 - c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1

LB - Luria Bertani Medium

LC3 - Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3

LDH – Lactato Desidrogenase

LOH – Loss Of Heterozigosity

MAP – Microtubule-associated Protein

MCL1 - Myeloid Cell Leukemia Sequence 1

MCS – Multiple Cloning Site

MDM-2 - Murine Double Minute-2

MDM-X – Murine Double Minute-X

MGMT – O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase

MIHA – Mammalian IAP Homolog A

MMAC1 - Mutated in Multiple Advanced Cancers 1

mTOR - mammalian Target Of Rapamycin

NAD – Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NEDD8 - Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated 8

NER – Nucleotide Excision Repair

NES – Nuclear Export Signal

NFkB - Nuclear Factor kappa B

NHEJ - Non-Homologous End Joining

NLS – Nuclear Localization Signal

Olig2 - Oligodendrocyte Transcription Factor 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

P- – células sem superexpressão de p53

P+ - Superexpressão de p53

p14/ARF – proteína de 14 kDa/ Alternative Reading Frame

p15 – proteína de 15 kDa

p16 – proteína de 16 kDa

p21 – proteína de 21 kDa

p27 – proteína de 27 kDa

p300/CBP – Proteína de 300 kDa/CREB Bind Protein

p53 – Proteína de 53 kDa

PBS – Phosphate Buffered Saline

pCMVp53 – vetor de expressão de p53

PCR - Polymerase Chain Reaction

PD – Population Doubling

PDGF - Platelet-Derived Growth Factor

pEGFPN1 – Vetor de Expressão do Gene Repórter GFP

PI – Propidium Iodide

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase

PIP3 - Fosfatidilinositol-trifosfato

Pirh2 - p53-Induced RING-H2 Domain Protein

PKB – Protein Kinase B (or AKT)

pRb – Proteína do Retinoblastoma

PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog

PUMA – p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

PVDF - Polyvinylidene Fluoride

RB – Gene Retinoblastoma

RE – Responsible Element

RING - Really Interesting New Gene

RNAi – RNA de interferência

RTK – Receptor Tyrosine Kinase

SD – Standard Deviation

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis

SESN2 - Sestrin-2

SH3 – SRC Homology Domain

ShRNA – Short Hairpin RNA

SMAC - Second Mitochondria-derived Activator of Caspase

SNC – Sistema Nervoso Central

TAB1 – TAK1-binding Protein 1

TAD – Trans Activation Domain

TBST - Tris-Buffered Salt solution/Tween®

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TGF- $\beta$  – Transforming Growth Factor beta

TMZ – Temozolomide

TP53 – Tumor Protein 53 kDa

TSC2 - Tuberos Sclerosis Protein 2

Tyr - Tyrosine

U87-MG - Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line

U87Si – Linhagem de Glioma U87 silenciada pra Survivina

U87wt – Linhagem de Glioma U87 selvagem (wild type)

U87Xi – Linhagem de Glioma U87 silenciada pra XIAP

USA – United States of America

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

WHO – World Health Organization

wt – wild-type

XAF-1 - XIAP Associated Factor-1

Xi – silenciamento de XIAP

XIAP - X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## Resumo

Gliomas malignos compreendem o subtipo mais comum e devastador de tumores primários do sistema nervoso central (SNC), sendo o Glioblastoma Multiforme (GBM) a forma mais agressiva e mortífera. Pacientes com este tipo de tumor apresentam um prognóstico de sobrevida que não ultrapassa os 18 meses, após o diagnóstico. Isso é decorrente do fato de que os GBMs possuem elevada resistência aos tratamentos de quimio e radioterapia, além de serem altamente infiltrativos e neurologicamente destrutivos. Um importante fator que contribui para essa resistência é a superexpressão da proteína XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*), o mais potente inibidor de apoptose da família das IAPs. Este atua inibindo diretamente a ativação das Caspases 3, 7 e 9. P53 é considerada uma das mais potentes proteínas supressoras tumorais, uma vez que esta atua como reguladora central em diversas vias de sinalização de mecanismos celulares distintos, como a via de controle do ciclo celular, reparo ao DNA, apoptose, senescência, autofagia, entre outras. Isto justifica o fato de p53 estar frequentemente mutada, nos mais variados tipos de cânceres. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos resultantes da interação entre a superexpressão da proteína supressora tumoral p53 e o silenciamento da proteína anti-apoptótica XIAP na proliferação, na sobrevivência de GBMs. Quando p53 foi superexpressa (P+) na linhagem de glioma U87 silenciada para XIAP (Xi), através de RNAi, a taxa de proliferação celular reduziu significativamente em relação às células com as intervenções isoladas (U87Xi e U87wtP+) ou em relação ao controle selvagem U87wt, ao longo de dez dias. O ensaio de citotoxicidade LDH revelou um aumento na desestabilização da membrana citoplasmática nas células com a manipulação gênica combinada (U87XiP+) em relação os controles U87Xi e U87wtP+. O ensaio com AnexinaV/PI demonstrou uma elevação na marcação de células U87XiP+ com os dois marcadores, indicando uma maior indução de morte celular em relação aos controles. Além disso, como consequência da modulação combinada de p53 e XIAP, os níveis das proteínas pró-apoptóticas Bax e PUMA aumentaram tanto na linhagem U87wt, quanto na linhagem U87Xi, ao superexpressar p53. Além disso, os

níveis de p21 e da proteína anti-apoptótica Bcl-xL foram reduzidos na linhagem U87Xi em relação ao controle U87wt. Outra constatação importante foi o aumento dos níveis de caspase-3 na linhagem U87Xi em relação ao controle U87wt e um aumento ainda maior nas células com a intervenção combinada (U87XiP+). Todos estes dados convergem para o fato de que a combinação do silenciamento de XIAP e superexpressão de p53 é mais efetiva na redução da proliferação e indução de morte na linhagem de glioma U87, do que as manipulações gênicas realizadas de forma isoladas, além de sugerir uma possível via de integração entre XIAP e p53, tendo como ponto de conexão o controle dos níveis citoplasmáticos da proteína p21 tanto por p53, quanto por XIAP, mostrando que a modulação combinada de proteínas da via apoptótica é capaz de potencializar os efeitos produzidos pelas intervenções de forma isoladas, representando uma nova e promissora estratégia no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de Gliomas.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GLIOMAS

### 1.1.1 Características Gerais e Epidemiologia

Gliomas compreendem um grupo de doenças oncológicas bastante particular, uma vez que sua tumorigênese encontra-se restritamente relacionada às células gliais, seja ela adulta ou precursora e, diferente dos demais tipos de cânceres que podem se disseminar por todo o corpo, os Gliomas são encontrados apenas nos tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC), apresentando pouquíssimas evidências de metástase sistêmica [1]. Ainda, este tipo de neoplasia caracteriza-se por ser agressiva, altamente infiltrativa e neurologicamente destrutiva, o que leva a uma degeneração e comprometimento da arquitetura neural e invasão do tecido sadio, resultando em problemas neurológicos ao paciente e dificultando o tratamento desta através da ressecção cirúrgica [2].

Gliomas constituem o subtipo mais comum de tumores primários do SNC, correspondendo a cerca de 80% desses cânceres [3-5]. Além disso, esse tipo de tumor é considerado um dos mais devastadores e mortais dentre os cânceres humanos, correspondendo a 1,4% de todos os tipos de neoplasias e 2,4% de todas as mortes causadas por câncer nos Estados Unidos (EUA) [6].

Segundo o último levantamento de dados sobre tumores primários do SNC, uma estimativa de aproximadamente 65.000 novos casos de neoplasia primária cerebral seria esperada para o ano de 2011, nos EUA e, cerca de 13.000 mortes seriam atribuídas a este tipo de tumor no mesmo ano [5]. Valores bastante elevados, quando comparados aos dados referentes ao ano de 2007, onde foram registrados cerca de 20.500 novos casos de tumores primários cerebrais e aproximadamente 12.500 mortes relacionadas a este tipo de tumor [7]. Isso revela um dado preocupante, ao ser esperado



um aumento de aproximadamente três vezes no número de novos registros, mas mostra também que o controle do número de morte relacionada a este tipo de câncer também é esperado que cresça. Isso se dá devido aos avanços que são previstos na pesquisa para o tratamento desse tipo de câncer e, para isso, o empenho na busca de novas estratégias terapêuticas deve se intensificar cada vez mais, visto que pesquisas mostram um crescimento absurdo no número de novos casos de tumores primários do SNC. De acordo com dados publicados pelo *Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)*, nos EUA, a taxa de incidência média de tumores primários do SNC, registrados entre os anos de 2004 e 2007, é de aproximadamente 19.34 casos a cada 100.000 pessoas/ano, e se mostra sutilmente mais prevalente em mulheres do que em homens [5, 8]. Entretanto, esta prevalência se inverte quando é analisado somente o subtipo mais maligno de Gliomas, o Glioblastoma Multiforme, mostrando uma prevalência maior em homens [9]. Ainda, tumores primários cerebrais parecem ser prevalentes em dois grupos etários, representando um pico de incidência em crianças de 0-8 anos [10-12] e outro pico em adultos de 50-70 anos [8, 13]. Além disso, a incidência de Gliomas encontra-se, também, mais elevada em países desenvolvidos, comparando com países menos desenvolvidos [14].

Segundo dados nacionais, divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva (INCA) (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>), para o Brasil em 2012, cerca de 4.800 novos casos de câncer do SNC são esperados em homens e cerca de 4.400 em mulheres, correspondendo a uma estimativa média de 5/100 mil para homens e 4/100 mil novos casos para mulheres. Dados regionais deste mesmo levantamento mostram que a região Sul é a mais prevalente no número de novas ocorrências de câncer do SNC, tanto para homens quanto para mulheres (6,92/100 mil para homens e 6,31/100 mil para mulheres), seguida pelas regiões sudeste (5,98/100 mil para homens e 5,43/100 mil para mulheres) e Centro-Oeste (5,92/100 mil para homens e 5,43/100 mil para mulheres).

O Rio Grande do Sul ocupa a 4º colocação no número absoluto estimado de novos casos deste tipo de neoplasia para o ano de 2012, com cerca de 820 novos casos, perdendo somente para São Paulo (2.600), Minas Gerais (1.000) e Rio de Janeiro (910). Entretanto, quando estes números absolutos são estimados de acordo com a população de cada estado, o Rio Grande do Sul atinge o primeiro lugar com cerca de 7,67 novos casos de câncer do SNC para cada 100 mil habitantes para homens e uma estimativa média de 7,2/100 mil para mulheres, superando e muito a média nacional. Isso demonstra que além de uma preocupação mundial devido a sua agressividade e malignidade, tumores do SNC, dentre eles os Gliomas, representam uma problemática da região sul do Brasil, mais especificamente do estado do Rio Grande do Sul, justificando todos os esforços na tentativa de se buscar um aprimoramento no tratamento e prevenção deste tipo de neoplasia.

### **1.1.2 Classificação dos Gliomas**

Graças aos avanços da medicina, ao surgimento de novos equipamentos de diagnóstico e imagem e a elaboração de novas técnicas clínicas para o tratamento de neoplasias cerebrais no século XIX, tornou-se possível a implementação de uma nova estratégia no combate a esse tipo de neoplasia que foi a remoção da massa tumoral através de ressecção cirúrgica. Entretanto, este tipo de intervenção nem sempre garantia o sucesso no tratamento dos pacientes que, por hora apresentavam uma melhora, por hora tinham o seu quadro clínico agravado por serem acometidos por uma recidiva tumoral. Além disso, com o avanço tecnológico nas áreas da histologia e caracterização molecular dos variados tipos celulares, através de uma análise minuciosa da massa tumoral retirada, constatou-se a existência de inúmeras formas de manifestação de tumores cerebrais que, a olho nu, não era possível constatar diferenças entre elas.

Com isso, devido à grande semelhança entre os mais variados subtipos de tumores cerebrais, somada à ineficácia das intervenções

cirúrgicas no tratamento desses tumores, Harvey Cushing e Percival Bailey (1926) marcaram seus nomes na história da pesquisa clínica oncológica ao tornarem-se os pioneiros no desenvolvimento de um sistema de classificação diagnóstica para Gliomas. Este sistema baseava-se nas características histopatológicas dos tumores, correlacionando-as com seus resultados clínicos [15], e a sua classificação era realizada de acordo com o nível de semelhança morfológica entre as células neoplásicas e os tipos celulares estromais normais encontrados no SNC. Com isso, criou-se a primeiro quesito de classificação que distingue as neoplasias cerebrais em três grupos distintos de tumores: 1) Astrocitomas – tumores com aspectos morfológicos de células astrocíticas, 2) Oligodendrogliomas – tumores com semelhanças aos oligodendrócitos; e 3) Ependimomas – tumores com características de células Ependimais [1, 16-19].

Com o passar dos anos e através do desenvolvimento de novas metodologias de definição e caracterização celular, esse sistema de classificação foi sendo reestruturado e, além da morfologia celular e características histológicas, outros fatores foram sendo considerados para definir o subtipo dos tumores cerebrais. Assim, os parâmetros mais usados hoje em dia, são os definidos pela última atualização, acontecida em 2007, do sistema de classificação estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que, primeiramente, define os tipos tumorais de acordo com a sua intensidade: tumores de baixo grau (benignos) – abrangendo aqueles que apresentam uma taxa de crescimento lenta e que é possível uma total remoção da massa tumoral através de procedimentos cirúrgicos – e tumores de alto grau (malignos) – compreendendo todas as neoplasias que possuem uma alta taxa de progressão tumoral e que se caracterizam por serem altamente infiltrativos, não sendo possível uma total remoção através de ressecção cirúrgica, levando os pacientes ao óbito, em média, 12 a 18 meses após o diagnóstico, causado pela recidiva tumoral [12, 19-21]. Em seguida, esse sistema de classificação divide os tumores cerebrais em graus, de acordo com uma escala de malignidade baseada em características peculiares relacionadas ao perfil de proliferação, migração, estrutura celular, agressividade, entre outras [22]. De acordo com este critério, os Gliomas são divididos em quatro graus: tumores de **grau I** são

biologicamente benignos, possuem baixo potencial proliferativo, podem ser cirurgicamente removidos, se considerados ressectáveis, e são mais frequentes em crianças; o **grau II** abrange tumores de baixa malignidade, baixa atividade proliferativa, geralmente infiltrativos, apresentam pleomorfismo celular e pacientes possuem sobrevida média de 5-8 anos; o **grau III** integra os tumores com evidências histológicas de malignidade, alta atividade mitótica, pleomorfismo celular, presença de núcleo celular atípico, sobrevida média de poucos anos e, além de ressecção cirúrgica, os pacientes com essa variância de tumor recebem tratamento adjuvante com quimioterapia e/ou radioterapia; Já os tumores de **grau IV** são extremamente malignos, possuem todas as características citadas nos menores graus, além de apresentarem evidências de proliferação microvascular e necrose. Além disso, são irresponsivos ao tratamento com quimioterápicos e são altamente letais, tendo um prognóstico de sobrevida curto, após o diagnóstico [2, 12-13, 18, 23-25].

Existem dois grupos principais de Gliomas que estão entre as mais malignas formas de manifestação: os tumores astrocíticos (células com características moleculares e morfológicas semelhantes à Astrócitos) e os tumores Oligodendrocíticos (células com características moleculares e morfológicas semelhantes à Oligodendrócitos). Os Astrocitomas são classificados em Astrocitoma Pilocítico (grau I), Astrocitoma (grau II), Astrocitoma Anaplásico (grau III) e Glioblastoma Multiforme (GBM) (grau IV). Já os Oligodendrogliomas são classificados em Oligodendroglioma (grau II) e Oligodendroglioma Anaplásico (grau III) [12, 18, 20].

### **1.1.3 Glioblastoma Multiforme (GBM)**

O Glioma de grau IV, também chamado de Glioblastoma Multiforme, é a manifestação mais agressiva e letal dentre os tumores cerebrais. Apresenta todas as características de elevada malignidade dos Gliomas de

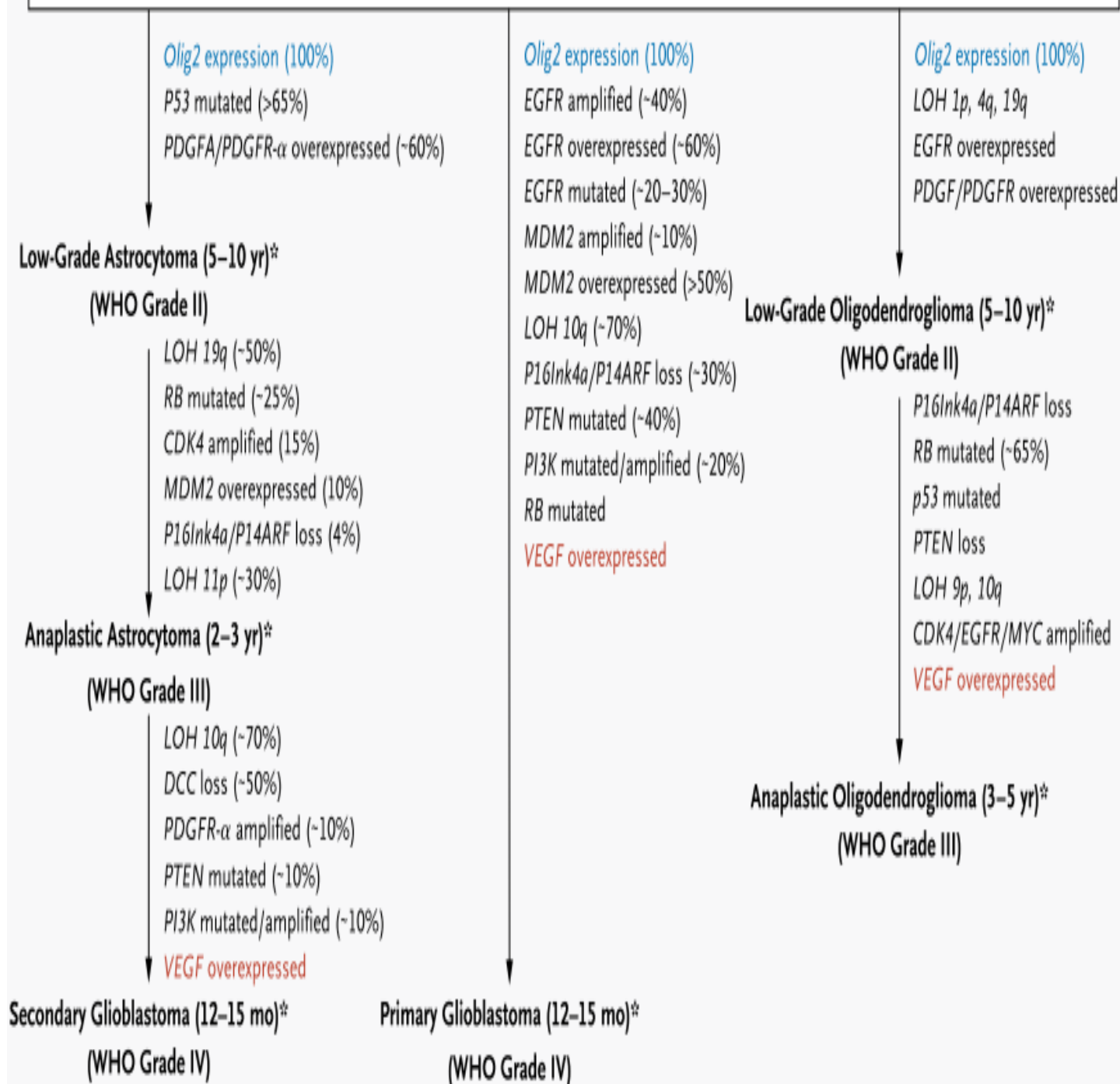
grau IV, tais como: crescimento tumoral acelerado, proliferação celular difusa e acentuada, alto poder infiltrativo, presença de áreas necróticas no interior do tumor, além de proliferação microvascular [2, 4, 13, 20, 23].

Como consequência deste perfil de agressividade, o prognóstico dos pacientes portadores de GBM torna-se extremamente desfavorável, com sobrevida média de 12-18 meses a partir do diagnóstico [2, 18, 24], mesmo com o uso de diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento. Ainda, esses tumores podem surgir e se desenvolver em qualquer área do SNC e, dessa forma, acarretar em diferentes consequências clínicas para o paciente com esta neoplasia, podendo comprometer desde funções cognitivas, até funções de controle motor e hormonal [21].

Com base no histórico clínico da progressão tumoral, os Gliomas de grau IV são subdivididos em GBM primários ou GBM secundários, levando em conta seu provável histórico de surgimento, como mostrado na **figura 1**.

Caracterizam-se como GBM primário, os tumores agressivos, altamente invasivos e que surgem “*de novo*”, a partir da transformação tumoral de células estromais normais ou a partir de células precursoras já em um estado avançado de malignidade, chamadas células tronco tumorais. Entretanto, o fato de poderem surgir de células estromais normais não implica em um processo instantâneo e específico de transformação tumoral e com base em uma única etapa de malignização. Quando os GBM surgem a partir de uma célula estromal normal, esta adquire múltiplas alterações genéticas que se acumulam com o passar do tempo e, somadas a fatores ambientais que favorecem a transformação tumoral como exposição a radiações ou substâncias mutagênicas, tabagismo, maus hábitos alimentares, dão origem ao tumor maligno. GBM primários estão tipicamente presentes em pacientes de idades mais avançadas e que não possuem um

Cell-of-Origin: Differentiated Glial or Stem or Progenitor Cells



**Figura 1: Vias das alterações genéticas mais frequentes no desenvolvimento de Gliomas malignos.** O quadro mostra a alterações genéticas e cromossômicas no desenvolvimento dos três principais tipos de Gliomas Malignos (GBM primário, GBM secundário e Oligodendroglioma Anaplásico). As características genéticas mostradas em vermelho (superexpressão de VEGF) e em azul (expressão de Olig2) estão presentes em todos os Gliomas de alto grau (II, III ou IV). O tempo médio de sobrevivência de cada subtipo de Glioma está assinalado com um asterisco. Retirado de: Wen, P. Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults. N Engl J Med*, 2008 [18].

histórico de evidências ou sintomas prévios provocados por tumores de menor grau, constituindo aproximadamente 90% de todos os GBM.

Já os GBM secundários possuem as mesmas características comportamentais e histopatológicas de malignidade, porém são comumente observados em pacientes mais jovens e são derivados de uma constante e progressiva transformação de Astrocitomas de menor grau em tipos tumorais mais malignos até, rapidamente, atingirem o estágio de GBM. Aproximadamente 70% dos Gliomas de grau II transformam-se em graus III/IV dentro de 5-10 anos após o diagnóstico, independentemente da terapia inicial usada para o tratamento. Uma mistura de diferentes Gliomas em estágios avançados ou Oligodendrogliomas também podem dar origem ao surgimento de GBM [2, 13, 16-17, 26-28].

Além disso, GBM primários e secundários são histopatologicamente e clinicamente indistinguíveis, apesar de apresentarem históricos clínicos bastante distintos [29]. Com o avanço nas técnicas de caracterização e identificação de alterações genéticas que cada neoplasia apresenta, foi possível criar um perfil de modificações na expressão de genes importantes na manutenção da homeostasia celular para ajudar na predição das origens de cada tumor, de acordo com a frequência de cada modificação genética nas determinadas subclasses de Glioma. Na década passada, estudos mostraram que o quadro de alterações genéticas entre esses dois tipos de GBM é distinto, além de apresentarem diferenças no perfil de expressão de RNA e proteína [30-32] e afetarem pacientes de diferentes idades [8, 33]. A partir desses dados, foi proposto que estas duas subclasses sejam tratadas como dois casos clínicos distintos [22]. Entretanto, esta distinção não é clara quando comparamos suas características biológicas como morfologia tumoral, agressividade, manifestação clínica e resistência a terapias [2], e esta separação permanece conceitual, sem ser usada como um fator de diagnóstico, já que os dois subtipos são considerados histopatologicamente indistinguíveis.

Portanto, a pesquisa com GBM e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas devem considerar não somente as características patológicas que classificam este tipo de tumor como grau IV, mas também fatores que influenciam na predição do seu histórico de gliomagênese. Assim, devem-se levar em conta também as alterações genótípicas e funcionais nas principais vias de sinalização que caracterizam as duas subclasses de GBM, mesmo não estando esclarecidas as diferenças fenotípicas que este conjunto de alterações genéticas possa causar nos tumores.

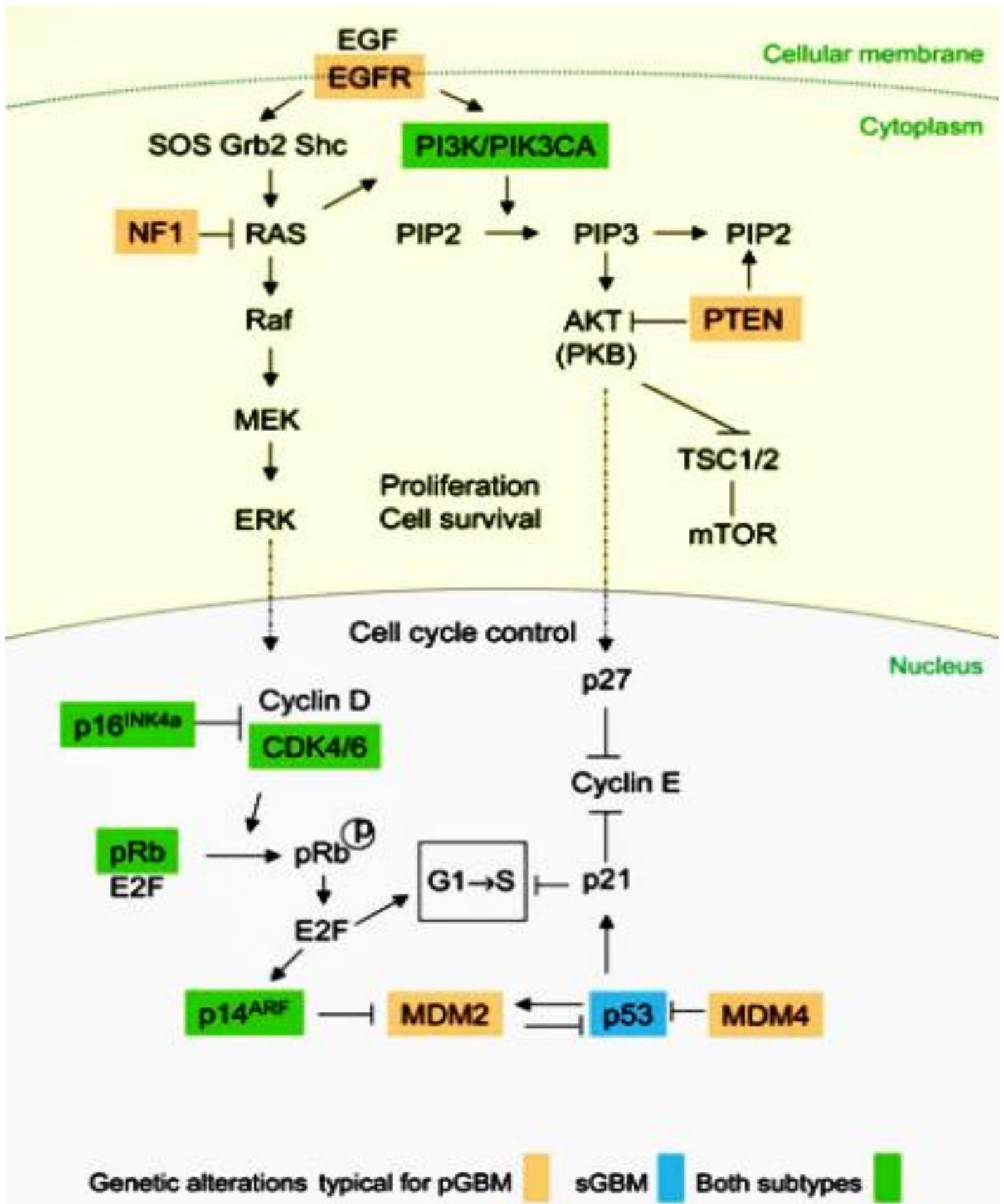
#### **1.1.4 Sinalização Celular – Principais Vias Alteradas em Gliomas**

Gliomas estão inseridos em um grupo de tumores que possui uma variedade de fatores distintos que causam grandes interferências em relação ao seu surgimento e desenvolvimento, o que faz destes, uma classe de neoplasias extremamente heterogênea [34-37]. Entretanto, apesar das inúmeras diferenças genótípicas e fenotípicas que diferem as variadas classes de Gliomas, estas apresentam alterações em comum que estão, principalmente, relacionadas com vias de sinalização celular responsáveis por mecanismos importantes na progressão tumoral como apoptose, progressão no ciclo celular, migração, diferenciação, invasão, entre outros [29, 38-40].

Diversos estudos, relacionando alterações genéticas com diferentes fenótipos celulares, mostraram que existem três vias principais de sinalização celulares que se encontram frequentemente alteradas em Gliomas. A via da RTK/PI3K/AKT/PTEN; A via da p53/MDM-2/p14; E a via da Rb1/CKD4/P16 [2, 23, 29, 38, 40]. Juntas, as alterações genéticas nessas três principais vias esclarecem a grande maioria dos eventos de transformação, progressão tumoral e desenvolvimento de malignidade, uma



vez que controlam mecanismos altamente relacionados com a tumorigênese, progressão tumoral, resistências a mecanismos de proteção intrínsecos celulares e agressividade (**FIGURA 2**). No presente trabalho será discutida cada uma delas, dando ênfase para a via da p53/MDM-2/p14.



**Figura 2: Principais vias de sinalização celular envolvidas na patogênese de Glioblastomas (GBM).** A figura mostra a integração entre as vias de receptores tirosina cinase (RTK), via da p53 e a via de controle do ciclo celular, via da Rb. pGBM, Glioblastoma primário; sGBM, Glioblastoma secundário. Retirado e adaptado de: Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. *Cancer Sci*, 2009 [41].

### 1.1.4.a Via da RTK/PI3K/AKT/PTEN

Esta via é de extrema importância para o desenvolvimento tumoral, pois é uma das responsáveis pela transdução de sinais gerados por moléculas indutoras de proliferação celular como Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet derived Growth Factor* - PDGF) ou Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor* - EGF), tornando-se um das peças-chave para o desenvolvimento de GBM primários [42]. Os Gliomas podem ter a ativação dessa via alterada através de diferentes mecanismos, como: superexpressão dos ligantes e/ou do próprio receptor para ativação autócrina, gerando uma retroalimentação positiva; amplificação genômica; mutações no receptor, tornando-o constitutivamente ativo na ausência do ligante; e ativação permanente de transdutores de sinais intracelulares, causado geralmente por inativação de reguladores negativos da via de sinalização, como a proteína supressora tumoral PTEN (*phosphatase and tensin homology*) [43].

Dentre os receptores tirosina cinase (RTK) que iniciam a cascata de sinalização desta via, as alterações no receptor de EGF (EGFR) parecem ser de grande importância para a gliomagenese. A amplificação gênica deste receptor ocorre em aproximadamente 40% dos GBM primários e é caracterizada como a alteração mais comum nesse subtipo de GBM, mas raramente ocorre em GBM secundários [33, 44-45]. Da mesma forma, a superexpressão do EGFR é mais comum em GBM primários (>60%) do que em secundários (<10%) [44]. As principais alterações no EGFR relatadas são deleções no domínio extracelular (variante III do EGFR), a qual não está presente em tecidos normais, mas são observadas em 20-30% dos pacientes com GBM [46-48], mutações pontuais no domínio extracelular ou deleções no domínio citoplasmático [49-50]. Todas estas, sendo responsáveis por alterar o funcionamento fisiológico do receptor, e algumas delas, tendo como consequência, a ativação constitutiva, sem a presença do ligante.

A partir desta ativação constitutiva do receptor EGFR, resultante de alterações genéticas sofridas durante a transformação tumoral nos Gliomas, há também uma ativação constitutiva de uma série de vias intracelulares, uma vez que este receptor é responsável pela indução e controle de diversas rotas de sinalização envolvidas principalmente em mecanismos de proliferação e sobrevivência celular [46, 51]. Dentre as vias ativadas está a via da PI3K/AKT, que é responsável por inúmeros processos fisiológicos como proliferação celular, migração, invasão e inibição de apoptose. Ao tornar o EGFR constitutivamente ativado, ocorre o constante recrutamento da proteína fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) para a membrana celular, que é responsável por exercer sua atividade cinásica, transferindo uma molécula de fosfato para o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (IP2), transformando-o em fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3), o qual se torna capaz de ativar efetores “*downstream*”, de forma direta ou indireta, como a serina/treonina cinase AKT, também chamada de proteína cinase B (PKB) e a proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*), respectivamente. A ativação de AKT resulta em uma série de eventos celulares distintos direcionados à proliferação (por inibição de vários fatores que bloqueiam a progressão no ciclo celular) e sobrevivência celular (através do bloqueio de mecanismos pró-apoptóticos e ativação de mecanismos anti-apoptóticos) [41], assim como a ativação de mTOR – que tem como função regular mecanismos de sobrevivência e proliferação celular, autofagia, síntese de proteínas, transcrição gênica, entre outros – concluindo que a ativação constitutiva de receptores de fatores de crescimento, resulta em uma desregulação celular bastante incisiva e que colabora para uma futura malignização celular.

A proteína PTEN, também conhecida como MMAC1 (sigla originada de *mutated in multiple advanced cancers*) está localizada no cromossomo 10p23.3 [52-53], possuindo um domínio central homólogo à região catalítica de proteínas tirosina fosfatases, o qual dá a estas uma função de proteína fosfatase [54-56] e de 3-fosfatidilinositol fosfatase [57]. Além disso, possui um domínio com homologia às moléculas de adesão, tornando-a importante nos processos de migração e invasão celular, por defosforilar diretamente proteínas de adesão focal [55]. A PTEN é considerada uma proteína supressora tumoral [52-53], justamente por realizar uma regulação negativa

na via da PI3K/AKT através da defosforilação da molécula PIP3 para IP2 [58], impedindo a ativação de AKT e de outras proteínas que também são ativadas por esta molécula, quando se encontra na sua forma trifosfatada, atuando indiretamente na regulação do ciclo celular, prevenindo que as células cresçam de maneira acelerada e descontrolada [59]. Durante a tumorigênese, mutações ou deleções no gene da PTEN são fenômenos bastante comuns nos mais variados tipos tumorais, o que resulta na inativação da sua atividade enzimática e, por consequência, na perda da sua função de controle negativo da via da AKT, levando a um aumento na proliferação celular e na resistência à morte celular. Este gene foi catalogado como alterado, tanto por mutações, quanto por perda alélica, em diversos tipos de cânceres [52] e em Glioblastomas Multiformes (GBM) a PTEN encontra-se mutada ou deletada em 15-40% dos tumores, quase que exclusivamente em GBM primários [33, 60], evidenciando que mutações neste gene são bastante importantes para a malignização *de novo* em Gliomas.

Portanto, a via de sinalização composta pelos receptores tirosina cinase (RTK), pelas proteínas cinases PI3K e AKT e o regulador negativo PTEN é considerada uma via de extrema importância para diversos mecanismos celulares relacionados com sobrevivência e proliferação celular e sua integridade se faz necessária para a manutenção da homeostase celular e o correto funcionamento das atividades biológicas reguladas por ela. Estudos mostram que cerca de dois terços (em torno de 63%) dos GBM primários e cerca de um terço dos GBM secundários apresentam alterações no funcionamento de pelo menos um dos integrantes principais dessa via [42].

#### **1.1.4.b Via da Rb1/CKD4/P16<sup>INK4A</sup>**

A via da proteína do Retinoblastoma (pRb), como é conhecida, tem como seus integrantes-chave: a própria proteína Rb; a proteína cinase dependente de ciclina 4 (CDK4), a qual forma um complexo com a proteína

ciclina D1; a p16<sup>INK4A</sup>; e o fator de transcrição E2F, efetor final desta via [41]. Através destes integrantes, esta via tem como função principal a regulação direta de uma das etapas do processo de proliferação celular. Além disso, estudos mostram também que esta via está relacionada com a determinação do destino celular, através da indução de apoptose [61-62].

A proliferação celular está fortemente regulada por pontos de checagem (“*Checkpoints*”) específicos em diversos estágios do ciclo celular. Um desses pontos de checagem é finamente controlado pela proteína E2F, que atua como fator de transcrição de proteínas responsáveis pela passagem da fase G1 para a para S do ciclo celular, assim como de proteínas envolvidas na replicação do DNA, síntese de nucleotídeos, reparo ao DNA, entre outras [29, 63]. Entretanto, a ativação do mecanismo de replicação do DNA e a progressão nas etapas iniciais do ciclo celular são amplamente reguladas por uma série de complexos protéicos que atuam diretamente sobre outra proteína bastante importante para todo o processo, chamada proteína Rb, que regula negativamente, por interação direta, o fator de transcrição E2F [64].

O gene Retinoblastoma (RB1) localiza-se no cromossomo 13q14 e codifica a proteína Retinoblastoma (pRb), a qual representa um fator-chave nessa via de sinalização, atuando como um inibidor da progressão na fase inicial do ciclo celular, através da sua interação com E2F. Em um estado celular homeostático, a pRb encontra-se hipofosforilada e ligada diretamente a E2F, impedindo que esta realize a transcrição de genes importantes para a progressão do ciclo celular. Uma vez que a célula recebe um estímulo mitótico, ocorre a formação de um complexo entre proteínas ciclina D e as cinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6. Este complexo interage diretamente com a proteína Rb e, através da atividade cinásica das CDKs 4 e 6, ocorre a transferência de grupamentos fosfatos para resíduos específicos de aminoácidos na proteína Rb, tornando-a fosforilada. Esta fosforilação de Rb ainda é completada por outro complexo formado pelas proteínas ciclina E e CDK2. Esse estado de hiperfosforilação da proteína pRb, provocado por esses dois complexos ciclina/CDK, provoca um impedimento alostérico de interação entre Rb e E2F, em razão dos diversos

resíduos de fosfatos anexados à proteína Rb, provocando alterações na sua estrutura e carga, causando a liberação de E2F do complexo anteriormente formado com a proteína pRb. Esta liberação de E2F, consequentemente, provoca a transcrição de genes responsivos a este fator de transcrição, envolvidos principalmente na síntese de DNA, permitindo que a célula avance da fase G1 do ciclo celular para a fase S [2, 38, 61, 64].

A proteína supressora tumoral p16<sup>INK4A</sup>, conhecida também como inibidora de cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A), é um dos elementos principais desta via, pois atua da mesma forma que a proteína PTEN na via das RTKs, realizando uma regulação negativa da progressão no ciclo celular. Codificada pelo gene INK4a, localizado no cromossomo 9p21 (região perdida em muitos tipos de cânceres), a p16<sup>INK4A</sup> é responsável por interagir diretamente com a proteína CDK4, impedindo a ligação de ciclina D à CDK 4/6, inibindo a formação do complexo ativo ciclina D/CDK4/6. Como resultado da não-formação do complexo ciclina D/CDK4/6, a proteína Rb permanece no seu estado hipofosforilado e se mantém complexada à E2F, conservando E2F no seu estado sequestrado por Rb, impedindo a atuação deste como fator de transcrição. Com isso, não são transcritos os fatores necessários para a progressão no ciclo celular e a célula se mantém no seu estado não proliferativo ou quiescente [38, 64-65].

Deste modo, diversas alterações podem ocorrer nesta via de sinalização que contribuem para a transformação de células normais em células tumorais ou, até mesmo, para a progressão no processo de malignização de células já transformadas. Mutações e deleções no gene Rb estão associadas com a gênese do Retinoblastoma [66], o mais comum tumor intra-ocular pediátrico, e também foram descritas em aproximadamente 25% dos Astrocitomas de alto grau [67-68], além de estarem presentes em quase todos os GBMs [22]. Metilações no promotor de Rb são encontradas com mais frequência em Gliomas de alto grau em comparação com Gliomas de menor grau, preferencialmente GBM primários (43%) do que GBM secundários (14%), causando uma inativação do gene [69]. Alterações neste gene podem ser também por consequência de perda

de heterozigozidade (do inglês “*Loss of heterozigosity*” – LOH) do cromossomo 13 ou da região codificadora da pRb.

Ainda, inativação de p16<sup>INK4A</sup> é muito comum em Gliomas, ocorrendo em 50-70% dos Gliomas de alto grau e atingindo a marca de 90% em GBM [70-71], sendo mais frequente em Gliomas primários do que em secundários [72-73]. Outras alterações nesta via são descritas na literatura como estando associadas com a transformação ou progressão tumoral: Linhagens de GBM exibem uma relação inversa entre os níveis de p27 e o seu índice proliferativo e/ou sua taxa de mortalidade [74]; a amplificação gênica de CDK4 de 10-100 vezes está presente em 15% de tumores de alto grau [75-76]; entre outras.

Um recente projeto piloto realizado pelo The Cancer Genome Atlas (TCGA) reuniu informações a respeito das alterações mais frequentes em GBM, a maioria utilizando informações de GBM primários, e viu-se uma frequência de alterações genéticas na via de sinalização do gene RB1 de aproximadamente 78%, incluindo alterações nos genes de p15, p16, p18, CDK4, ciclina D, CDK6 e no próprio gene da RB1 [40], mostrando que, assim como a via dos receptores tirosina cinase (RTK), a via da Rb constitui uma rota de sinalização de bastante importância para a indução da tumorigênese, justamente por estar envolvida efetivamente no controle da entrada no ciclo celular. Um descontrole funcional resultante de alterações genéticas, principalmente em Rb, P16<sup>INK4A</sup>, CDKs e ciclinas, pode resultar em um mau funcionamento deste mecanismo celular e a intensificação ou ativação constitutiva do ciclo celular pode ser um marco importante na tumorigênese e/ou progressão tumoral.

#### **1.1.4.c Via da p53/MDM-2/p14**

A via da p53 corresponde a uma via bastante particular, com características bem distintas às demais vias apresentadas anteriormente. Esta rota de sinalização caracteriza-se muito mais por desempenhar um



papel de regulação e controle da sinalização dos principais mecanismos celulares, do que realizar uma função específica de coordenação direta de um dos mecanismos [77].

A p53 é uma proteína muito importante no controle da homeostase celular, sendo responsável por desencadear diversos eventos celulares em resposta a distintos estímulos internos e/ou externos. Codificada pelo gene TP53, localizado no cromossomo 17p13.1, a proteína p53 é designada como a “guardiã do genoma” [38], e tem como sua principal função atuar como fator de transcrição, regulando a região promotora de mais de 2.500 genes [78-79], dentre eles, genes envolvidos no controle da apoptose, ciclo celular, senescência, reparo de DNA, diferenciação celular, neovascularização, dentre outros [80-84]. Em situações de estresse genômico ou ativação de oncogenes, dois sinais ativadores da p53, a proteína desempenha funções que a caracterizam com uma proteína supressora tumoral, desencadeia mecanismos antitumorais de acordo com o seu perfil de ativação, em resposta aos estímulos recebidos. Dentre os mecanismos mais clássicos modulados por p53 está: a parada no ciclo celular, através da expressão da proteína p21, principalmente; o desencadeamento de um dos principais processos de morte celular programada, a apoptose, através da expressão de proteínas pró-apoptóticas e repressão da expressão de proteínas anti-apoptóticas; além da modulação do mecanismo de senescência replicativa, regulando o ciclo celular através de p14<sup>ARF</sup>. Com isso, p53 desempenha uma função central no controle das respostas celulares a diversos estímulos e sua inativação direta ou indireta se torna um fator muito importante para a tumorigênese e progressão tumoral [2].

O mais bem caracterizado gene efetor responsivo a p53 é o alvo transcricional CDKN1A, o qual codifica a proteína inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CKI), chamada p21 [85]. Quando transcrita por p53 em resposta a um estresse genotóxico ou citotóxico, por exemplo, esta é responsável por regular negativamente a progressão no ciclo celular, impedindo a ação cinásica em Rb, dos complexos CDK4/ciclina D1 e CDK2/ciclina E. Em um estado hipofosforilado, a proteína Rb mantém-se acoplada a proteína E2F, impedindo que esta atue como fator de transcrição

de proteínas essenciais para a progressão da fase G1 para a fase S, causando uma parada reversível no ciclo celular [64, 86].

MDM-2 (*Murine Double Minute-2*) é outra proteína integrante desta via, que é alvo transcricional de p53 e tem como função principal regular os níveis da própria p53 e sua atividade transcricional na célula. Localizada no cromossomo 12q14.3-15, a MDM-2 inibe a atividade transcricional de p53, diretamente por se ligar no domínio de transativação (*TAD – trans activation domain*), localizado na região N-terminal da p53, bloqueando sua interação com o DNA. Além disso, MDM-2 ainda age como uma E3 ubiquitina ligase, sendo capaz de transferir diversas moléculas de ubiquitina para resíduos de lisina localizados na região C-terminal da proteína p53, mais especificamente na região chamada sítio de poliubiquitinação. O acúmulo de lisinas carregadas com moléculas de ubiquitina caracteriza um sinal celular para degradação protéica via proteossoma, resultando na redução dos níveis de p53 citoplasmáticos [87-91]. Sendo assim, MDM-2 provoca uma retroalimentação negativa de maneira proteossoma-dependente [92], uma vez que o acúmulo de p53 provoca um aumento na atividade transcricional do gene de MDM-2 e o consequente aumento dos níveis de MDM-2 provoca uma modulação negativa através da degradação de p53 citoplasmático, na ausência de estímulos estabilizadores de p53 [93-94].

Um desses estímulos estabilizadores se dá pela ação de outro modulador desta via de sinalização, que é a proteína p14<sup>ARF</sup>. Codificada por um processamento alternativo do mesmo gene que transcreve a proteína p16, chamado de CDKN2A, esta proteína também se caracteriza por ser uma proteína supressora tumoral, uma vez que é responsável por bloquear as ações da p53 ubiquitina ligase, MDM-2. p14<sup>ARF</sup> liga-se diretamente a MDM-2 e bloqueia sua ação, tanto de interrupção da atividade transcricional de p53, quanto de indução de degradação de p53 através da sua poliubiquitinação [86, 95-98]. Além disso, p14<sup>ARF</sup> tem seus níveis celulares negativamente controlados pela própria p53, além de ser induzida pelo fator de transcrição E2F. Assim, E2F provoca uma progressão no ciclo celular e controla, por intermédio de p14<sup>ARF</sup>, a regulação negativa do ciclo celular que é induzida via p53/p21 [86].

Surpreendentemente, p14<sup>ARF</sup> ainda pode provocar a degradação de p53, de uma maneira independente de MDM-2, através da sua associação com a proteína BP1, onde, juntas, se ligam e ubiquitinam p53, levando a sua degradação [99]. Entretanto, o aumento de p14<sup>ARF</sup> geralmente causa um acúmulo de p53 via modulação da ação de MDM-2. Além disso, o complexo p14<sup>ARF</sup>/BP1 pode causar a degradação, através do sinal de poliubiquitinação, de proteínas anti-apoptóticas, como membros da família Bcl-2, entre elas a própria Bcl-2 e Mcl-1, conferindo a p14<sup>ARF</sup>, também, um perfil de proteína indutora de apoptose, em determinadas circunstâncias [100]. Outras funções de caráter nuclear ainda são conferidas a esta proteína, como regular a biogênese de ribossomos [101], ao associar-se com B23, e provocar sumoilação em diversos alvos protéicos, gerando estabilidade e controlando atividade de fatores de transcrição, já que esta localiza-se predominantemente no núcleo [102].

Alterações somáticas em p53 são encontradas em aproximadamente 50% de todas as neoplasias humanas e representam uma alteração fundamental na tumorigênese e, principalmente, na progressão tumoral, quando falamos em Gliomas [103-104]. A frequência de alterações está diretamente relacionada com o tipo tumoral, variando de 10% em leucemias, 20% em câncer de mama, 30% em câncer gástrico, 35% em Glioblastomas e mais de 60% em câncer colorretal e ovariano [40, 104].

A maioria das mutações mais frequentes, que acontecem no gene da p53 estão relacionadas com a perda da habilidade desta em transativar os promotores de genes importantes para a manutenção do correto funcionamento celular como: MDM-2, Bax, NOXA, GADD45, AIP1, 14-3-3σ e p21 [105]. Esta relação se dá, devido ao fato que mais de 95% das mutações em p53 acontecem no domínio de ligação ao DNA, região essencial para que p53 atue como fator de transcrição [106].

Sabendo da importância que p53 imprime na origem e na progressão da maioria dos cânceres e que apenas 50% das neoplasias possuem inativação de p53, o restante dos cânceres deve apresentar alguma alteração genética que contribua para o mau funcionamento ou até mesmo a inibição das funções de p53. E isso é o que realmente ocorre, através de

alterações em proteínas regulatórias de p53, como superexpressão do regulador negativo MDM-2 [103, 107] ou perda de p14<sup>ARF</sup>, proteína estimulatória de p53 através da inibição de MDM-2 [72, 108-109].

Portanto, assim como as demais vias apresentadas até o momento, a via da p53 também se mostra de intensa importância para o correto funcionamento dos principais mecanismos de manutenção da homeostase celular e tem papel fundamental na tumorigênese e na malignização tumoral. Estudos mostram que cerca de 50% dos GBM primários e 70% dos GBM secundários apresentam alguma alteração genética dentre as destacadas na revisão desta via de sinalização [110] e o recente trabalho publicado pelo TCGA, utilizando dados de GBM, na sua maioria utilizando dados de GBM primários, relatou uma altíssima frequência de 87% de GBM apresentando alguma alteração genética na via da p53 [40], mostrando o quão essenciais são as alterações genéticas nos integrantes dessa rota de sinalização para a transformação celular e o estabelecimento e malignização de células neoplásicas.

Além disso, a importância da via da p53 e a relevância da própria proteína p53 para o surgimento, manutenção e progressão de Gliomas ainda é ressaltada por um aumento na incidência de Gliomas em pacientes que apresentam uma síndrome familiar com predisposição ao câncer que está associada a uma mutação em p53 na linhagem germinativa, chamada Síndrome de Li-Fraumeni [111-112]. Esta ligação genética entre a predisposição ao surgimento de Gliomas e a Síndrome de Li-Fraumeni ainda foi reforçada por um estudo realizado com camundongos, que mimetizava a síndrome pela inserção de uma mutação em p53 e verificando a ocorrência de um aumento na predisposição ao surgimento de Gliomas [113].

## 1.2 XIAP: O MAIS POTENTE INTEGRANTE DA FAMÍLIA DAS IAPs

XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), também conhecida como MIHA, hILP ou BIRC4, é uma proteína de 57 kDa, pertencente à família das IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), constantemente expressa em tecidos adultos e fetais [114] e que tem como principal função, assim como os demais integrantes dessa família, inibir o processo de apoptose, através da interação e bloqueio do funcionamento de proteínas com atividade proteásica, as quais são conhecidas como fundamentais para o desencadeamento deste processo celular, chamadas caspases (*Cysteine-aspartic-acid Proteases*). No caso particular da proteína XIAP, a função de bloqueio do processo de apoptose acontece, especificamente, através da interação e bloqueio da atividade das caspases -3, -7 e -9, mas não das caspases-1, -6, -8, ou -10 [115-119]. Não está claro, mas esta seletividade da proteína XIAP, que também ocorre nos demais integrantes dessa família, pode acontecer em decorrência da composição aminoacídica de cada domínio BIR presente na proteína e das suas regiões inter-domínios [120-121].

Os domínios BIR (*Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat*) são estruturas de cerca de 80 aminoácidos, presentes na região N-terminal da proteína e podem variar de uma a três repetições entre os integrantes da família das IAPS. Estes domínios nada mais são do que motivos estruturais que definem os componentes que os possuem como integrantes da família das IAP, uma vez que estão presentes em todos eles e são indispensáveis para as suas atividades anti-apoptóticas, em virtude da capacidade dos domínios BIR de se ligarem diretamente e inibir a atividade dos diversos integrantes da família das caspases [115, 117, 119].

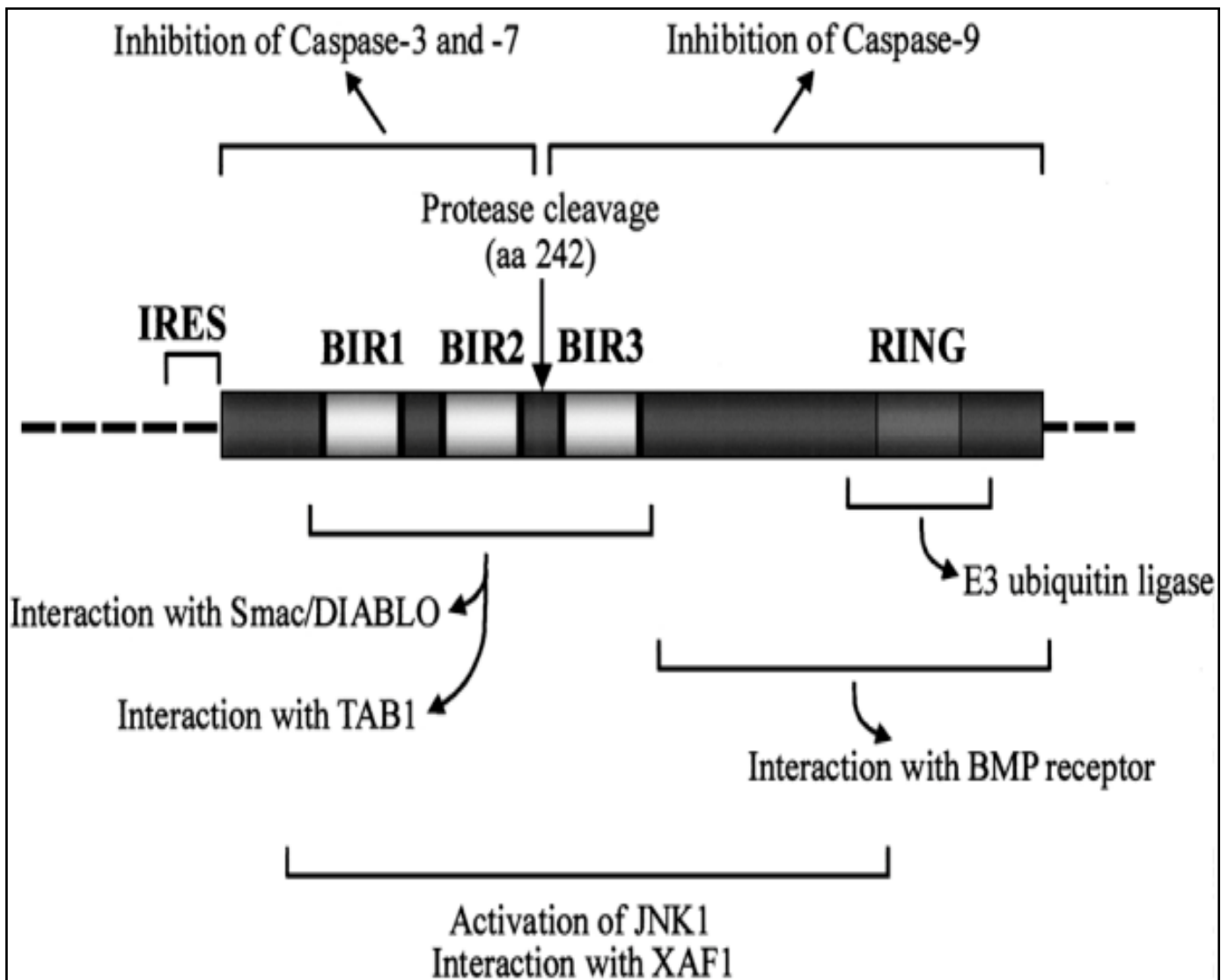
Outro domínio presente em alguns integrantes da família das IAP, e que está presente em XIAP, é o domínio RING na região C-terminal da proteína, o qual confere uma atividade de E3 ubiquitina ligase a esta proteína [122-124]. Além disso, a presença desse domínio parece ser

fundamental para as funções anti-apoptóticas de alguns membros da família das IAP, mas dispensável para outros [125].

XIAP é considerada a proteína mais potente da família das IAP, uma vez que esta é a única integrante que evoluiu para bloquear diretamente tanto as fases de iniciação da cascata das caspases, através da inibição da caspase-9 iniciadora, quanto à de execução, através da inibição das caspases -3 e -7 efetoras [126-128]. Assim, XIAP é capaz de bloquear a via apoptótica em etapas distintas e inibir a morte celular em resposta a múltiplos estímulos [129]. Uma destas razões que justificam a potencialidade desta proteína em bloquear a apoptose é a presença de três repetições do domínio BIR na sua região N-terminal (**figura 3**), já que cada domínio possui uma composição diferenciada e uma organização estrutural característica. Estudos mostram que a atividade inibitória de XIAP, em relação às caspases -3 e -7, acontece através de domínios estruturais BIR diferentes da atividade inibitória exercida sobre caspase-9 (BIR2 e BIR3, respectivamente) [121, 128, 130]. Além disso, sabe-se que há um sítio de clivagem por protease entre os domínios BIR2 e BIR3 e que esta clivagem é totalmente dependente da atividade de caspases, como pode ser visto na **figura 3** [131]. Isso pode significar um processo de retroalimentação positiva, onde caspases ativadas podem provocar uma clivagem de XIAP, removendo-a da célula apoptótica, fazendo com que um número maior de caspases seja ativado e, assim, permitindo que este processo de morte celular programada transcorra até o fim. Por outro lado, a clivagem de caspase pode representar também um evento de restrição da capacidade inibitória, elevando os níveis de especificidade de interação e bloqueio da atividade de caspases específicas, onde o aumento da expressão ou o acúmulo de um dos fragmentos pode representar uma adaptação celular frente a um estímulo constante de indução de morte por uma das diversas vias de sinalização em uma célula tumoral, por exemplo.

No ano de 2000, um trabalho publicado na revista *Cancer Research* mostrou que células de pacientes com câncer ovariano apresentavam altos níveis de expressão de XIAP fragmentada em relação às células de pacientes saudáveis. Isso sugere que a forma clivada de XIAP possa agir como

um inibidor suicida, permanecendo ligado à proteases e sinalizando para degradação proteolítica via proteossoma, destes efetores do processo apoptótico, contribuindo assim para o processo de tumorigênese e/ou progressão tumoral [131]. Isso pode acontecer, uma vez que um dos fragmentos gerados da clivagem de XIAP por proteases (fragmento C-terminal) contém um domínio RING (*Really Interesting New Gene*) de Zinco (**figura 3**), que possui atividade de E3 ubiquitina ligase, assim como a grande maioria das proteínas que apresentam este tipo de domínio [132-133].



**Figura 3: Domínios funcionais da proteína XIAP e seus locais de interação.** Maiores detalhes sobre as funções e interações de cada domínio, presentes no texto. Retirado e adaptado de: *Holcik, M., H. Gibson, and R.G. Korneluk, XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis, 2001 [125]*

Com isso, viu-se que este fragmento de XIAP é capaz de catalisar sua própria ubiquitinação e conseqüente degradação proteossomal, levando consigo unidades de caspases que interajam com o domínio BIR3. Somado a este fato, o fragmento remanescente perde a capacidade de ser degradado via proteossoma, por perder o domínio RING dedo de zinco que compunha o outro fragmento, aumentando a estabilidade e o acúmulo deste fragmento. Por conseqüência, este consegue bloquear mais unidades de caspases-3 e -7 efetoras através da interação pelo domínio BIR2, resultando em um aumento na sobrevivência celular [124], tornando-se um fator colaborativo para a progressão e manutenção de células tumorais. Desta forma, define-se que a atividade anti-apoptótica da proteína XIAP, assim como das outras proteínas integrantes da família das IAP, se dá por dois mecanismos distintos: a inibição enzimática da atividade das caspases, através da interação direta de seus domínios BIR com estas; e o direcionamento específico de caspases para a degradação proteolítica via proteossoma.

Além da modulação ambígua da atividade da XIAP por meio da sua clivagem entre os domínios BIR2 e BIR3, esta ainda pode ser negativamente regulada por, pelo menos, duas proteínas: XAF1 (*XIAP Associated Factor 1*) e Smac/Diablo (*Direct IAP Binding Protein with Low pI*).

XAF1 é responsável por interagir diretamente com XIAP e antagonizar a sua habilidade de bloquear a atividade de caspase. Intrigante é que, ao contrário da XIAP, que tem localização citoplasmática, a XAF1 possui localização nuclear. A interação entre essas duas proteínas se dá através de uma redistribuição da proteína XIAP. Para que isso aconteça, ocorre um sequestro de moléculas de XIAP, do citoplasma para o núcleo, provocado pela proteína XAF1, neutralizando XIAP da sua capacidade de bloquear o processo apoptótico [134]. Por esta razão é que XAF1 é denominada como uma proteína supressora tumoral e encontra-se normalmente expressa, de maneira constante e uniforme, em todos os tecidos adultos e fetais, porém encontra-se presente em níveis muito baixos ou inexistentes em diversas linhagens tumorais [134].



Ao contrário de XAF1, que possui localização nuclear, a proteína Smac/DIABLO normalmente reside no interior da mitocôndria. Quando a célula recebe algum estímulo que ative a via mitocondrial de indução de apoptose, ocorre uma permeabilização desta organela e Smac/DIABLO é liberada para o citoplasma, onde sofre um processamento proteolítico, tornando-se ativa após a remoção do seu peptídeo sinal N-terminal. Smac/DIABLO, na sua forma ativa, é capaz de interagir com XIAP, bloqueando a sua capacidade de ligação e inibição de caspases [135-136].

Estudos de duplo-híbrido revelaram interações de XIAP com outras proteínas como o receptor BMP (*Bone Morphogenic Protein*) e sua molécula sinalizadora TAB1 [137], mostrando que esta proteína pode estar envolvida em outros processos independentes do mecanismo de apoptose, uma vez que este receptor é membro da família dos TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), os quais estão implicados na regulação de diversos mecanismos como proliferação celular, morfogênese e diferenciação [137], além da interação de XIAP com a proteína JNK1 (*c-jun N-terminal Kinase*), integrante da via de sinalização das MAP (*Mitogen-activated protein*) cinase [138].

Apoptose é um dos principais mecanismos pelo qual os tratamentos clássicos contra o câncer, como quimio e radioterapia, são projetados, a fim de conseguir eliminar as células tumorais. A maioria destes tratamentos causa danos ao DNA e o excesso destes danos desencadeia cascatas de sinalização que convergem para a ativação de mecanismos de morte celular programada, dentre eles a apoptose. Entretanto, a maioria das neoplasias, senão todas, apresenta alterações genéticas que estão implicadas em burlar a ativação ou a consumação deste mecanismo, como uma forma de resistência aos processos detectores de danos e de desbalanço da homeostase celular. Estas alterações estão intimamente relacionadas com a origem e progressão tumoral, além da resistência a terapias. Muitos dados da literatura mostram que alterações no perfil de expressão de XIAP estão altamente ligadas as origens neoplásicas ou malignização tumoral [139], além de que a superexpressão desta proteína confere resistência a uma série de insultos citotóxicos e à ativação de morte celular por diversos estímulos [140], e que existe uma forte correlação entre os níveis de XIAP e

a sobrevivência dos pacientes, para a maioria dos cânceres que apresentam alterações nos níveis de expressão desta proteína [141-142].

Em Gliomas, assim como em diversos tipos de cânceres, a amplificação gênica ou superexpressão de integrantes da família das IAP tem sido encontrada em alta frequência [129, 143-144]. Por isso, XIAP tornou-se um alvo terapêutico bastante interessante na busca de um tratamento eficaz para superar a progressão tumoral e contornar a resistência a drogas para diversos tipos de cânceres, dentre eles os GBM [129, 145].

## **1.3 A PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL p53**

### **1.3.1 Características Gerais**

“Guardiã do Genoma” [146], “Um Acrobata na Tumorigênese” [147], “Policia Bom e Mal” [148], “A Estrela da Morte” [149], são apenas algumas das determinações atribuídas à proteína p53 nos últimos anos. Não se imaginava que existisse uma proteína com propriedades tão importantes para diversos mecanismos celulares até 1979 quando, através de estudos envolvendo abordagens virológicas [150-151] e sorológicas [152], a proteína p53 foi descoberta. Porém, foi apenas 10 anos depois, quando as primeiras alterações na estrutura do seu gene foram encontradas em cânceres humanos, que a p53 se tornou realmente popular no meio científico, sendo então denominada como “A Molécula do Ano”, título atribuído pela revista *Science* em 1993 [153]. Esta nomenclatura se justifica simplesmente pelo fato de que p53 é um dos genes mais frequentemente mutados em cânceres humanos e estudos mostram que mais da metade dos cânceres humanos possuem p53 inativada (por alterações na composição gênica ou perdas alélicas do gene inteiro) [154] e, a partir disso, esta se tornou um extensivo

alvo de pesquisas, tanto para diagnóstico, quanto para tratamento do câncer.

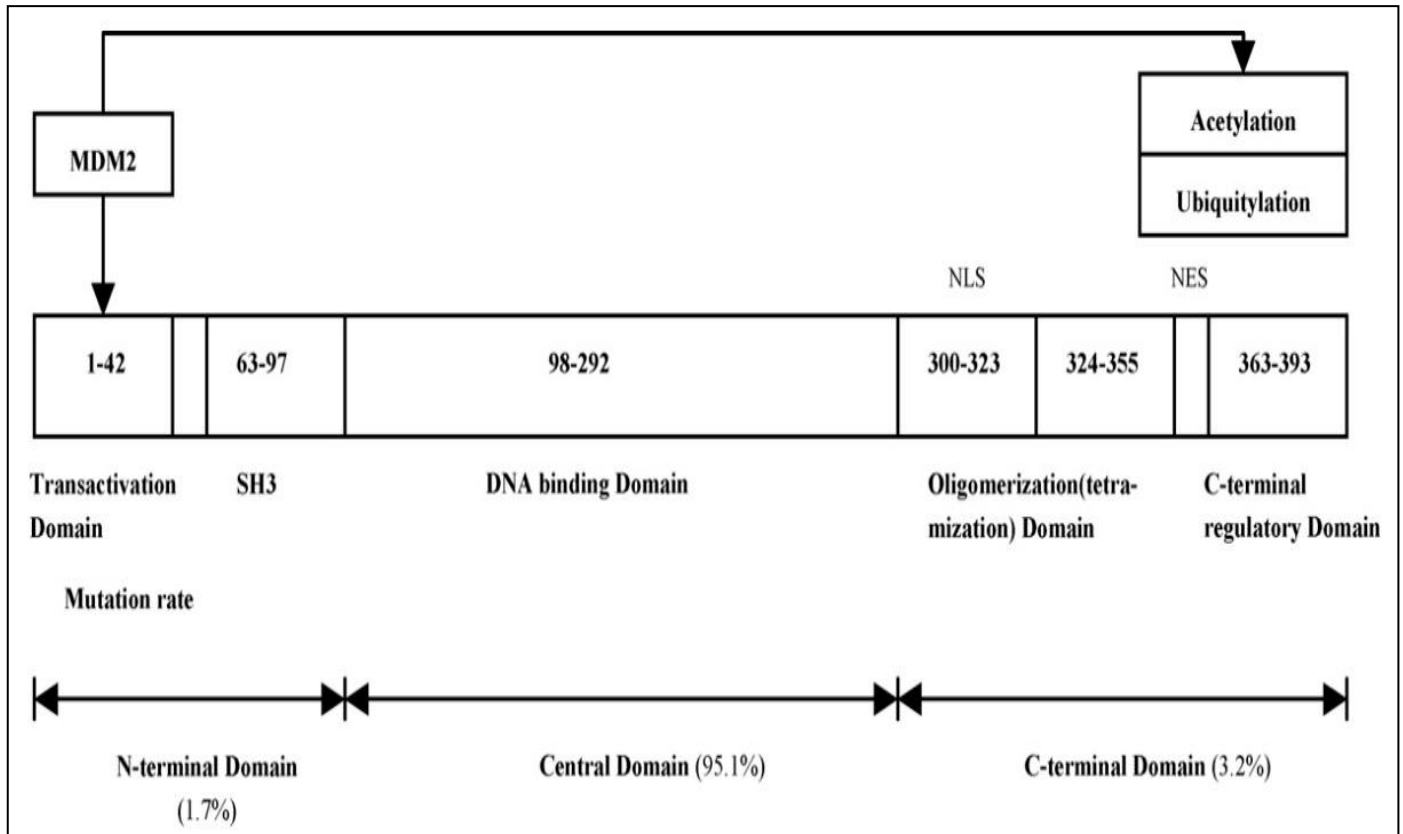
### 1.3.2 Estrutura da p53

O gene da p53 encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17, em humanos, codificando uma proteína de 53 kDa, composta por 393 aminoácidos. A estrutura cristalográfica do complexo protéico na sua forma final completa tem sido difícil de definir, devido ao seu tamanho final de 212 kDa, quando se encontra na forma tetramérica. Porém, análises cristalográficas dos seus domínios funcionais, separadamente, têm aumentado satisfatoriamente os conhecimentos sobre suas funções, quando relacionadas com sua estrutura [155-157].

A estrutura da proteína p53 é normalmente dividida em três regiões funcionais, que possuem domínios com estruturas e funções específicas: a região N-terminal, localizada entre os resíduos 1-93 de aminoácidos; a região central, localizada entre os resíduos 94-292; e região C-terminal, que se encontra localizada entre os resíduos 300-393, como mostra a **figura 4**.

Na região N-terminal (resíduos 1-93), localiza-se o domínio de transativação (TAD – *TransActivation Domain*) de p53 (resíduos 1-63) que é responsável pelo controle dos níveis desta proteína no interior da célula, através da interação com proteínas regulatórias negativas, como MDM-2 e MDM-X. Estas se ligam através dos resíduos 19-26 da p53 e desencadeiam um processo de transferência de moléculas de ubiquitina para sítios específicos da região C-terminal da p53 e, o acúmulo destas moléculas de ubiquitina, constitui um sinal que resulta na degradação desta proteína via proteossoma [158-160]. Outra proteína regulatória que interage com p53 através do domínio de transativação é a p300/CBP, que é responsável pelo processo de acetilação de p53 e consequente ativação desta, em resposta a estresse celular [161-163]. Além destas interações, este domínio ainda é responsável por interações com diversos fatores de transcrição,

acetiltransferases e outras proteínas, que resultam na transativação destes por intermédio de p53.



**Figura 4: Estrutura do gene da p53 humana.** A figura mostra, na parte superior, os sítios das modificações pós-traducionais referentes à estrutura da proteína. No centro, estão detalhadas as regiões do gene correspondendo a cada domínio da proteína p53. Na linha abaixo, está representada as três regiões, nas quais normalmente é subdividido o gene da p53. NES corresponde ao sinal de exportação nuclear e NLS significa domínio de localização nuclear. Retirado de: *Shu, K.X., B. Li, and L.X. Wu, The p53 network: p53 and its downstream genes. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007* [106].

O domínio de transativação (TAD) é seguido por uma região rica em resíduos de prolina chamada domínio SH3 (resíduos 60-90), o qual se acredita que desempenha um papel regulatório em p53 [164-165]. Sabe-se que este domínio é essencial para a interação com a proteína SIN3, a qual protege p53 da degradação [106] e também se acredita que esteja envolvido na regulação da apoptose mediada por p53 [164, 166-168].

A região central da estrutura da p53, também chamada de domínio central (resíduos 94-292), é constituída basicamente pelo Domínio de Ligação ao DNA (98-242) que é a região responsável pela interação da

proteína com o DNA, para que esta desempenhe uma das suas principais funções, que é atuar como um fator de transcrição [169]. Além disso, essa região contém uma atividade ligadora de Zinco, essencial para a sua montagem em estruturas terciária e quaternária [170]. A importância desta região para a proteína se dá pelo fato de a grande maioria das alterações gênicas presentes em células tumorais acontecem no domínio de ligação ao DNA [106, 171], impossibilitando, assim, que p53 atue como fator de transcrição, ativando a síntese de proteínas em resposta a algum tipo de estresse citotóxico ou genotóxico que estimule a ação desta proteína, como mostra os dados apresentados na **figura 4**.

A região C-terminal (resíduos 300-393) contém o domínio de oligomerização ou tetramerização (resíduos 325-355, em humanos) [157], responsável pela interação com outras unidades protéicas para a formação da estrutura quaternária que é completada com a união de quatro unidades de p53. Acredita-se que a formação do homotetrâmero de p53 seja constituída pela união de dois complexos homodiméricos, cotraducionalmente, pré-formados [172]. Nesta região, localiza-se ainda o domínio regulatório C-terminal que contém os sítios de ubiquitinação e acetilação, os quais são responsáveis por regular a atividade de degradação da proteína e de ligação ao DNA, respectivamente [173]; o domínio rico em leucina (resíduos 340-350), o qual corresponde a um sinal de exportação nuclear (NES – Nuclear Export Signal) [174], para que p53 tenha um fluxo livre do núcleo para o citoplasma, onde desempenha funções específicas, e que pode requerer um sinal de ubiquitinação para seu correto funcionamento [175]; e o domínio de localização nuclear (NLS – Nuclear Localization Signal), que se encontra entre o domínio central e o domínio de tetramerização (resíduos 302-322), para que p53 possa ser endereçada ao núcleo, onde desempenha sua principal função, atuando como fator de transcrição [176].

O gene da p53 é um dos muitos genes que mais sofrem mutações na sua sequência e acabam gerando efeitos expressivos na tumorigênese e na progressão tumoral. A maioria das mutações associadas ao câncer está localizada na região que contém o domínio de ligação ao DNA (97%) [106,

177], onde seis sítios de mutação destacam-se como sendo os mais frequentemente associados a cânceres humanos (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 e Arg 282).

O último levantamento realizado em 2010, usando informações do banco de dados de mutações em p53 do IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (<http://www-p53.iarc.fr>) mostrou que mais de 27.000 dados de mutações somáticas no gene da p53 já foram catalogados e que a frequência de mutações de p53 em tumores cerebrais alcançou a quarta colocação no ranking do maior número de linhagens tumorais com alterações gênicas em p53, com cerca de 8% das linhagens tumorais em geral. Estas alterações, predominantemente, são relatadas como mutações pontuais, que geralmente levam a uma substituição de um nucleotídeo, gerando, em alguns casos, a tradução de um aminoácido diferente [178]. Este tipo de mutação não somente anula as funções supressoras tumorais da p53, como, ocasionalmente, também pode resultar em um ganho de função, por alterar o repertório de genes que são controlados por este fator de transcrição, podendo atuar até mesmo como um fator promotor de câncer [171, 179-180]. O primeiro trabalho que apontou este perfil de ganho de função de p53 mostrou que a transfecção de uma p53 mutada em células que não apresentavam a expressão de p53, aumentava a formação de tumores em camundongos [181]. Outros trabalhos subsequentes confirmaram estas descobertas [182].

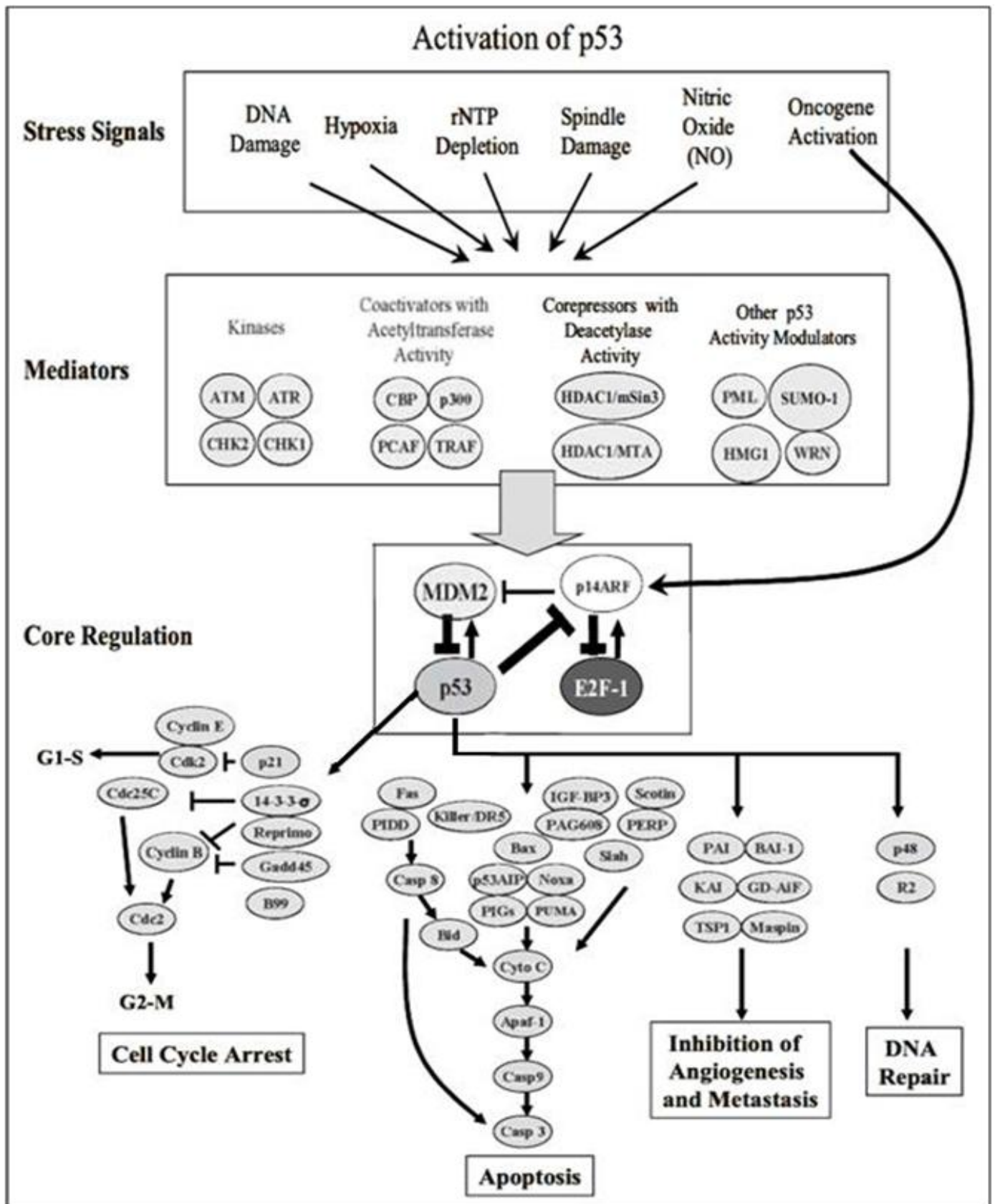
### **1.3.3 A Via da p53 e Suas Funções**

A via da p53 é composta por uma rede de genes que evoluíram para responder a uma variedade de sinais de estresse, tanto extrínsecos, quanto intrínsecos, que acabam gerando um quadro de instabilidade em mecanismos como replicação do DNA, segregação cromossômica e divisão celular [183-185]. A p53 é uma proteína que possui um tempo de meia-vida bastante curto e, em situações de homeostase celular, ela é mantida em baixos níveis protéicos por uma razão constante de degradação e síntese. Quando a célula enfrenta um quadro de estresse, como por exemplo, dano

ao DNA, os mecanismos de ubiquitinação e consequente degradação de p53 são suprimidos, ocorrendo uma estabilização e acúmulo de p53 no núcleo, onde ocorre o evento de oligomerização. Apenas na sua forma tetramérica é que a proteína p53 parece desempenhar um papel ou de fator de transcrição (ativando a transcrição de genes responsivos a p53) ou um papel repressor de genes “*downstream*” que contém sítios de ligação à p53 DNA-específico na sua região reguladora, chamados elementos responsivos (RE – *Responsive Element*) [186-187]. Outras atividades de p53, independentes da sua função de ligação ao DNA, regulando a transcrição, têm sido bem descritas, incluindo a habilidade de p53 conseguir realocar receptores de morte celular do Golgi para a superfície celular [188] e seu papel direto na mitocôndria, onde interage especificamente com membros da família da Bcl-2, como a Bax [168].

A expressão coordenada dos genes responsivos a p53 é altamente dependente do tipo celular, do microambiente e do estímulo ativador de p53, causando assim uma reação personalizada em resposta a um estresse celular específico. Como resultado disso, p53 torna-se responsável por regular diversos mecanismos celulares, sendo os mais estudados e bem caracterizados: a proliferação, senescência, parada no ciclo celular, o reparo ao dano no DNA e apoptose [82, 189-190] (**FIGURA 5**).

Portanto, ao tornar-se ativa, p53 inicia um programa transcricional que reflete, não somente a natureza do sinal de estresse, mas também as modificações pós-traducionais sofridas por ela e o grupo de proteínas conjugadas a ela, induzindo a expressão de um grupo de genes específicos para desempenhar uma função responsiva ao desequilíbrio, na tentativa de restabelecer a homeostase celular.



**FIGURA 5:** Via de sinalização de p53 em resposta a sinais de estresses celulares. Esta é uma representação da ativação de p53 por diversos mecanismos distintos de estresse celular e sua determinada resposta, de acordo com o estímulo, mostrando a complexidade das funções desempenhadas por p53 na regulação da homeostase celular. Retirado e adaptado de: *Hainaut, P. and K. Wiman, 25 Years of p53 Research. (2005) [170].*



### 1.3.3.1 Auto-regulação dos Níveis Celulares de p53

A regulação da expressão de p53 por fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B [191] ou HOXA5 [192] ou outros mecanismos que controlam a sua tradução [193], provavelmente contribuem para a atividade global de p53. Entretanto, os principais mecanismos que gerenciam a atividade de p53 parecem ser exercidos em nível de proteína, incluindo regulação da estabilidade da proteína, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e localização sub-celular [190].

Um dos componentes-chave na regulação de p53 é a MDM-2, uma proteína que funciona como uma E3 ubiquitina ligase, mediando então o processo de ubiquitinação de p53 [91], que é seguido pelo reconhecimento e consequente degradação pelo proteossoma [86-87]. Como descrito anteriormente, a proteína MDM-2 é um dos alvos transcripcionais de p53, criando então uma retroalimentação, onde p53 induz a expressão de um regulador negativo. Em situações de estresse genômico, ocorre um processo de auto-ubiquitinação de MDM-2, resultando na sua própria degradação. Este fato causa um aumento nos níveis de p53 celulares para que esta proteína coordene a restauração da homeostase celular [187].

O processo de ubiquitinação pode ser provocado por outras proteínas que também possuem função de E3 ligase como p300, porém esta desempenha um efeito mais intenso, provocando a transferência de oligômeros de ubiquitina para a porção C-terminal da p53, processo chamado de poliubiquitinação [194]. Ainda, estudos mostram que pih2 [195] e COP1[196], assim como MDM-2, também participam de um mecanismo de retroalimentação auto-regulatória que controla os níveis de p53.

Outras modificações pós-traducionais em p53 incluem acetilação, fosforilação, sumoilação e conjugação de p53 com NEDD8 mediada por MDM-2, e todas estas modificações afetam sua estabilidade e função. Fosforilação de p53, em determinados sítios, por cinases como DNA-PK e ATM, previnem a ubiquitinação provocada por MDM-2 e consequente degradação [159]. Além disso, viu-se que o perfil de fosforilação de p53, em

resposta a sinais de estresse, é crucial para o desencadeamento de mecanismos antitumorais como a apoptose [197]. A regulação negativa dos níveis de ubiquitina livre nas células também contribui para impedir a ubiquitinação de p53 e sua degradação [198]. Portanto, todos estes mecanismos mantêm uma forte e constante fiscalização de p53 em circunstâncias celulares normais. Entretanto, permitem uma rápida ativação desta proteína em resposta ao estresse celular. Uma falha nestes mecanismos regulatórios pode colaborar para a inativação funcional de p53, contribuindo para a progressão oncogênica.

### **1.3.3.2 Parada no Ciclo Celular**

Alterações transitórias na progressão do ciclo celular, após exposição a diferentes agentes indutores de dano ao DNA, têm sido observadas em muitos tipos celulares [199-200]. Estas alterações são caracterizadas, geralmente por paradas no andamento do ciclo celular e têm por finalidade permitir o reparo dos danos antes que a célula possa reiniciar o seu processo de síntese replicativa do DNA (parada na fase G1 do ciclo celular), ou antes de iniciar um novo processo de divisão celular (mitose) (parada na fase G2 do ciclo celular). Uma falha no reparo ao DNA e manutenção de algum dano, após um desses dois eventos, pode implicar na segregação desta lesão no DNA. Este evento pode contribuir para o acúmulo progressivo de alterações genéticas necessárias para que ocorra uma transformação neoplásica celular [6].

p21 é um dos principais genes-alvo da transativação provocada por p53, e esta proteína tem como principal função induzir a parada no ciclo celular mediada por p53 [201]. P21 é uma proteína inibidora de cinase dependente de ciclina [85] que se associa com uma classe de CDKs, em especial Cdk2 e Cdk4, que estão complexadas com ciclina E e ciclina D, respectivamente, e inibe suas atividades cinásicas no seu principal alvo que é a proteína Retinoblastoma (Rb). Com isso, a proteína Rb torna-se hipofosforilada e não se dissocia do fator de transcrição E2F, impedindo esta

de desempenhar sua função transcricional de elementos-chave para a progressão no ciclo celular, como genes envolvidos na síntese de DNA, resultando em uma parada no ciclo celular na fase G1 [202]. Enquanto pRb permanece associada a E2F, a célula está impedida de entrar na fase S e progredir no ciclo celular. Esta parada, provocada pela transativação de p21 por p53, é resultado de um dano ao DNA, reversível ou não, e seu objetivo é oferecer tempo à célula para que este dano possa ser reparado. Caso isso não seja possível, o perfil de ativação de p53 é alterado, como resultado da interação prolongada com cofatores ou associação de novos fatores responsivos a essa incapacidade de reparação dos danos no DNA, reduzindo a transativação de p21 e permitindo o restabelecimento das funções cinásicas das CDKs. Isso resulta na hiperfosforilação de pRb, liberação e ativação de E2F e consequente ativação de genes envolvidos na síntese de DNA, permitindo a progressão no ciclo celular. Concomitante ao restabelecimento da normalidade do ciclo celular, em resposta à redução nos níveis de p21, a manutenção de lesões no DNA, resultante da má ou ausência de reparação, novos sinais são gerados em resposta à proliferação de células com DNA danificado, e p53 induz a célula a entrar em um dos mecanismo de morte celular programada, a apoptose [170, 202]. Além de sua influência no ciclo celular, foi visto que p21 pode, ainda, inibir o desencadeamento do mecanismo apoptótico [203], através do bloqueio da ativação de pró-caspase-3 para caspase-3 ativa, sendo esta a maior responsável por efetuar o processo apoptótico [204]. Talvez isso seja mais um mecanismo de tentativa de evitar com que células que sofreram algum tipo de dano desencadeie este processo de morte celular programada antes mesmo de tentar reparar os erros causados.

Além disso, p53 é responsável por regular a transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular através de diversos mecanismos. Por exemplo, p53 pode bloquear a entrada da célula na fase de mitose por bloquear a atividade ou a expressão da proteína CDC-2 (*cell division control protein 2 homolog*), uma cinase dependente de ciclina, que tem papel fundamental na progressão do ciclo celular da fase G2 para a fase M ao interagir com ciclina B1 [205]. Outra maneira de p53 interferir na progressão desta fase é reprimindo a expressão do gene da Ciclina B1, que é

necessária para o avanço no ciclo celular, pois apenas ao se ligar a CDC-2 é que o complexo é capaz de desencadear os eventos iniciais da divisão celular por mitose [205].

### **1.3.3.3 Reparo ao DNA e Apoptose**

O gene supressor tumoral p53 desempenha um importante papel na manutenção da estabilidade genômica, sendo o reparo ao DNA uma das principais vias pela qual este papel é desempenhado. Além de ser uma das proteínas responsáveis pela indução na parada do ciclo celular através de p21, p53 parece estar envolvida em diversos mecanismos distintos de reparo ao DNA, incluindo Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER), Reparo por Excisão de Base (BER), Ligação de Terminações Não-Homólogas (NHEJ) e Recombinação Homóloga. Desta forma, mostra-se importante não somente por criar condições necessárias para o reparo do DNA, mas também por participar efetivamente de cada tipo de mecanismo de reparo, regulando a atividade transcricional [206] ou modulando a atividade de fatores importantes para cada sistema de reparo [207] e controlando os níveis de atuação dos sistemas de reparo [208].

Quando se torna impossível reparar os danos genéticos causados por agentes externos ou quando a célula detecta algum erro grave de sinalização celular, a atividade de p53 é reprogramada. Através de mudanças no perfil de modificações pós-traducionais e associação com cofatores, p53 induz a célula a desencadear um processo de morte programada e organizada, chamado apoptose. A indução deste processo impede a manutenção de células defeituosas que, futuramente, poderiam prejudicar o funcionamento adequado do tecido, no qual esta se encontra, e até mesmo do organismo, podendo passar por um processo de transformação celular, originando uma célula tumoral.

O papel da p53 na apoptose é uma das mais extensivas áreas de estudo e parece estar ligado principalmente à sua atividade supressora

tumoral [190, 209]. Quando a célula se encontra em uma situação como a citada acima, p53 transativa ou transreprime uma gama de genes alvo para desencadear o mecanismo de apoptose [187, 209]. A transativação provocada por p53 envolve diversos genes relacionados com a apoptose, tais como: membros da família de Bcl-2 (Bax, Puma, Noxa e Bid), os quais levam a uma despolarização da membrana da mitocôndria e liberação de Citocromo C [210-211]; APAF-1 (Apoptotic Protease Activating factor-1), o principal componente do apoptossoma [212]; e os receptores de morte celular Fas/CD95, DR4 (*Death Receptor 4*), e DR5 [213-215]. Outra forma de indução é através da repressão da transcrição de genes que inibem a apoptose como, por exemplo, a proteína Survivina [216].

Além de mecanismos envolvendo a transativação ou repressão de genes responsivos a p53, mecanismos a nível protéico também parecem estar envolvidos na apoptose mediada por p53. Um exemplo clássico é que p53 induz apoptose também através da ligação direta e antagonização das funções de proteínas anti-apoptóticas específicas, como Bcl-2 e Bcl-xL [217]. Com isso, há um desbalanço nos níveis de proteínas livres da família Bcl-2 na membrana externa da mitocôndria, favorecendo as proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, que sofrem oligomerização, gerando a formação de poros nesta membrana mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos intrínsecos da mitocôndria, que dão sequência na cascata de sinalização do processo apoptótico [218]. Todos estes dados sugerem que p53 seja um dos mais sofisticados executores do processo de apoptose, induzindo expressão e/ou ativando genes pró-apoptóticos e inibindo a expressão e/ou reprimindo genes anti-apoptóticos.

Portanto, a diversidade de respostas geradas pela indução de p53 revela a complexidade em determinar qual via de sinalização será ativada e, a partir daí, qual mecanismo celular será desencadeado, além de como este mecanismo será regulado, uma vez que se sabe que diversas vias distintas podem ser induzidas por esta mesma intrigante e complexa proteína, que é a p53. Também, a estimulação simultânea das vias distintas, ativadas por p53, torna a compreensão dos mecanismos desencadeados por cada estímulo, ainda mais complexa. A disponibilidade dos sítios de ligação no

promotor dos genes responsivos a p53 e o perfil de modificações pós-traducionais na proteína, principalmente fosforilação [197, 219-220], podem representar algumas das alterações cruciais para definir que tipo de caminho a p53 induzirá a célula a seguir.

#### **1.3.4 p53 e Glioblastomas (GBM)**

A inativação do gene supressor tumoral p53, seja por mutações ou por deleções, é considerada uma das alterações mais comuns em cânceres humanos e acredita-se que esta seja uma das etapas cruciais para a gênese e progressão tumoral de quase todas as neoplasias. E, de fato, aproximadamente 50% dos cânceres humanos apresentam mutações no gene da p53 [82, 171].

A ausência de p53 ou a presença da proteína na sua forma não-funcional impede com que uma célula responda corretamente a estímulos de estresse, extrínsecos ou intrínsecos. A ausência de uma correta resposta celular a estes estímulos é responsável por provocar, principalmente, danos à molécula de DNA, resultando em alterações graves em vias de sinalização que regulam os principais mecanismos de manutenção da integridade da célula, convergindo para uma desestabilização da homeostase celular. Uma resposta prejudicada ou até mesmo a inativação completa de mecanismos responsivos, consequentes da inativação da p53, resulta na manutenção do erro na célula afetada e a perpetuação deste mesmo erro para as células-filha. Com isso, a ocorrência de erros na molécula de DNA, e o inevitável acúmulo de novos danos, resultantes da inativação de p53, representam um passo importante e fundamental no caminho rumo à tumorigênese.

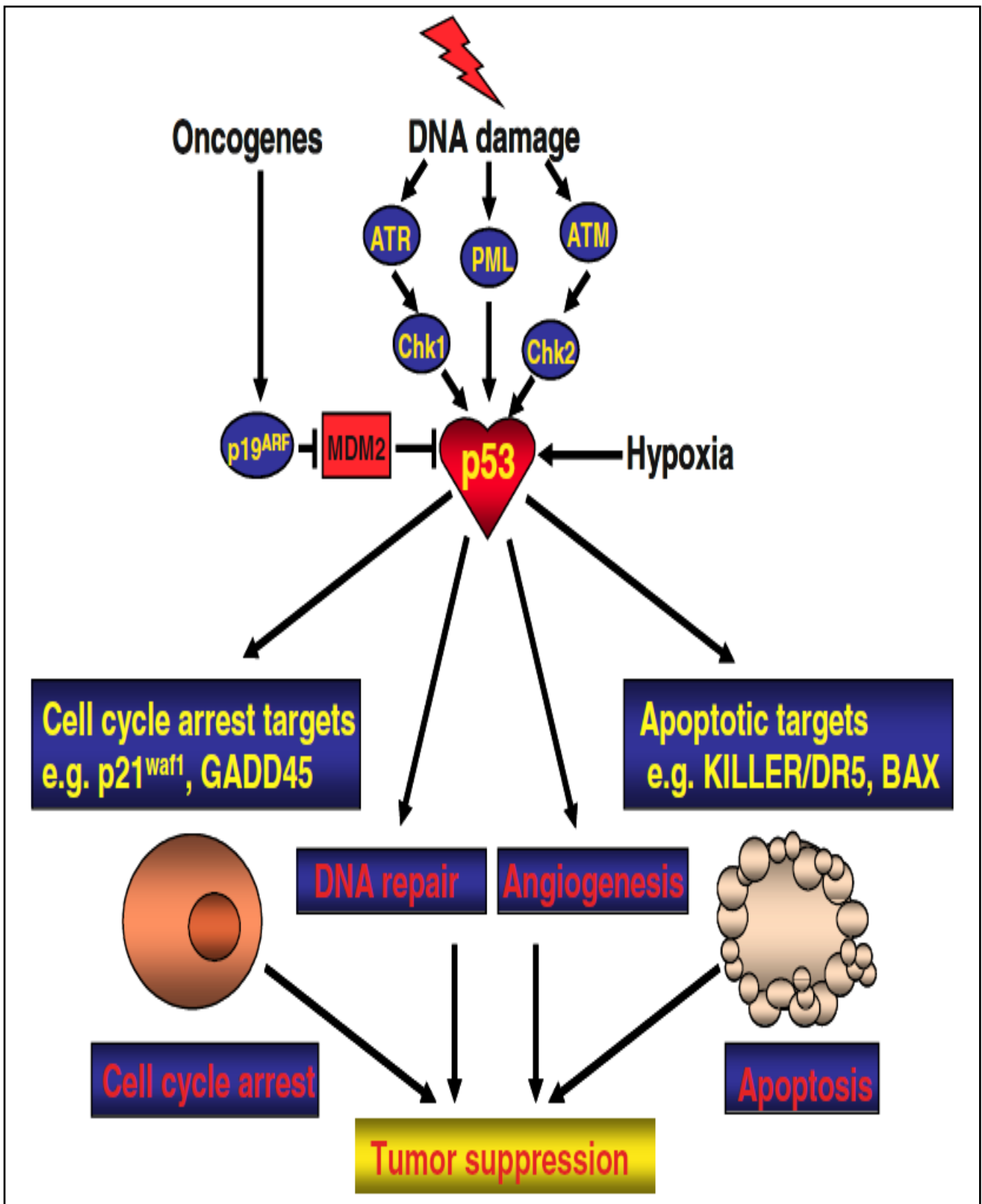
Esta proteína tem um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma e a sua inativação pode resultar no estabelecimento e manutenção de erros graves na sequência do DNA, gerando inativação, superativação ou reativação de outros genes. Como resultado, a célula apresenta um quadro de total descontrole da sua expressão gênica,

causando uma alteração no seu perfil morfofisiológico e, assim favorecendo a transformação celular.

Como mostrado na **figura 6**, p53 age como uma proteína central (propositalmente representada sob a forma de um coração) nas vias de proteção das células, regulando diversos mecanismos para evitar que alguma alteração sofrida pela célula possa perpetuar e iniciar um quadro de progressão tumoral. Por esta razão é que todas as funções ilustradas na figura convergem para um perfil de supressão tumoral, confirmando os dados de que a maioria dos cânceres é resultante da progressão de células tumorais que não possuem atividade de p53.

Entretanto, alguns estudos mostram que a inativação de p53, durante um determinado tratamento radioterápico (radiação gama), pode ser essencial para a preservação de tecidos radiosensíveis e que as funções supressoras de tumores, desempenhadas por p53, são mais relevantes no período pós-tratamento do que durante o tratamento. Isto sugere que o papel antitumoral mais importante não seria de modular a resposta ao dano no DNA, e sim aos efeitos gerados a partir desse dano como, por exemplo, falha em mecanismos essenciais e ativação de oncogenes [221].

Alterações na via da p53 são comumente encontradas em diversos tipos de tumores e são cruciais para o desenvolvimento de GBM secundários, principalmente [39, 222], além de resultar na inativação da proteína em cerca de 30% dos tumores cerebrais [223]. Mutações em p53 (95% delas na região de ligação ao DNA [106]) são uma das primeiras alterações genéticas detectáveis na maioria dos Astrocitomas (aproximadamente 50%) difusos de baixo grau, onde a frequência é similar a Astrocitomas Anaplásicos e GBM secundários derivados destes [16-18, 26-27, 33, 44, 224]. Alterações em p53 também são detectadas em GBM primários, porém em menor frequência do que nos GBM secundários (28% VS 65%, respectivamente [8, 33, 103]. Isto mostra que esta alteração genética parece estar envolvida na tumorigênese de Gliomas de baixo grau e na sua progressão tumoral, devido ao aumento na instabilidade genômica e consequente acúmulo de mutações, provocada pela perda de funcionalidade de p53 [2].



**Figura 6:** As vias de ativação de p53 e sua atividade supressora tumoral. P53 responde a diversos sinais de estresse, tornando-se ativo e aumentando seus níveis intracelulares. A escolha de qual mecanismo desencadear vai depender de qual estímulo de estresse a célula está recebendo e em que intensidade, do tipo celular e do microambiente em que esta se encontra. Como resultado da ativação de p53, temos inibição do crescimento através da parada no ciclo celular ou indução de apoptose, suprimindo, assim, a formação tumoral. Retirado de: *Hainaut, P. and K. Wiman, 25 Years of p53 Research. 2005* [170].



A LOH de p53 também é uma alteração genética comum em Astrocitomas [17, 26, 222]. Entretanto, apesar da maioria dos GBM (70%) expressarem p53 na sua forma selvagem e ativa, estes também podem apresentar algum mecanismo alternativo de alterações genéticas que neutraliza as funções antitumorais de p53 [149], como por exemplo, a amplificação (8-10%) ou superexpressão (50%) da proteína MDM-2, ocorrendo principalmente em tumores com p53 íntegra [103, 225]. Ainda, amplificação de MDM-2 ocorre em 13-43% dos Astrocitomas Anaplásicos [225-228]. Outra alteração que ocorre nessa via de sinalização é a perda da expressão de p14/ARF é observada em 76% dos GBM, sendo bastante frequente em GBM primários (50%) [72], e está tipicamente correlacionado com LOH ou metilação do promotor do gene de p14<sup>ARF</sup> [72], a qual é bastante frequente em GBM secundários e está presente em cerca de um terço dos Astrocitomas de baixo grau [72].

A presença de p53 ativa na maioria dos casos desse tipo de manifestação de glioma é intrigante e a explicação para isso permanece desconhecida. Porém sabe-se que, mesmo com a presença de p53 na sua forma selvagem e ativa, alguns mecanismos desencadeados por p53 tornam-se inativados, como é o caso da apoptose. Em contrapartida, outros mecanismos que podem ou não estar sob regulação de proteínas induzidas por p53, como parada no ciclo celular, continuam ocorrendo normalmente [219, 229]. A manutenção preferencial do mecanismo de parada no ciclo celular ao invés da apoptose pode representar uma adaptação de proteção das células tumorais contra agentes causadores de dano ao DNA, em resposta a tratamentos como radio e/ou quimioterapias.

Modificações pós-traducionais, como a fosforilação, são importantes para determinar qual mecanismo deve ser ativado por p53, em resposta a algum estímulo de estresse. Entretanto, o perfeito entendimento dos mecanismos básicos de sinalização, que fazem com que p53 induza ou um ou outro mecanismo se faz necessário, para que possamos compreender como ocorre essa modulação dos estímulos em p53 e dos efeitos induzidos por essa proteína. Apesar de incansáveis buscas por respostas, a definição

da razão pela qual p53 escolhe induzir ou parada no ciclo celular ou apoptose, permanece desconhecida.

### **1.3.5 Interação Entre a Proteína Supressora Tumoral p53 e a Proteína Anti-apoptótica XIAP**

A família das IAP representa a última alternativa de proteção celular contra o mecanismo de apoptose, pois seus integrantes são responsáveis, principalmente, por bloquear ambas as vias indutoras da morte celular programada apoptótica, tanto a via intrínseca quanto a extrínseca, através da inibição da atividade das caspases [129, 230]. Com isso, diversos estudos têm sido realizados em busca de uma caracterização do perfil de expressão de proteínas desta família e o seu possível efeito terapêutico em Gliomas. Estudos iniciais mostraram que diversos integrantes da família das IAP estão altamente expressos em Gliomas de alto grau [144, 231].

O mais importante integrante da família das IAP é a proteína XIAP, a qual representa a mais potente proteína inibidora endógena de caspase já descrita. Sua função baseia-se na ligação direta e inibição da atividade da caspase -9 (iniciadora) e das caspases -3 e -7 (efetoras) no mecanismo de apoptose [115, 232]. Assim como os outros integrantes da família das IAP, seus níveis de expressão encontram-se elevados na maioria dos tumores e, em determinados tipos de cânceres, pode estar relacionado com um péssimo prognóstico clínico [141, 233]. Diversos estudos têm mostrado que a superexpressão de XIAP confere resistência a diversos agentes quimioterápicos que provocam a ativação de caspases tanto pela via intrínseca, através de alterações mitocondriais, quanto pela via extrínseca, onde ocorre a ativação de receptores de morte celular na superfície da célula, resultando em um bloqueio de mecanismos antitumorais, como a apoptose [234-236]. Consequentemente, terapias implicadas em reduzir os níveis dessa proteína, podem reverter este perfil de resistência a quimioterápicos.

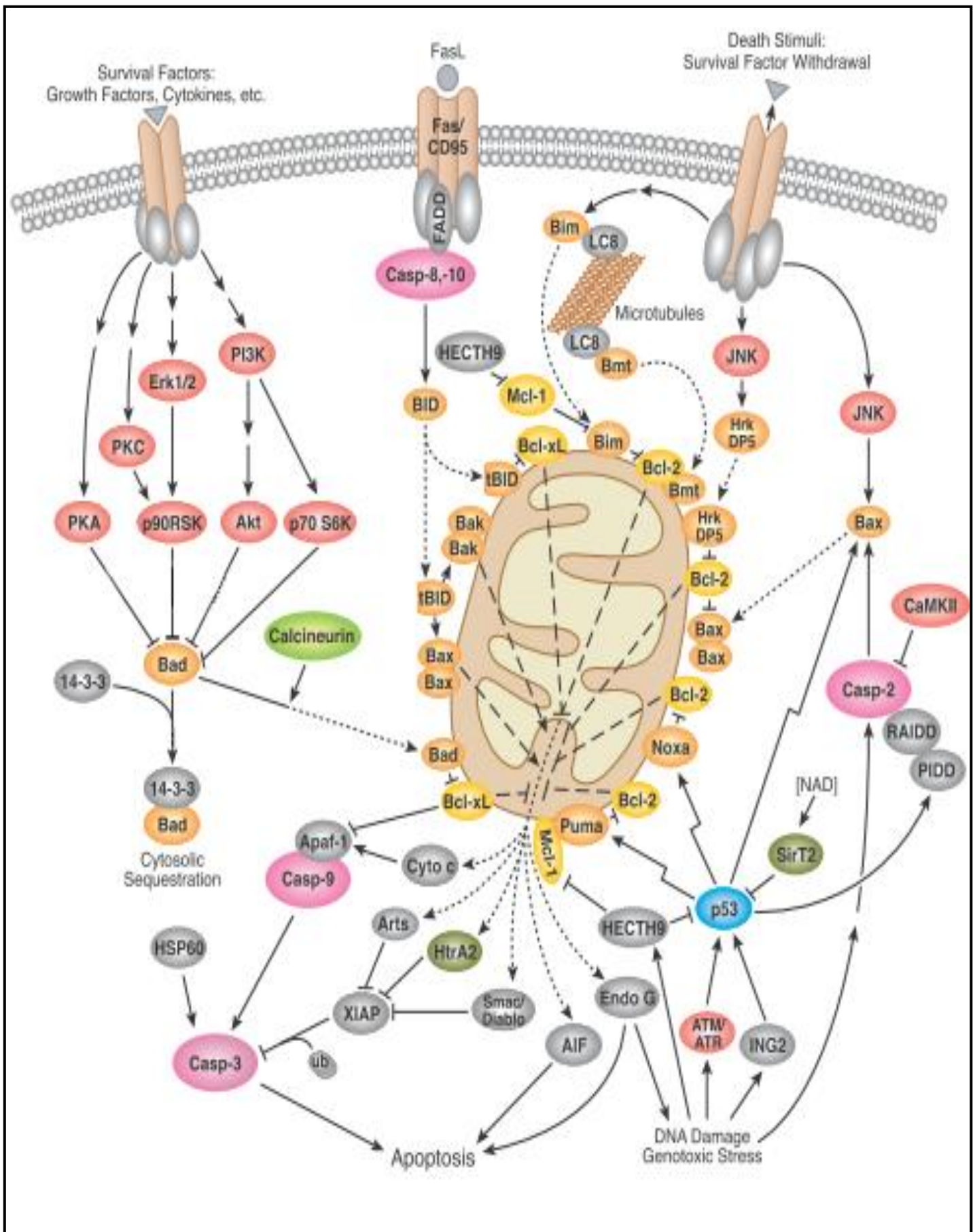
Em contrapartida, outros estudos mostram que terapias implicadas em reduzir os níveis dessa proteína, podem reverter este perfil de resistência a quimioterápicos de uma série de linhagens de células tumorais, auxiliando na eliminação de células tumorais que apresentam XIAP superexpressa [237-242]. Já em células normais, este silenciamento não provoca efeitos tóxicos [243], mostrando seu promissor efeito terapêutico no tratamento dos mais variados tipos de câncer.

Considerando o expressivo efeito terapêutico tanto do silenciamento de XIAP quanto da superexpressão de p53, podemos imaginar que uma regulação simultânea dessas duas proteínas pode vir a ser uma arma potente na batalha terapêutica contra o câncer. Entretanto, a interação entre os efeitos do silenciamento de XIAP, concomitante com a expressão de p53 não é bem compreendida. Sabe-se que as vias dessas duas proteínas se entrecruzam, uma vez que p53 age sobre as proteínas da família de Bcl-2, na superfície mitocondrial, desestabilizando sua membrana e causando a liberação de citocromo C e também de SMAC, um regulador negativo de XIAP.

A partir disto, vários estudos têm revelado detalhes importantes para o melhor entendimento dessas vias de interação. Foi mostrado que a superexpressão de XIAP induz a ativação da proteína p21, causando um bloqueio na proliferação em células endoteliais [244]. Entretanto, apoptose induzida por p53 pode ser atenuada pelo aumento nos níveis do seu alvo transcricional p21 [203], que acaba desviando a resposta para uma parada no ciclo celular, além de causar um bloqueio na ativação de pró-caspase-3 [204]. Em contrapartida, a redução dos níveis de p21 pode aumentar a indução de morte celular [245]. Ainda, este processo pode sofrer uma retroalimentação positiva, uma vez que a indução de morte celular provoca a ativação de pró-caspase-3 em caspase-3 ativada, e esta caspase-3 ativada é capaz de inativar p21 através da sua clivagem, inibindo a parada no ciclo celular, causada por p21, e intensificando a apoptose [246].

Nenhum estudo mostra um efeito de p53 sobre XIAP, ou vice-versa, até mesmo porque não há evidências de interação direta entre essas proteínas, como mostrado na **figura 5**. Entretanto, existem alguns relatos de

que a superexpressão simultânea de p53 e o silenciamento de XIAP pode maximizar os efeitos pro-apoptóticos um do outro em células tumorais. É o que mostram estudos em células de câncer de próstata e neurônios, que sugerem que o acúmulo de p53, simultaneamente à redução nos níveis de XIAP, potencializa a indução de apoptose [247-249]. Corroborando com essa idéia, *Carter et al (2009)* mostraram que o mesmo efeito foi visto em células de Leucemia Mielóide Aguda (AML) [250]. Com isso, a manipulação dos níveis de expressão dessas duas proteínas pode representar uma poderosa abordagem terapêutica, também, para Gliomas.



**Figura 7: Vias de sinalização de indução da apoptose.** Retirado e adaptado de: [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com). Acessado em dezembro de 2011.

## **1.4 TERAPIAS APLICADAS PARA O TRATAMENTO DE GBM E A TERAPIA GÊNICA COMO UMA ALTERNATIVA PARA O FUTURO**

GBM é o tipo de glioma, e um dos tipos de neoplasias, mais maligno e mortífero dentre todos os tumores humanos, sendo responsáveis por mais de 13 mil mortes, no último levantamento feito no ano de 2010, nos EUA [5]. Mesmo sob condições favoráveis, onde esses tumores podem ser removidos por ressecção cirúrgica e os pacientes são tratados com radioterapia ou agentes quimioterápicos, a taxa de sobrevivência não altera mais do que três meses, alterando o prognóstico de 12 para 15 meses após o diagnóstico, em média [251-252]. Estes dados mostram a dificuldade que é lidar com essa classe de tumores e torna-se evidente a necessidade de desenvolvermos terapias contra esta doença devastadora e, inevitavelmente, fatal.

Com base nos dados de manuais de tratamento de Gliomas, a cirurgia é a primeira opção de intervenção no paciente diagnosticado com este tipo de tumor e é realizada, justamente para confirmar o diagnóstico de GBM e para aliviar os sintomas gerados pela expansão da massa tumoral na caixa craniana. Entretanto, a opção de intervenção cirúrgica depende muito da região cerebral onde o tumor está alocado e se geração de um caminho de acesso à massa tumoral não causará efeitos drásticos no paciente, em decorrência da lesão causada no tecido nervoso sadio, durante a cirurgia. Estudos apontam que a extensão da ressecção cirúrgica está altamente ligada a taxa de sobrevivência de pacientes com GBM, onde uma ressecção de 98% ou mais da massa tumoral, conferia um aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes, quando comparado a pacientes com ressecções de uma menor massa tumoral e, portanto, menos agressiva [253]. Isso mostra que, mesmo correndo o risco de regiões de tecido cerebral sadio serem afetadas pela ressecção, este dano é compensado com um significativo aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes. Com base nessa relação, novos avanços nas técnicas cirúrgicas estão sendo realizados para maximizar a

ressecção da massa tumoral, mas sem comprometer a saúde dos pacientes [254].

Juntamente com a cirurgia, outras metodologias são utilizadas para maximizar os efeitos da ressecção cirúrgica do tumor. Uma delas é a utilização de fármacos com propriedades quimioterápicas, que, de acordo com a natureza de ação de cada um, afetam mecanismos celulares essenciais, causando efeitos anti-proliferativos ou até mesmo efeitos tóxicos para as células. O quimioterápico mais usado e um dos únicos que apresenta resultados satisfatórios no tratamento de GBM é a Temozolomida (TMZ, Temodal® - Bayer Schering Pharma) [39, 255].

Desenvolvida na década de 80, a TMZ é um agente alquilante, de administração oral, que tem seu efeito citotóxico baseado na transferência de grupamentos alquil (basicamente Metil) para resíduos do nucleotídeo Guanina (mais especificamente na posição O<sup>6</sup> da Guanina) na molécula do DNA, gerando O<sup>6</sup>-metil-Guanina. Este nucleotídeo metilado parece erroneamente com o nucleotídeo Timina, sinalizando erros de mau pareamento para os mecanismos de reparo do DNA na célula. As frustrantes tentativas de reparo destes maus pareamentos resultam em quebras duplas no DNA e os diversos sítios apresentando estas lesões no DNA sinalizam para a morte celular por apoptose, causando a eliminação das células afetadas [256-258]. Entretanto, apesar da TMZ apresentar os resultados mais satisfatórios dentre os quimioterápicos aplicados no tratamento de GBM, o aumento na sobrevivência de pacientes ainda é curto, o número de efeitos colaterais é bastante grande, visto que a TMZ não é seletiva para células tumorais, provocando seus efeitos citotóxicos em todas as células que estão em constante proliferação e, além disso, seus efeitos antitumorais ainda podem ser anulados, em alguns casos de GBM que apresentam níveis elevados de uma enzima que reverte o seu efeito gerado do DNA, chamada MGMT, provocando um quadro de resistência ao quimioterápico [39].

A Metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) é uma importante enzima de reparo que contribui para a resistência ao tratamento com TMZ, ao remover grupamentos metil dos resíduos de nucleotídeos da molécula de

DNA, revertendo o mau pareamento de O<sup>6</sup>-metil-Guanina com um resíduo de Timina. Estudos mostram que o perfil de expressão desta enzima é determinante para a eficácia do tratamento de GBM com TMZ [259] e que o uso concomitante de moléculas anti-MGMT e TMZ pode reverter este quadro de resistência e aumentar a eficiência do quimioterápico [260]. Por esta razão que a cirurgia é a primeira opção de escolha para iniciar o tratamento de GBM, uma vez que esta intervenção não somente é utilizada para alívio de sintomas, como aumento da pressão intracraniana, mas também para a coleta de uma biópsia do tumor e, é claro, a posterior ressecção da massa tumoral. Esta biópsia é de grande importância para dar continuidade no tratamento, pois é através dela que o diagnóstico de que tipo de tumor está presente no cérebro é confirmado e que os níveis de expressão de alvos moleculares determinantes para definir o tipo de tratamento também são analisados como, por exemplo, os níveis de MGMT [261].

Muitos estudos são feitos para o desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos para GBM, já que este tipo tumoral apresenta um quadro de agressividade muito elevado e que o único agente antitumoral que apresenta resultados significantes no tratamento de GBM é a Temozolomida e esta aumenta a sobrevida de pacientes apenas em poucos meses. Uma das estratégias alternativas surgidas nos últimos anos foi a utilização de pastilhas impregnadas de Carmustina (Gliadel®) que são colocadas na cavidade da ressecção cirúrgica [262-263]. O uso dessa metodologia, concomitante com a radioterapia apresentou um aumento na sobrevida média de pacientes com uma ressecção mais extensiva e radical, quando comparado com o tratamento apenas com radioterapia. Entretanto, um subgrupo de pacientes com GBM não apresentou diferença significativa com o tratamento combinado [264], sugerindo, mais uma vez, a extensa heterogeneidade apresentada pelos GBM e evidenciando a dificuldade que é encontrar um tratamento universal com resultados satisfatórios para este tipo de câncer.

Outra alternativa de tratamento para GBM é a radioterapia que, assim como a quimioterapia, constitui uma das intervenções terapêuticas de melhores resultados de aumento de sobrevida em pacientes com GBM. A



adição de radioterapia posterior a ressecção cirúrgica aumenta de a taxa de sobrevida de pacientes com GBM de 3-4 meses para 7-12 meses [24]. Entretanto, assim como as demais formas de tratamento, a radioterapia apresenta algumas desvantagens como, amplo espectro de ação, uma vez que a radioterapia não é direcionada apenas para as células tumorais; isso gera diversos efeitos colaterais, já que o tratamento afeta também as células saudáveis altamente proliferativas, assim como na maioria das quimioterapias; resistência tumoral ao tratamento é uma possibilidade e, no caso de sobrevivência de células resistentes ao tratamento radioterápico, um agravamento do quadro clínico do paciente pode ser gerado, uma vez que o tratamento acaba selecionando as células mais agressivas e resistentes, provocando um efeito de recorrência tumoral; entre outro efeito.

Portanto, como descrito anteriormente, a ressecção cirúrgica, apesar de ser a primeira opção de escolha para o tratamento de GBM, tornou-se uma alternativa que não apresenta dados de melhora muito satisfatórios, quando usados isoladamente, já que GBM são altamente invasivos e infiltrativos, e a taxa de recidiva é extremamente alta. Além disso, mesmo com os avanços dos últimos anos em quimio e radioterapias contra diversos tipos tumorais, pouco se tem descoberto com relação aos tratamentos de GBM. Enquanto com o desenvolvimento de novas metodologias de tratamento, obteve-se um aumento na sobrevida média de pacientes com outros tipos de Gliomas, para pacientes com GBM a sobrevida pós-diagnóstico permanece baixa e tem se alterado muito pouco [265]. Até mesmo o desenvolvimento da TMZ, considerado um dos maiores avanços clínicos na terapia contra Gliomas das últimas três décadas, sendo o principal quimioterápico utilizado hoje em dia contra este tipo de tumor [265-266], não resultou em uma melhora significativa superior a seis meses, do prognóstico de sobrevida dos pacientes.

Frente a estas barreiras encontradas na terapia contra Gliomas e aos avanços nas técnicas de manipulação gênica e biologia molecular, a busca por novas abordagens terapêuticas para o tratamento dos mais variados tipos de cânceres, principalmente dos GBM, fez surgir o desenvolvimento de

estratégias baseadas na terapia gênica, que se tornou uma das principais esperanças contra a malignidade desses tumores [267-269].

Varias linhas de pesquisas, atualmente, focalizam seus esforços no desenvolvimento de estratégias de transferência gênica para modular o perfil de expressão de proteínas importantes para transformação, manutenção, agressividade e invasividade de células tumorais [270-273]. O principal e mais estudado método para a transferência gênica é a transdução viral, porém diversos são os entraves para que este método torne-se totalmente seguro e eficaz [274-275]. Dentre eles, podemos citar a indistinção entre células tumorais e células normais no momento da infecção viral, a falta de garantia de que todas as células tumorais serão infectadas com o vírus, a possibilidade de recombinação entre o vírus recombinante e algum outro tipo de vírus presente no paciente, entre outros. Hoje, já existem pesquisas de algumas estratégias alternativas para contornar esses entraves metodológicos, porém ainda é muito complicada a sua utilização em alguns tipos de tumores.

Outra abordagem da terapia gênica, muito mais complexa e desafiadora, consiste na decisão de qual alvo intracelular será manipulado para alterar mecanismos essenciais na manutenção das células tumorais. Este desafio torna-se extremamente mais complicado de se resolver, visto que não se tem um conhecimento sólido e completo a respeito de todos os mecanismos responsáveis pela homeostase celular, da interação entre as vias de sinalização e, muito menos, de quais os mecanismos que são afetados na transformação celular. Com isso, se torna difícil o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes para o tratamento do câncer. Entretanto, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com base em informações que já são conhecidas e, para alguns tipos de câncer, os resultados são promissores. Já no caso dos Gliomas, algumas estratégias até parecem ser empolgantes em nível de pesquisa *in vitro*, porém não apresentam os mesmos resultados *in vivo*.

### **1.4.1 Terapia Gênica em Gliomas modulando p53 e XIAP**

Uma grande porcentagem dos GBM possui uma perda de função do gene supressor tumoral p53, devido às mutações pontuais ou deleções no seu gene [29, 171]. Como p53 é responsável por controlar diversos mecanismos, dentre eles a parada no ciclo celular e ativação de morte programada, ou apoptose, esta proteína tornou-se um dos alvos para a terapia gênica de uma série de tumores, incluindo os GBM, onde a restauração dos níveis de p53 funcionais nas células tumorais parece apresentar um importante potencial terapêutico [276]. A maioria das estratégias clínicas testadas, hoje em dia, tem sido através da transferência gênica de p53 utilizando um vetor adenoviral [29, 276-277]. Esta estratégia clínica tem sido aplicada em diversos ensaios clínicos [278], incluindo ensaios de fase I em pacientes com Gliomas Malignos recorrentes [279].

Embora a terapia gênica tenha sido desenvolvida como estratégia terapêutica, ela também forneceu conhecimentos sobre as funções de p53 dentro dos tumores [219-220]. A partir da análise dos resultados destes ensaios clínicos, foi possível constatar que a resposta ao tratamento com p53 era variada e dependia do perfil de p53 que estes GBM apresentavam [280-281]. Gliomas que apresentavam p53 na sua forma funcional sofreram uma parada reversível no ciclo celular, quando tratados com p53 adenoviral, ao passo que aqueles Gliomas que tinham p53 não-funcional (ou por deleção ou por mutações na sua estrutura) sofreram apoptose ao serem tratados com o adenovírus contendo p53 [219-220, 281-284].

Esta resposta diferencial não se restringe apenas aos Gliomas, mas também foi mostrada em outros tipos de tumores, dentre eles câncer de próstata e de pulmão [285-286]. Portanto, a eficácia terapêutica do restabelecimento dos níveis de p53 em células tumorais já é bem estabelecida, porém novas pesquisas devem ser feitas para desvendar as dúvidas quanto à distinção de respostas a este tratamento dentro de um mesmo tipo tumoral e avaliar a combinação deste tratamento com outras

alterações celulares induzidas que também mostram um potencial terapêutico satisfatório ao serem aplicadas isoladamente.

O mesmo vem ocorrendo com a pesquisa de ferramentas para regular negativamente os níveis da proteína XIAP nos mais variados tipos tumorais como uma estratégia de facilitação para desencadeamento do processo apoptótico, resultante do tratamento quimioterápico. Desde 2003, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir os níveis de XIAP nas células tumorais para avaliar uma possível potencialização dos tratamentos antitumorais clássicos [287]. A metodologia mais conhecida e que apresentou os melhores resultados até hoje foi o uso de um oligonucleotídeo antisense comercial contra o RNA de XIAP (AEG35156 – *Aegera Therapeutics Inc.*), reduzindo assim a tradução dessa proteína e minimizando os efeitos da resistência a tratamentos clássicos causado pelos altos níveis dessa proteína nas células [288]. Desde então, muitos esforços vêm sendo feitos para tentar validar e comprovar o potencial antitumoral dessa ferramenta na tentativa de aplicá-la como um tratamento adjuvante aos quimioterápicos clássicos usados na clínica [289]. Os esforços se voltam para os mais variados tipos tumorais na busca de um efeito adjuvante satisfatório para aplicação dessa ferramenta e até mesmo em Gliomas, algumas pesquisas já vêm sendo desenvolvidas [290]. Recentemente, esta molécula vem sendo usada em um Trial clínico de fase I como molécula adjuvante do quimioterápico Gemcitabine no tratamento de adenocarcinoma ductal pancreático metastático, mas os resultados não parecem ser tão animadores [291].

Todos esses dados deixam claro a dificuldade que é desenvolver uma nova estratégia terapêutica e que a heterogeneidade tumoral constitui um dos maiores obstáculos na busca de um tratamento satisfatório contra o câncer. Por esta razão que novos esforços na tentativa de esclarecer o funcionamento das mais variadas vias de sinalização celular, na busca de uma compreensão de como estas estão sendo moduladas e como interagem entre si tornam-se necessários.

## 1.5 OBJETIVOS

Com base nas informações contidas na introdução deste trabalho, onde a modulação de genes envolvidos em processos celulares fundamentais para a manutenção da malignidade tumoral emerge como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer e, tendo em vista a importância da XIAP para a modulação do processo apoptótico, assim como da proteína p53 para inúmeros mecanismos como detecção e reparo de danos ao DNA, Apoptose, senescência, controle do ciclo celular, entre outros, o objetivo geral do presente trabalho baseia-se em investigar o resultado da interação dos efeitos da superexpressão da proteína p53 e o silenciamento da proteína XIAP com o intuito de desvendar uma potencialização dos efeitos antitumorais dessas duas proteínas, resultantes da modulação gênica combinada, comparando com os efeitos das modulações isoladas, na linhagem de Glioblastoma Multiforme U87MG. Então, a partir daí, tentar desvendar os mecanismos pelos quais seus efeitos antitumorais estão sendo potencializados e que rotas de sinalização celular estão sendo moduladas. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- A) Verificar a taxa de proliferação das células modificadas geneticamente com o combinado de silenciamento de XIAP e superexpressão de p53, comparando com as manipulações de forma isoladas e com células selvagens, investigando principalmente a indução de apoptose.
- B) Averiguar demais mecanismos celulares responsáveis pela manutenção da homeostase de proliferação celular como funcionamento do ciclo celular e do processo de autofagia.
- C) Buscar alvos protéicos relevantes para os principais processos celulares que são constantemente alterados em células tumorais que mostrem alterações em resposta a manipulação combinada, comparando com as manipulações isoladas, na tentativa de achar pontos de conexão entre as duas vias que estão sendo moduladas.

## 2 TRABALHO EXPERIMENTAL / ARTIGO CIENTÍFICO

- Intenção de submissão, após maiores investigações, ao periódico

“Cancer Gene Therapy”

(<http://www.nature.com/cgt/index.html>)

- SUBMISSION LETTER –

### **Knockdown of XIAP cooperates with the overexpression of p53 in reducing cell proliferation and enhancing cell death in Gliomas**

*Andrew Oliveira Silva; Michele Hutten; Patrícia Luciana da Costa Lopez;  
Guido Lenz*

- **Manuscript approved by all authors that have participated in this work.**
- **The authors declare no conflict of interest in this work.**
- **This work will be submitted for this journal exclusively and the results presented in this manuscript are of our authorship**
- **Type of Document: Basic Research (original experiments)**
- **Work Category: Molecular Tumor Biology**

# **Knockdown of XIAP cooperates with the overexpression of p53 in reducing cell proliferation and enhancing cell death in Gliomas**

*Andrew Oliveira Silva<sup>1,2</sup>; Michele Hutten<sup>1,2</sup>; Patrícia Luciana da Costa Lopez<sup>1,2</sup>; Guido Lenz<sup>1,2,3</sup>*

*1 - Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular ([www.ufrgs.br/labsinal](http://www.ufrgs.br/labsinal)), Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

*2 - Endereço para correspondência: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biofísica, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil Telefone: ++55 51 3308 7620;*

*3 - E-mail: [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)*

## 2.1 ABSTRACT

Malignant Gliomas are considered the most frequent and aggressive primary human brain tumor with extremely poor prognosis due to high resistance to both chemo- and radiotherapy. One important factor that contributes to this resistance is the over-expression of XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), the most potent cellular inhibitor of apoptosis of the IAP family. p53 is a central regulator of several pathways including cell proliferation and apoptosis being one of the most potent tumor suppressors that is frequently mutated in human cancers. Therefore, the objective of this work is to study the effects of concomitant overexpression of p53 and downregulation of XIAP in proliferation and survival of glioma cells. When p53 was overexpressed (P+) in U87 glioma cells, in which XIAP was downregulated (Xi), the proliferation rate significantly decrease in comparison to wt, Xi or P+ cells over ten days. LDH cytotoxicity assay revealed increase of cytoplasmic membrane destabilization and western blots showed an increase of PUMA, BAX and p21 proteins on P+ cells. However the increase in the CDK inhibitor p21 induced by p53 was almost absent in Xi cells. These effects indicate an increase in pro-apoptotic and anti-proliferative stimulus in Xi/P+ cells when compared to WT or Xi cells. These effects can be explained by the hypothesis that caspase activation by XIAP inhibition eliminates anti-apoptotic p21, which is induced by p53 activation. The pro-apoptotic effects of p53 through increase of BAX and PUMA may be further increase due to the reduction in XIAP and therefore larger activation of caspases. Moreover XIAP downregulation increase autophagic features and p53 overexpression decrease autophagic cell number in both U87wt and U87Xi. Thus we concluded that the combined effect of the increase of pro-apoptotic protein and silencing of anti-apoptotic protein is more effective on reduction of tumor cell proliferation than isolated effect and suggest a trigger of apoptotic mechanism on treated cells.

**Key-words:** p53, XIAP, p21, apoptosis, autophagy, U87 and Glioma.



## 2.2 INTRODUCTION

Malignant Gliomas are the most common primary brain tumors, accounting for close to 80% of all primary central nervous system (CNS) neoplasm and have an overall incidence of 19-20 new cases per 100,000/person-year in the USA [5, 20]. Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most frequent, aggressive and lethal subtype of Gliomas and they are classified as grade IV by World Health Organization (WHO) [4, 25, 292]. GBM have morphologic and biological characteristics that classify them as the most advanced grade of Gliomas as accelerated tumor growth, diffuse cell proliferation, high infiltrative power of surrounding CNS tissue, presence of necrotic regions inside of tumor and microvascular proliferation [2, 12-13, 20, 23].

The first choice of intervention for patients bearing GBM includes surgical resection followed by radiotherapy and adjuvant chemotherapy using the alkylating agent Temozolomide (TMZ, Temodal<sup>®</sup> - *Bayer Schering Pharma*) [293-295]. However the median survival rate of patients with GBM remains low, with a prognosis of only 12-18 months from the time of diagnosis, even using multitherapeutic approaches [4, 296-297]. Accordingly many efforts have been made to understand how cellular mechanisms involved in malignant transformation, tumor progression, proliferation and resistance of GBM work and are altered, trying to develop new therapeutic approaches for treating these tumors.

Several studies have established the main mutations found in all subtypes of Gliomas, especially in GBM, which appear to be involved in the high malignancy profile of these tumors [29, 298]. Most of these mutations seem to be involved with tumor transformation and progression and occur in components of three major signaling pathways, which controls cell proliferation: Akt/PKB pathway, which is involved in blocking apoptosis, proliferation and cell migration, presents changes in its members such as overexpression of growth factor receptors or mutation that makes them active constitutively [45, 49-51] and mutations in tumor suppression protein PTEN, which negatively regulates the activation levels of this pathway [33, 52, 59];

Rb pathway, which is responsible by cell cycle control, undergoes changes such as mutations in Rb gene [22, 67-68] or methylation in its promoter region causing gene inactivation [69], and mutations in other regulatory protein of this pathway as p16<sup>INK4A</sup> [38, 70-71]; and in p53 pathway, responsible for controlling cell mechanisms as detection of DNA damage, DNA repair, cell death, among others [80-84], which have alterations such as mutations in p53 itself (molecular change that occurs in 50% of all human cancer) [103-104], MDM-2 overexpression [103, 107, 226] and loss of p14/ARF expression [72, 108-109]. Moreover recent works have shown that at least one member of these pathways of GBM is changed in 63%, 78% and 87% in RTK, Rb and p53 pathway, respectively [40, 42].

Called “Guardian of Genome” [146], p53 acts as a core of a protein network, which respond to several stress signals that cause a cellular homeostasis instability, affecting mainly the genome integrity [183-185]. In normal cells, p53 is maintained at low levels by its regulating systems, but in a stress situation, these regulating mechanisms are blocked, p53 accumulates in these cell and this protein starts a custom response according to the stress signal, which it can to trigger mechanisms to revert the stress consequences like cell cycle arrest and DNA repair mechanisms or if the stress consequences are irreversible, p53 can to activate more drastic mechanisms for cells as senescence or apoptosis, preventing the proliferation of injured cells and the maintenance of a damage in a cell population [183, 190]. P53 triggers cell mechanisms primarily acting as a transcription factor by activating or repressing a large number of its downstream genes through its DNA-binding domain [187]. The most studied p53 transcription target is p21Waf1/Cip1 [201] that has been shown not only to block cell cycle progression, but also to inhibit apoptosis [203], in part by blocking the activation of procaspase-3 [204]. Thus, p53-induced apoptosis can be attenuated by p21 and its ablation can intensify p53-induced cell death [245]. Moreover p53 can act through direct interaction with other proteins and activating them [168]. However this protein is mutated in more than 50% of all cancers [171] and about 90% of these mutations occur in central region, where DNA-binding domain is localized, inactivating the p53 function as transcription factor and abrogating the tumor suppressive functions [106,

177]. Furthermore mutations not only affect tumor suppressive functions, but also leads to the gain of oncogenic function by changing the group of genes whose expression are controlled by this transcription factor [179, 299]. Therefore p53 inactivation is one of the main changes responsible by tumor transformation and malignization in Gliomas and all of cancers [171, 179].

Alterations in other targets are also important for transformation and maintenance of the malignancy in Gliomas such as changes in apoptosis-regulating elements. An example very common in Gliomas is the overexpression of anti-apoptotic proteins of IAP (Inhibitor of Apoptosis) family, making the cells more resistant to trigger cell death mechanisms. XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) is the most thoroughly characterized member of the IAP family, contains three amino-terminal BIR domains [117, 121] and a Carboxy-terminal RING domain, which are responsible by interact with its target caspases and possess E3 ubiquitin ligase activity [122-123], respectively, and it is the most potent cellular intrinsic inhibitor of apoptosis of the IAP family. This protein is the only one able to inhibit both initiation of apoptotic process, through direct interaction with initiator caspase 9, and completion, when interact directly with effector caspases -3 and -7 [115-116, 127, 234]. Moreover XIAP was shown to induce p21 and blocking cell proliferation in endothelial cells [244]. XIAP overexpression is found in several tumors, including Gliomas, and its high expression levels are correlated with survival decrease, therapy resistance and high recurrence rates [140, 142, 144].

Many works have shown the effectiveness of monotherapies with p53 or XIAP protein, which in most cases is limited on account of pleiotropic nature of cancer and the compensatory cellular mechanism involved[279, 290, 300-301]. XIAP as well as p53 are involved in complex pathways with several components and their effects are totally dependent of integrity and correct operation of their pathway. The existence of connection points between these two pathways, such as the p21 protein, would allow that simultaneous modulation of members of these two pathways may intensify each other apoptogenic activities by minimizing anti-apoptotic and maximizing pro-apoptotic activities performed by these pathways, especially by p53 and XIAP.

Studies in Acute Myeloid Leukemia (AML) prostate cancer and adult cortical neurons have suggested that simultaneous accumulation of p53 and reduction of XIAP maximize the apoptotic effects each other [247-248, 302]. p53 is the most known apoptosis inducer by directly activate apoptotic pathway and also by transcriptionally activate a large number of genes whose products counteracts apoptosis [303]. One of them is p21 which is not only responsible for blocking cell cycle progression but also to inhibit apoptosis by preventing the activation of procaspase-3. Therefore, p53-induced apoptosis can be blunted by p21, and elimination of this protein can increase the p53-induced apoptotic effects. Moreover, p53 acts as transcription factor of Bcl-2 protein family, modulating their expressions. These proteins are responsible for regulating the intrinsic pathway of apoptosis by controlling the permeability of the outer mitochondrial membrane through of a pore formation by oligomerization of pro-apoptotic members of Bcl-2 family as Bax and Bak and release of pro-apoptotic factors like SMAC-diablo, a XIAP inhibitor, cytochrome C and AIF [304]. The anti-apoptotic members of Bcl-2 family are responsible to interact with pro-apoptotic members and prevent their oligomerization. Thereby, p53 protein can control the expression levels of bcl-2 family members and cause a disbalance between pro and anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family in order to trigger apoptosis or not [305].

According to this supposed indirect interaction of these two proteins we have hypothesized that downregulation of XIAP, by RNAi, and overexpression of p53 could represent a novel strategy of gene therapy in order to enhance the antitumor effects produced by the single therapy with only one of these interventions for Gliomas too.

Here we demonstrate that simultaneous p53 overexpression and XIAP downregulation reduce the cell proliferation on account of enhance the activation of apoptotic signaling pathway in Glioma cell line, increase the citotoxic effects each other and reduce the p21 levels, even when p53 was overexpressed. Moreover, cells with downregulated XIAP present high levels of autophagy and p53 overexpression reverts partially the induction of this

mechanism, suggesting that autophagy could be an adaptation of XIAP downregulated cells and p53 divert the signals to induce apoptosis.

## **2.3 MATERIALS AND METHODS**

### **2.3.1 Cell Culture**

Human GBM cell line U-87 MG, harboring wild type p53 (described now only as U87wt) was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland – USA). XIAP downregulated cells (called U87Xi) were produced by our Laboratory, through stable downregulation by Interference RNA using commercial interference shRNAs (*Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA*) (*Lopez at al., unpublished data*). All cell cultures were purchased from Gibco Laboratories (*Grand Island, NY, EUA*). Cells were cultured in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10mM HEPES, 40mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% penicillin/streptomycin and 0,1% amphoterecin B at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. To collect the cells of culture, they are washed with CMF (*Hank's solution Calcium-Magnesium Free*) (5.4 mM KCl, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 137 mM NaCl, 5.6 mM Glucose), pH 7.4 and incubated for 5 minutes with trypsin/EDTA 0,05%, followed by the addition of DMEM 10% for inactivate the trypsin. Fluorescence microscopy Zeiss Axiovert 200 (*Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen - Germany*). Was used to Morphological and Fluorescence assessment and imaging

### **2.3.2 Plasmid Purification and Transfection**

The Expression vectors containing p53 cDNA (pCMVp53), GFP gene (pEGFP-N1) and Microtubule-associated protein 1 light chain fused with GFP

(pEGFP-LC3), kindly provided by Dr. Brian E. Strauss, MA. José E. Vargas and Dr. Tamotsu Yoshimori, respectively. Competent *E. coli* cells were transformed by heat shock with these plasmids individually and colonies of transformed bacterial cells were selected, grown in 250 mL LB medium with ampicillin 100 ug/mL for 24h. The plasmid extraction was performed using *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)* according to manufacturer's instructions. The feature of purification was measured by NanoDrop (*Thermo Scientific, Wilmington, DE – USA*) and electrophoresed in agarose gel 1% and visualized through Sybr Green staining (*Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA*). The storage of purified plasmids samples was at -20°C. The pCMVp53 plasmid contains p53 cDNA inserted in multicloning site (MCS), which its expression is regulated by Cytomegalovirus (CMV) promoter. This plasmid also contains genes for ampicillin and neomycin resistance. After its amplification, 1% agarose gel electrophoresis was performed to confirm its integrity and purity and then, the presence of p53 cDNA was confirmed, through PCR amplification of a 293bp fragment, as expected (Data not shown).

To test if the plasmid would be working properly, the pCMVp53 plasmid was cotransfected with pEGFP-N1 in Hek293T cells, a cell line that have an excellent transfection index, and U87 Glioma cell line, wild type or XIAP downregulated (Xi) (described now only as U87wt GFP/P+ and U87Xi GFP/P+, respectively). Negative control was performed transfecting only pEGFP-N1, which it expresses green fluorescence protein (GFP) reporter gene (described now only as U87wt GFP or U87Xi GFP). Fluorescence microscopy has confirmed similar transfection efficiency in all of cell lines tested (around 30-40%) (**Supplementary Figure 1**) and western blotting analysis have shown the effectiveness of expression vector pCMVp53 in every one of lines tested (**Supplementary Figure 2**).

### 2.3.3 Cumulative Population Doubling Assay

Cells were plated in 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well. In the next day, they were transfected with pEGFP-N1 or cotransfected with both pEGFP-N1 and pCMVp53, using Lipofectamine 2000 transfection reagent (*Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA*) according the manufacturer's instructions. Two days later, the supernatant was collected and saved for LDH assay. The cells were suspended using Trypsin enzyme and a certain amount of these suspended cells was reseeding at the same well and another amount of suspended cells was designed to flow cytometry analysis in Guava EasyCyte (*Guava Technologies, Hayward, CA, USA*), using the Guava ExpressPlus software to perform the cell count.

The data generated by Flow Cytometry analysis were plotted in the formula  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , to determine the Population Doublings (PD), where  $N(t)$  means the number of cells per well at time of passage, and  $N(t_0)$  means the number of cells seeded at the previous passage [306]. The sum of PDs was then plotted against time of culture at day 2, 5, 7 and 10 after transfection. pEGFP-N1 only transfected cells were used as transfection control.

### 2.3.4 Lactate Dehydrogenase (LDH) Release Assay

The cell supernatants collected of PD assay samples were stored at 4°C for up to 48h until the moment to the LDH cytotoxicity assay. LDH kit (*Doles Co, Goiania/GO – Brazil*) was used to measure the activity of this enzyme on cell supernatant according to following instructions: add 5 ul of ferric alum, plus 25 uL of samples and 100 uL of substrate. This mix was preincubated at 37°C for 5 minutes. Next, it was added 5 uL of cofactor NAD and incubated at 37°C for 5 minutes again. After, the enzymatic reaction was stopped with addition of 100 uL of stabilizing solution and incubation for 10 minutes at room temperature. To quantify the colorimetric reaction, the

samples were read in spectrophotometer at 492 nm, discounting the blank reading. The final results were normalized accordingly to total cell number obtained of an automatic counting by flow cytometry performed in PD assay at each time point analyzed (days 2, 5, 7 and 10).

### **2.3.5 AnnexinV/Propidium Iodide Assay**

Phosphatidylserine externalization was determined by Annexin fluorescent signal of Annexin-V-FLUOS Staining Kit Assay (*Roche, Germany*), according the manufacturer's instructions. U87wt and U87Xi cells were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well), transfected and collected at the same situations in Population Doubling assay. Then they were incubated with Propidium Iodide (PI) (*Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA*) and AnnexinV for 10 minutes at room temperature, in the dark. The Analysis was performed using Guava EasyCyte Flow Cytometry (*Guava Technologies, Hayward, CA, USA*) and Guava ExpressPlus software to perform the cell count. Dead cells were identified by only PI or double PI and AnnexinV fluorescent staining, while apoptotic cells were positive only for AnnexinV. The Assay was performed 24h, 48h and 72h after transfection and the results are showed in percentages, considering the total number of cells analyzed as 100%.

### **2.3.6 Cell Cycle Analysis**

For cell cycle analysis, cells were plated at  $5 \times 10^4$  cells per well in a 24-well plate, followed by only p53 transfection in a treated group and empty transfection in control group. 48h after transfection, cells were harvested and fixed in cold ethanol 70% v/v in phosphate-buffered saline (PBS) for at least 2h. Fixed cells were washed with PBS and marked with a solution containing PI 6  $\mu$ M, Triton X-100 and RNase for 30 minutes, in the dark, at room temperature. DNA content was analyzed through Guava EasyCyte Flow Cytometry (*Guava Technologies, Hayward, CA, USA*) and Guava ExpressPlus software to perform the cell count. In this assay, Cell cycle



phases were analyzed and the amount of sub-G1 subpopulation was obtained.

### **2.3.7 Analysis of autophagosome formation by LC3-GFP protein**

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3 or only LC3) is a mammalian homologue of yeast Atg8p that translocates to the autophagosome membranes after lipidation [307]. U87wt and U87Xi cells were transfected only with the expression vector pEGFP-LC3 or cotransfected with this plasmid plus expression vector pCMVp53, using Lipofectamine LTX (*Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA*) according to the manufacturer's instructions. 48h after transfection, at least 100 green cells per well were counted using fluorescence microscope, and, among them, the percentage of cells that had at least 5 clear green dots in the cytosol was determined as autophagic cells [308-309]. Less than 5 green dots or none dots among green cells were considered Non-autophagic cells. Representative images of each treatment or control were taken using fluorescence microscopy.

### **2.3.8 Quantification of Acidic Vacuolar Organelles (AVOs) by Acridine Orange (AO) staining**

AO is a marker of AVOs that fluoresces green in the whole cell except in acidic compartments (mainly late autophagosomes), where it fluoresces red. Development of AVOs is a typical feature of autophagy, and its formation indicates the maturation of autophagosomes and an efficient autophagic process, since only mature/late autophagosome are acid [310]. U87wt and U87Xi Cells were plated at  $5 \times 10^4$  cells per well in a 24-well plate. After 48h, cells were incubated with AO (2,7  $\mu$ M) for 15 minutes at room temperature, followed by analysis in Guava EasyCyte Flow Cytometry (*Guava*

*Technologies, Hayward, CA, USA*) and Guava ExpressPlus software to perform the cell count. The quantification was performed as described previously [309] and the result are showed in percentages of positive red fluorescent, relating to a cell line deficient to autophagy as negative control.

### **2.3.9 Western blotting Analysis**

Analysis of protein expression and phosphorylation was performed as described previously with minor modifications [311]. U87wt and U87Xi cells were transfected as the same situation of PD analysis and, 24h or 48h later, they were lysed, proteins were quantified by Peterson's Method, with some modifications [312] and the same amount of proteins (40 µg) was electrophoresed by SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membrane (*Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA*), and stained with Comassie Blue to confirm the quantification. After, membrane was blocked in 5% skimmed milk/TBST for one hour and probed with the primary antibody for p53 (1:500 – Santa Cruz), PUMA (1:1000 – Cell Signaling), XIAP (1:1000 – Cell Signaling), p21(1:1000 – Cell Signaling), Bcl-xL (1:1000 – Cell Signaling), Bcl-2 (1:1000 – Cell Signaling), BAX (1:1000 – Cell Signaling), Caspase-3 (1:1000 – Cell Signaling), phospho-Cdc-2 (Tyr15) (1:1000 – Cell Signaling), Cyclin-D1 (1:1000 – Cell Signaling), phospho-Rb (Ser807/811) (1:1000 – Cell Signaling), p15/ink4b (1:1000 – Cell Signaling) and Pan-actin (1:1000 – Cell Signaling) overnight, at room temperature. Primary antibody was detected by incubating with appropriate horseradish peroxidase (HRP) conjugated-secondary antibody (1:2000 – Cell Signaling) for 2h, using ECL and X-ray films (*Kodak X-Omat, Rochester, NY, EUA*). Optical Density of the Dots was obtained using ImageJ (*National Institute of Mental Health, Maryland, USA*) Image Analysis Software and the relative quantification was performed using Pan-actin dots as loading control. Some membranes were stripped using NaOH 1M to evaluate other proteins with same molecular weights.

### **2.3.10 Statistical Analysis**

Statistical Analysis was conducted by Student's T-test, using GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). "p" value under 0,05 was considered significant. The number of experiment for each assay is indicated in figure legend. All experiments were done in duplicate.

## 2.4 RESULTS

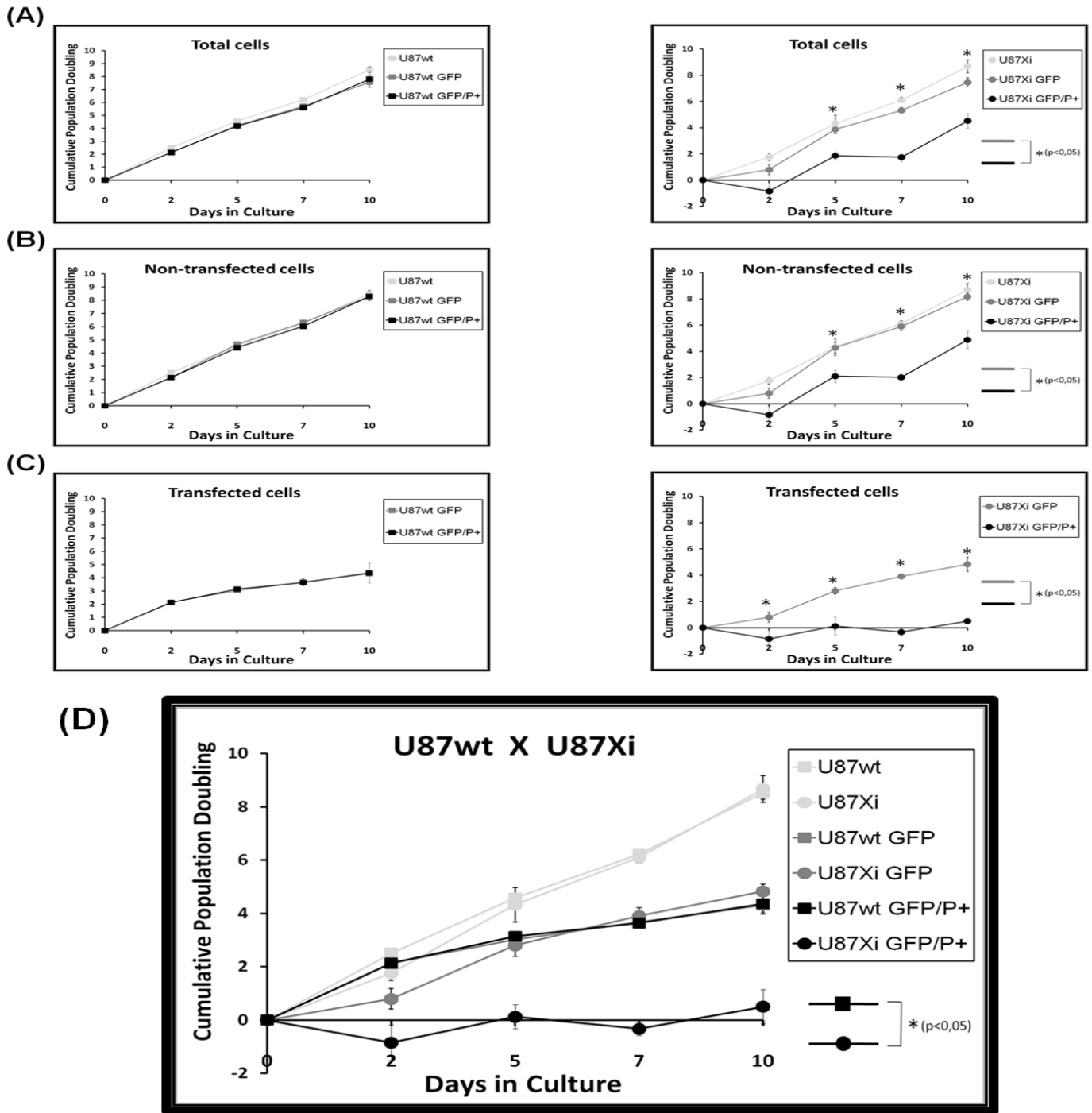
### 2.4.1 Combination of XIAP Downregulation and p53 Overexpression Reduces Cell Proliferation Rates in U87 Glioma Cell Line

To assess the effect of combining p53 overexpression and XIAP downregulation in cell proliferation profile, we perform Cumulative Population Doubling (PD) Assay in U87 wild type and U87in which XIAP was previously downregulated, called U87Xi. Cells were cotransfected with p53 expression vector and GFP-containing vector or with GFP-containing vector only as control. As demonstrated in **Figure 1**, the proliferation profile of U87wt total cells analyzed (**Figure 1A, left image**), just non-transfected cells (**Figure 1B, left image**) or efficiently transfected cell (**Figure 1C, left image**) shows p53 overexpression (P+) does not significantly affect the U87wt proliferation, comparing with GFP transfected U87wt cells or non-transfected cells, during 10 days of analysis.

However, when the proliferation profile of U87Xi was evaluated, the P+ treatment have significantly reduced the cell proliferation when total cells or just the transfected cells were analyzed (**figure 1A, right image, and 1C, right image, respectively**), comparing with GFP transfected U87Xi cells. Interestingly, the proliferation profile was also reduced in U87Xi GFP/P+ when only non-transfected cells were examined in this treatment condition, suggesting a possible paracrine effect of U87Xi/P+ cells in non-transfected U87Xi (**figure 1B, right image**). Moreover, P+ treatment was performed in Survivin Downregulated U87 (U87Si), another member of IAP family with similar functions to XIAP, and have weakly reduced the cell proliferation only in transfected analysis, comparing with only GFP transfected U87Si cells (**Supplementary Figure 3C**). Total cells and non-transfected cell analysis have not shown any changes when treated with P+ (**Supplementary Figure 3A and 3B, respectively**).

# U87wt

# U87Xi



**Figure 1: p53 overexpression combined to XIAP downregulation reduces significantly the proliferation in U87 cells.** Cumulative population Doubling (PD) graphics show lowering effects of p53 overexpression in cell proliferation of U87 Glioma cell line XIAP downregulated (U87Xi) (right images) when compared with control U87 wt (left images). Cells were transfected with pCMVp53 at day 0 and at days 2, 5, 7 and 10 after transfection, the PD was determined through flow cytometry. Gray lines, dark gray lines and black lines correspond to non-transfected cells, GFP only transfected cells and GFP plus p53 cotransfected cells, respectively. **(A)** Cumulative PD Global analysis. **(B)** Cumulative PD of cells that were not efficiently transfected in each group. **(C)** Cumulative PD of cells that were efficiently transfected in each group. The specific analysis of transfected and non-transfected were performed through GFP green fluorescence presence or not. **(D)** Comparative population Doubling (PD) graphic between p53 overexpression effects in U87wt and U87Xi. Each graphic represents the average  $\pm$  SD of five independent experiments performed in duplicate.  $p < 0,05$  were considered significant (represented by asterisk). (n=5)

When the U87wt and U87Xi, treated with GFP/P+ or only GFP, have been analyzed together (**Figure 1D**), we can see that cell proliferation rates have been significantly reduced only when p53 was overexpressed in XIAP downregulated cells, comparing with p53-overexpressing U87wt and the U87wt GFP and U87Xi GFP controls, showing that the combining treatment is more effective than isolate treatments. Moreover the combining effect of p53 overexpression and Survivin downregulation have not been the same effects, have not showing a significantly anti-proliferative response, when compared with p53-overexpressing U87wt and the U87wt GFP and U87Si GFP controls (**supplementary Figure 3D**). In addition, the absence of anti-proliferative effects causing by XIAP downregulation as well as the cytotoxic effects of transfection methodology and/or GFP expression are shown in **Figure 1D**, when treated or control cells are compared with non-treated cells. The same can be seen in **Supplementary Figure 3D**, in relation to Survivin modulation, in U87 cells.

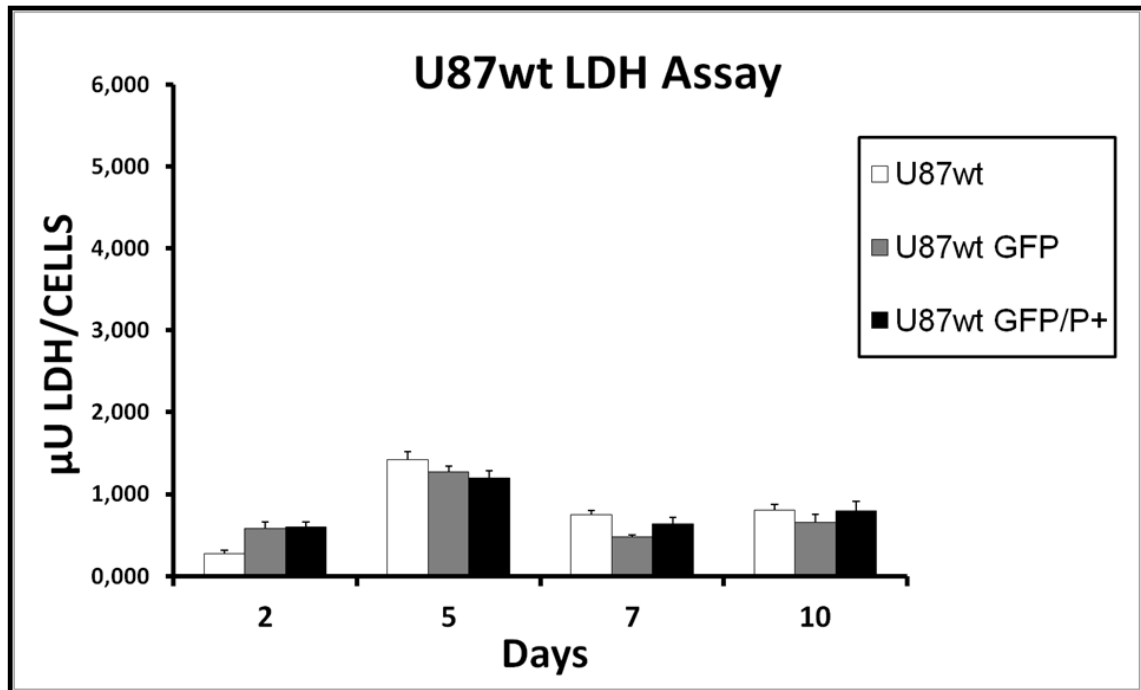
These results show that the anti-proliferative effect of p53 in U87 cells only occurs when combining with XIAP downregulation and not with Survivin, suggesting a potential antitumor effect for this combination. All other experiments were performed only with XIAP downregulation and p53 overexpression.

#### **2.4.2 p53 overexpression enhances the cytotoxicity in XIAP downregulated U87 cells**

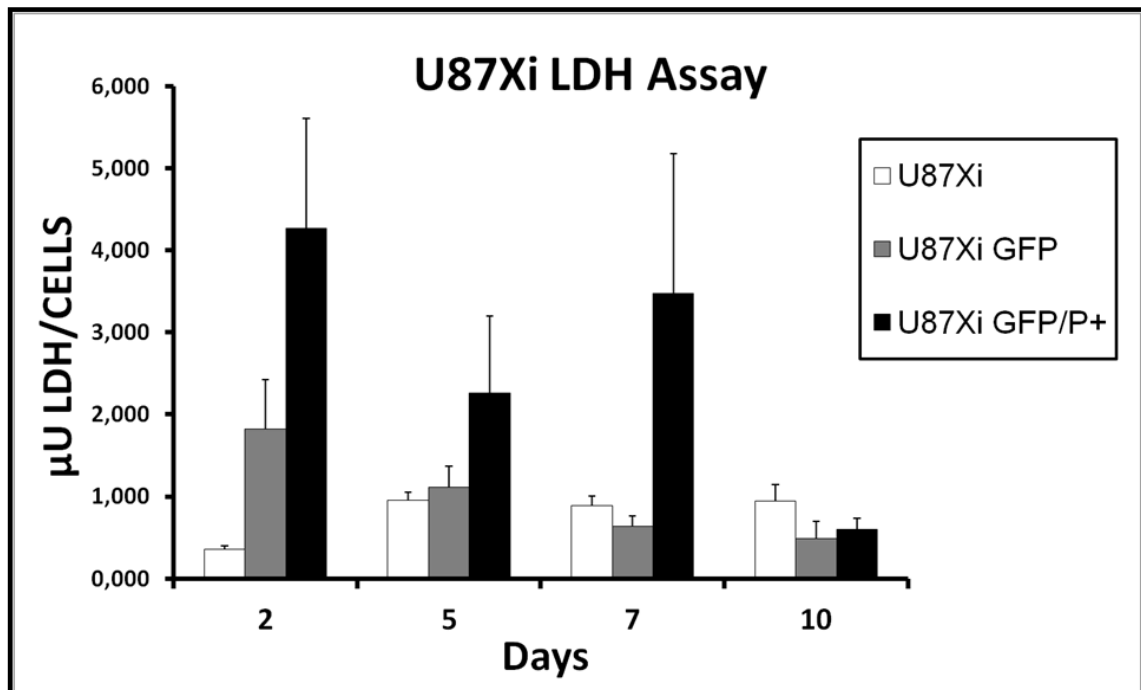
Reduction on cell number of U87Xi treated with P+ can be result of a cell proliferation arrest through effects of p53 transcriptional target p21 in cell cycle mechanism, for example, or can be result of a triggering of some cell death mechanism, through pro-apoptotic p53 targets or the own XIAP downregulation. To determine if the p53 overexpression has some effect on cell viability we performed LDH release assay during 10 days of P+ treatment using the supernatant of cultured cells. The presence of intracellular Lactate

Dehydrogenase enzyme in culture medium corresponds to an increase in cell membrane permeability and it is widely used as a marker of some type of cell death resulting in cell membrane disruption. As shown in **(figure 2A)**, there were no differences in the LDH levels in the extracellular medium of U87wt with P+ treatment along of time experiment. On the other hand, the LDH levels in extracellular medium were higher than controls during the first 7 days of experiment when p53 was overexpressed in XIAP downregulated cells (U87Xi) **(Figure 2B)**. Therefore, these results suggest that a significant part of the reduction in number of cells is due to the trigger of some kind of cell death mechanism as apoptosis and consequently secondary necrosis, due a maintenance of apoptotic cell in the cell culture.

(A)



(B)



**Figure 2: Simultaneous p53 overexpression and XIAP downregulation increase the cytotoxicity in U87 cells.** The cell supernatants were collected from cells used to PD experiment at the same days (2, 5, 7 and 10) and it was performed a measuring of Lactate Dehydrogenase (LDH) release to the extracellular medium through colorimetric assay using a LDH substrate. The results were normalized using the number of cell obtained in each counting of PD experiment. White bars represent non-transfected U87 cells, gray bars represent GFP only transfected U87 cells and black bars represent p53 plus GFP cotransfected cells. (A) LDH release profile of U87wt cells and (B) LDH release profile of U87Xi cells. The graphics are showed as average  $\pm$  SD (n=5).



### 2.4.3 p53 overexpression causes cell death by apoptosis in U87 with XIAP downregulated

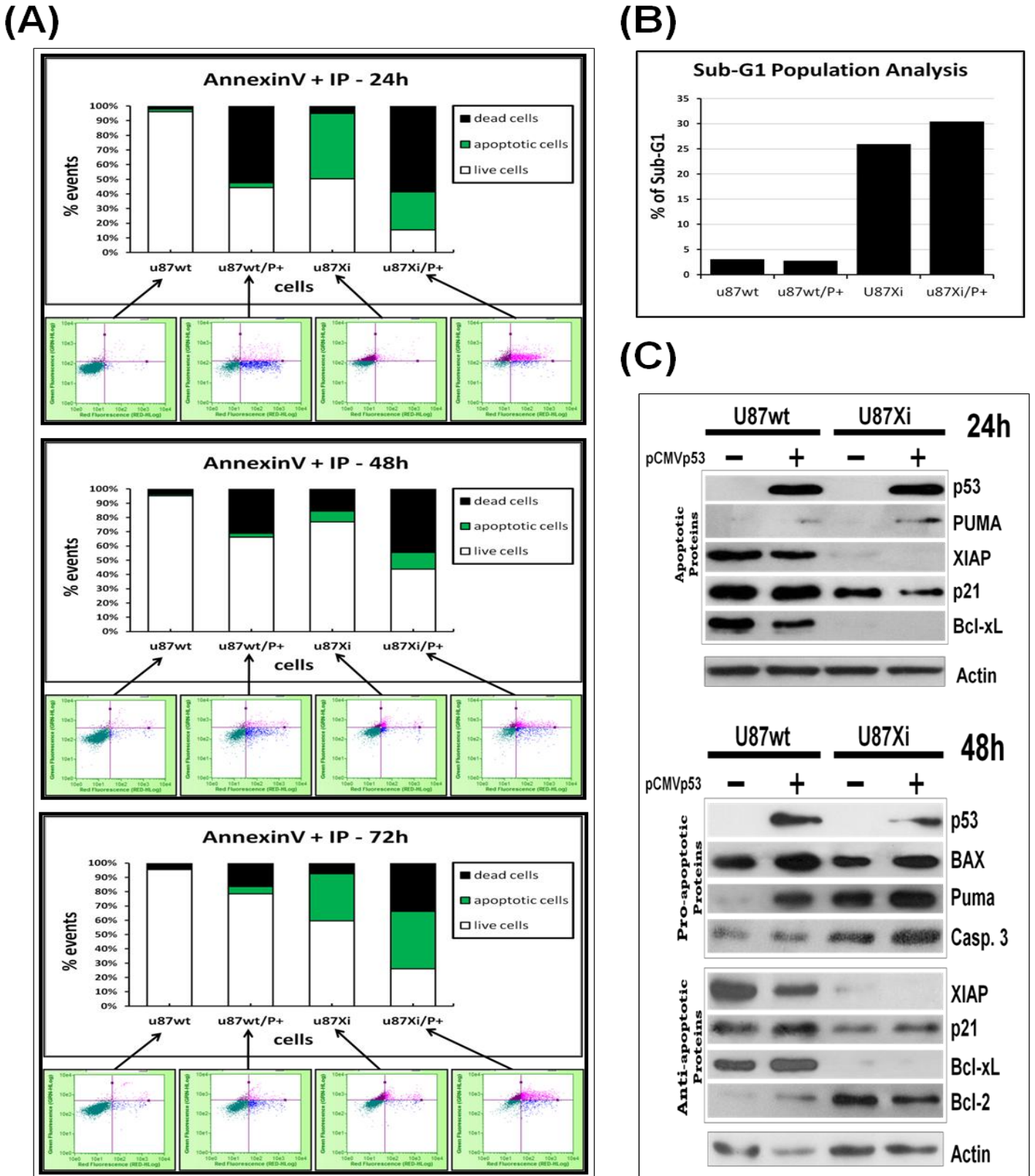
p53 activates a lot of pathways that converge to apoptosis activation. Then we overexpress p53 in U87wt and U87Xi to assess if p53 cooperates to apoptosis induction. In **Figure 3A**, the annexinV assay showed that U87wt presented some necrosis, but not apoptosis signs when p53 was overexpressed for 24h. Moreover this IP stain was reduced along 72h. Nevertheless when p53 was overexpressed in U87Xi the annexinV stain was highly enhanced comparing to other groups, strongly suggesting an increase in the apoptotic stimuli with the simultaneous interventions. Also, the apoptotic effects were maintained when the cells were analyzed in 48h and 72h.

Next we have performed a sub-G1 analysis to confirm our suspects of apoptosis as main consequence of this combined treatment and the results have showed the same relation when we compare U87wt and U87Xi, presenting a higher apoptotic feature in XIAP downregulated cells than wild type cells. Likewise, the P+ treatment increases the apoptotic effects in U87Xi, but this intervention has no effect in U87wt (**Figure 3B**).

To better understand these several mechanisms that could be triggered by simultaneous XIAP downregulation and P53 overexpression, a large analysis of protein expression profile was performed. Both 24 and 48h, the p53 overexpression and XIAP downregulation was confirmed. As expected, the expression levels of main transcriptional targets of p53 were enhanced when p53 was overexpressed in both wild type and Xi U87 cells, such as p21, Bax and PUMA comparing to untreated cells (P-). Moreover the caspase-3 levels were increased in U87Xi cells comparing to U87wt and were high increase in U87Xi overexpressing p53. Most of these results reinforce an apoptotic effect of the combining treatment (**figure 3C**).

Interestingly, the p21 levels were reduced in U87Xi cells comparing with U87wt even when p53 was overexpressed, suggesting some kind of deviation from cell cycle arrest response to apoptosis response. Besides the

Bcl-xL levels, an anti-apoptotic protein of the Bcl-2 family, were highly reduced in U87Xi. A sequence alignment of interference RNA of XIAP and Bcl-xL RNA sequence was performed and no similarity between them was found in the main regions of RNAi, suggesting that the off target shRNA action is not involved in the Bcl-xL downregulation (data not shown). However the levels of endogenous Bcl-2 were increased in U87Xi, independently of p53 overexpression. This increase may be a compensatory response due to decrease of Bcl-xL levels (**Figure 3C**).



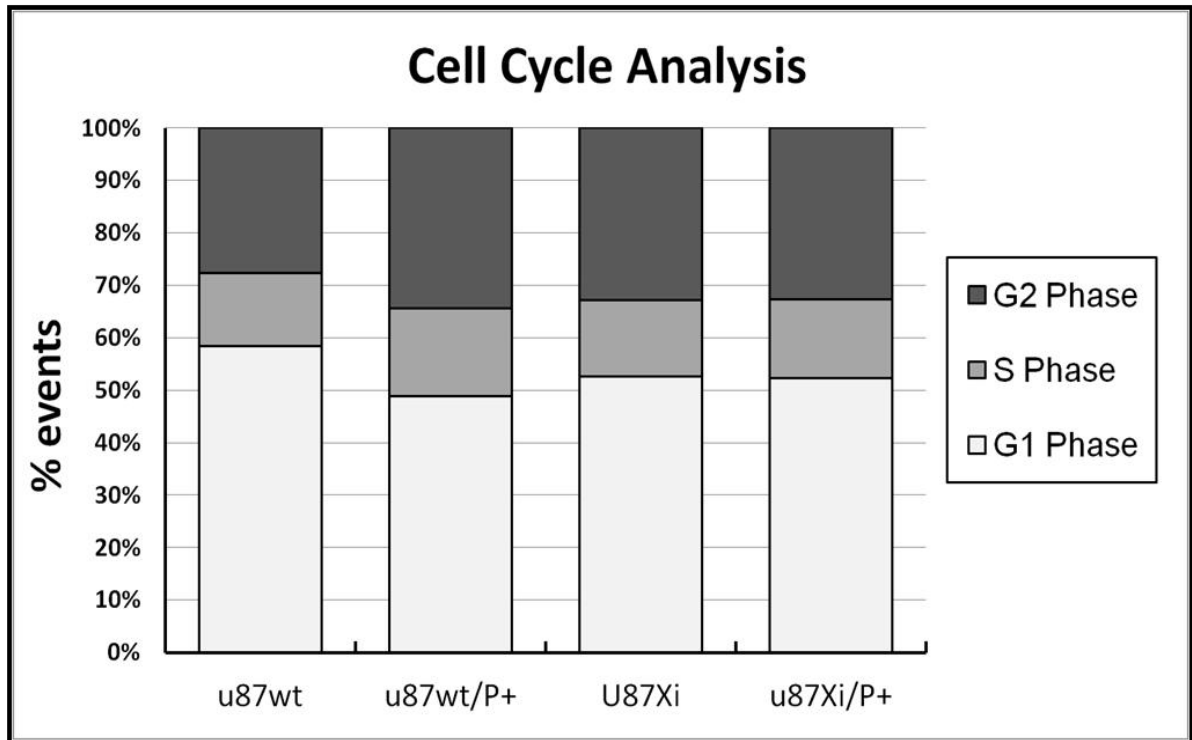
**Figure 3: Combined treatment with p53 and XIAP increases the apoptotic features. (A)** The four representative images above each graphic show the annexinV/PI stain analysis by flow cytometry and the graphics are the representation of average of two different experiments. The settings in flow cytometry were done accordingly U87 wild type results. The analysis was done in 24h, 48h and 72h after pCMVp53 transfection. The total number of analyzed cells in flow cytometry was considered 100%. (n=2) **(B)** The quantity of sub-G1 subpopulations was obtained through the global cell cycle analysis 48h after p53 transfection, including efficiently transfected cells and no efficiently transfected cells. The total number of analyzed cells in flow cytometry was considered 100%. (n=2). **(C)** Analysis of protein expression profile of apoptosis pathway members. They were analyzed in 24h and 48h after pCMVP53 transfection (n=2)

#### **2.4.4 The Combined Treatment Does Not Affect Cell Cycle Distribution.**

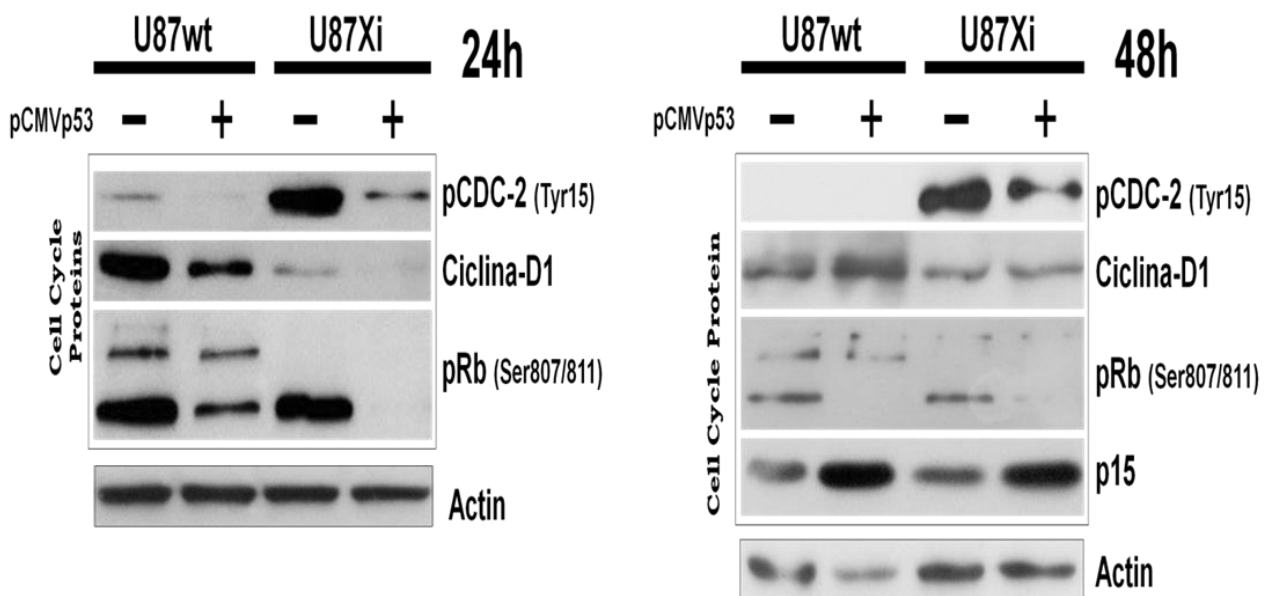
One of the main functions of p53 is trigger cell cycle arrest through its transcriptional target p21, when cells undergoes some DNA injury, and the overexpression of this protein can influence the cell cycle profile. Thus we performed a cell cycle analysis after p53 overexpression in wild type cells and XIAP downregulated cells. The **Figure 4** shows no influence of p53 overexpression in cell cycle profile of U87Xi cells since the percentage of cells in each cell cycle phase was quite similar. The results in U87wt cells were not different only showing a slight increase in G2-phase and reduction in G1-phase. Probably p53 could be influencing the cell cycle mechanism in a small cell group and the analysis was happened 48h after transfection. Moreover this result could be underestimated, since total cultured cells were analyzed, but only a small percentage of cells were treated with p53 overexpression because of its dependence of transfection efficiency.

The cell cycle proteins analyses showed a decrease in Rb protein phosphorylated at Ser807/811 and CDC-2 protein phosphorylated at Tyr15 when p53 was overexpressed. pCDC-2 (Tyr15) was higher in U87Xi when compared to U87wt cells, suggesting that XIAP downregulation affects cell cycle regulation in some way. Furthermore, Cyclin-D1 was decreased in U87Xi, independently to p53 levels and it was softly decreased in U87wt when p53 was overexpressed. Finally, the p15 protein levels were highly increased in P+ situation in both cell lines. Accordingly to these results we can affirm that an imbalance in cell cycle control, when XIAP is downregulated alone or combined to p53 overexpression, is established influencing G1/S as well as G2/M transition. Consistently all results have shown changes in level of proteins involved in this mechanism that could trigger a cell cycle arrest, independently of cell cycle checkpoint, in both 24h and 48h (**Figure 4B**). Relative quantification of all analyzed proteins is showed in **Supplementary Figure 4**.

(A)



(B)

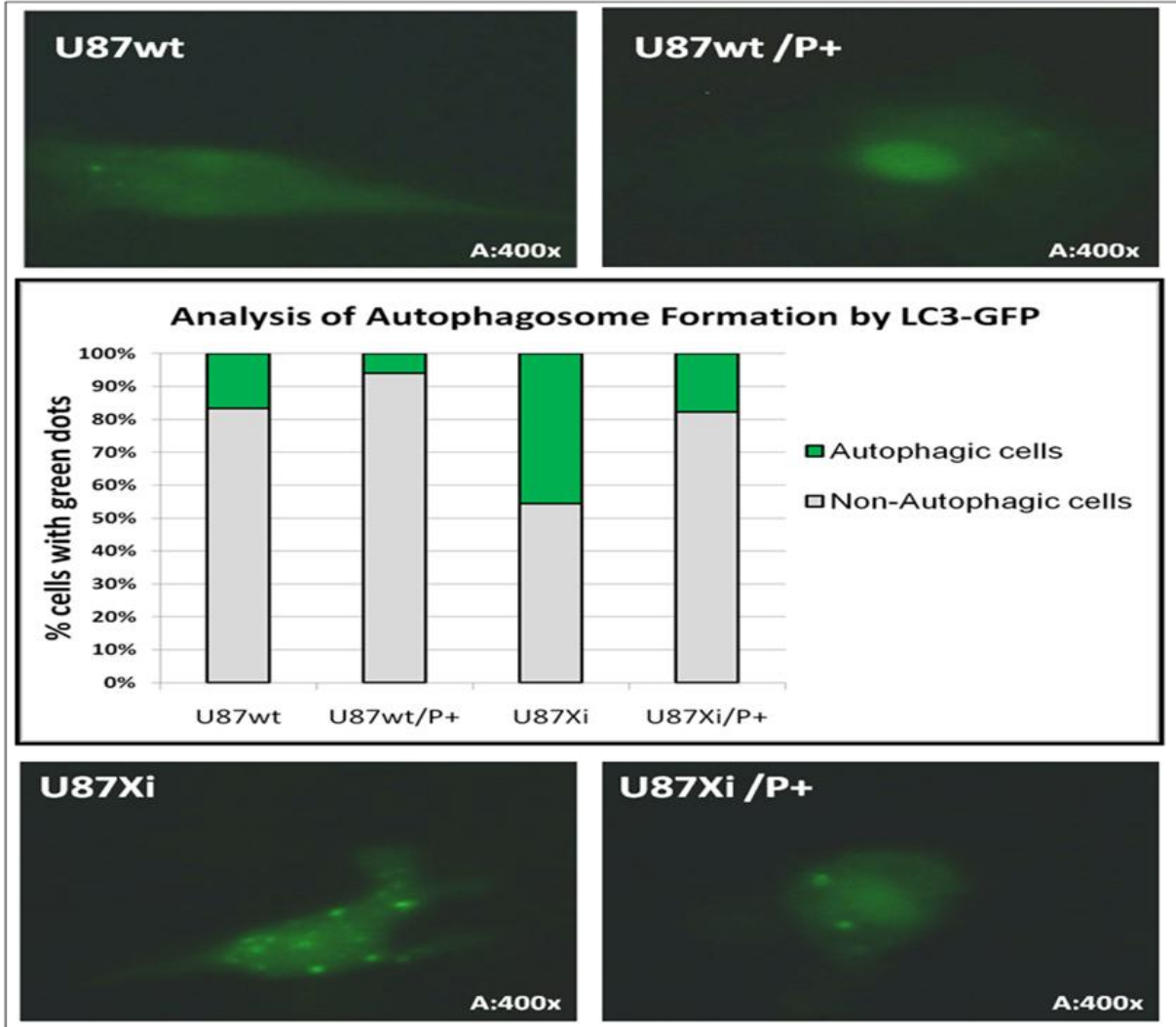


**Figure 4: p53 overexpression does not drastically affect cell cycle independently of XIAP expression in U87 cells. (A)** U87wt and U87Xi cells were treated with p53 overexpression for 48h and no drastic effects were seen. A slightly effect in U87wt could be seen resulting in a soft increase in G2-population, contradicting the literature that shows p53 causing a G1 arrest. Maybe the true effect cannot be seen because just a global analysis was performed to analyze the cell cycle. Only transfected cells were not analyzed because a methodological barrier. Total cells were stained with Propidium Iodide to evaluate the DNA content. The total number of cells analyzed by flow cytometry was considered 100%, excluding sub-G1 population and polyploidy cells (n=2). **(B)** Analysis of protein expression profile of apoptosis pathway members. They were analyzed in 24h and 48h after pCMVP53 transfection (n=2)

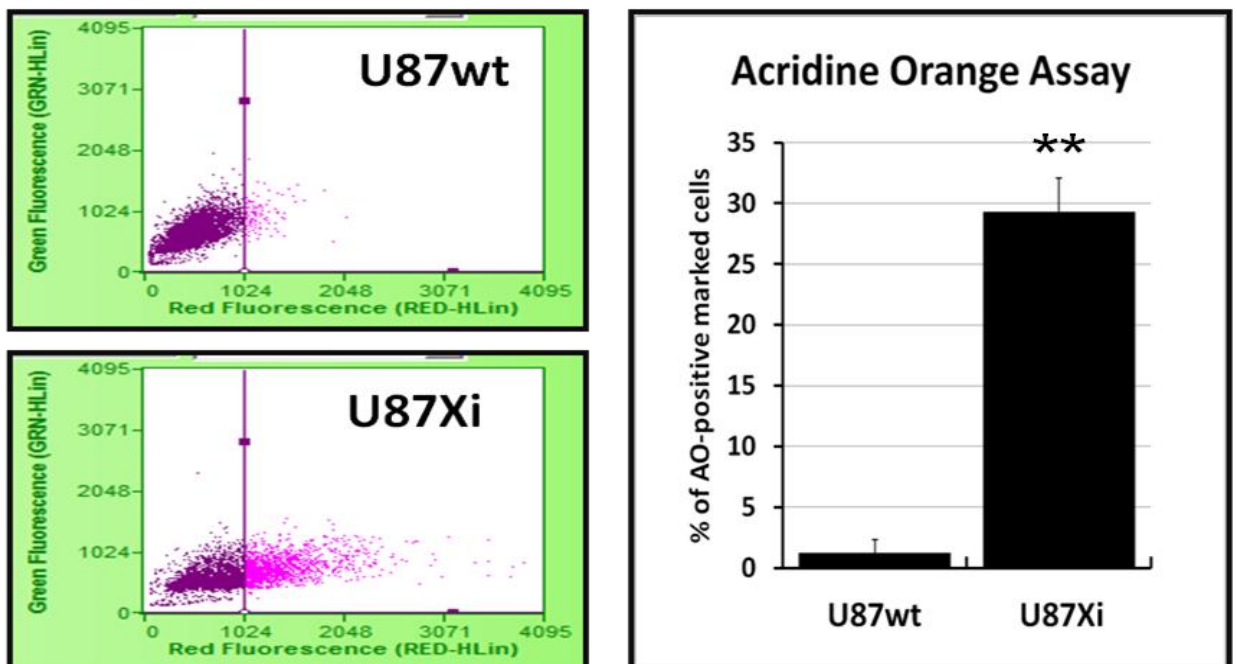
#### **2.4.5 XIAP Downregulation Enhance Autophagy and p53 Overexpression Reverses This Mechanism.**

In order to investigate parallel mechanism of apoptosis which could be modulated by the combined treatment we have assessed the autophagic mechanism profile in U87. Surprisingly, when XIAP protein was downregulated in U87 cells the percentage of cells presenting autophagic features was highly increased, as seen in **Figure 5**. The analysis of autophagosome formation was performed using LC3, an essential protein for the beginning of autophagic process, fused with GFP reporter protein. Thus the initial process of autophagy can be visualized through green cytosolic dots stained with GFP fluorescence representing an initial vesicle of autophagy called autophagosome. In U87Xi cells, the percentage of cells presenting many green cytosolic dots increased comparing to U87wt cells (**Figure 5A**). Accordingly, when the final stage of autophagic process was analyzed through Acridine Orange (AO) staining, the U87Xi cells also presented high levels of AO staining, indicating the completion of the autophagic process. Acridine Orange is a green fluorogenic dye that undergoes physical-chemical changes when it is in an acid environment emitting then a red fluorescence. So the completion of autophagy is proven by increase in red fluorescence inside cells. The **Figure 5B** shows an increase in U87Xi cell percentage showing red fluorescence stain, indicating enhance of autophagic cells. In other hand, the autophagic profile was partially reverted when p53 was overexpressed in both wild type or XIAP downregulated U87 cells (**Figure 5A**).

(A)



(B)



**Figure 5: XIAP downregulation increase autophagic features and p53 overexpression reverts this autophagic condition in U87 cells.** (A) U87 cells were transfected with LC3-GFP plasmid or cotransfected with LC3-GFP plus p53 plasmids and after 48h the autophagosomes staining was measured through manual counting of cells that have presented more than 5 green dots in it cytoplasm, using fluorescence microscopy. The percentages of positive cells are showed in the graphic. Representative images of each treatment group are showed around the graphic. (B) Acridine Orange staining was performed 48h after cells were plated and then a flow cytometry analysis was performed to measure the percentage of cells that presented a red fluorescence, representing the staining of acidic cells compartments, corresponding to mature autophagic vesicles. Representative results of flow cytometry are showed in the left side and the relative quantification of 3 independent experiments performed in duplicate are showed in the right side. A significant difference between U87wt and u87Xi was showed in the graphic (\*\* =  $P < 0,01$ ). (n=3)



## 2.5 DISCUSSION

In this work we have shown the importance to study the effects of more than one modulation of fundamental players in cell survival in Glioma tumor cells. Combining gene therapy for cancers have been designed to overcome problems related to heterogeneity inside of tumor, drug-related toxicity and therapy resistance. The efforts are increasing to find an additive or synergistic effect when more than one gene is modulated and acting on different signaling pathway at the same time can be a strategy to potentiate the effects of isolated therapies. This strategy of treatment has been increasingly exploited for several kinds of tumor and it is rising as a great alternative for Glioma treatment [247, 313-317].

It is known, through literature, the therapeutic potential shown by p53 and XIAP modulation because they are constantly found changed in most of cancer, especially in Gliomas [40, 103, 129, 142, 145]. Moreover, some connection points are known between XIAP and p53 pathways but no direct relation was discovered yet.

We have demonstrated the concomitant modulation of XIAP and p53 promotes cell death in U87 Glioma cell line expressing wild type p53. The tool used to downregulate XIAP is a commercial interference RNA and the tool used to p53 overexpression is an expression vector containing a strong promoter CMV before p53 cDNA, which ensures p53 overexpression. The efficiency of gene transfer methodology showed that the downregulation did not affect the methodology effectiveness, resulting around 40% and 70% positive transfection in U87 and Hek293T cells respectively. p53 overexpression was seen in different cell lines, proving also the tool effectiveness. The moderate levels of transfection in Glioma cell line may have represented a masking of more significant results, mainly in LDH assay, annexinV and cell cycle analysis, since just global analysis have been done for these experiments because methodological obstacles, impeding the statistical analysis of these experiments due to the transfection rates variability. Another difficulty of transfection methodology is the time

expression of a vector in a cell culture, which it is known to be not so extensive, since gene transference by transfection is transient, impeding the experiments performing for more than 10 days.

In relation to population doubling results, p53 overexpress had no effects in U87wt comparing with GFP transfected control cells or no transfected cells. This result was already expected since many papers have already shown that Gliomas tumors containing wild-type p53 alleles respond differently to p53 overexpression or p53 activation therapy than do tumors containing mutant or null p53. Only p53-null or mutated tumors respond to trigger large apoptotic response after p53 therapy, whereas Gliomas containing wild-type p53 alleles only undergo reversible growth arrest (normally G1-arrest) without any evidence of apoptosis after treatment with identical doses of p53 [219-220, 281-283]. This differential response of p53 treatment, dependently of p53 status, is not restricted to Glioma but also occurs in other tumor types, including prostate and lung cancer [285-286].

The majority of Gliomas (approximately 70%) express wild-type p53 [223] and inactivation of p53 functions is thought to arise through alterations in upstream regulatory proteins, such as increases in MDM-2 or loss of p14/ARF [72, 103]. Why the majority of human Gliomas harbor wild-type p53 is still unclear. However it has been hypothesized that some p53 functions, such as cell cycle control, are maintained in tumors with wild-type p53, whereas other p53 functions are inactivated in tumor cells, particularly induction of apoptosis. Nevertheless, this inactivation is not simply a result of inhibition of apoptotic pathway downstream to p53 or changes in p53 regulation, because the p53 treatment resistance of wild-type Glioma cells can be overcome by combining a DNA-damaging agent, such as radiation or Cisplatin [219, 284].

Another evidence that p53-treated U87wt cells are not triggering some cell death mechanism have been shown in no increase on LDH release in the extracellular medium during 10 days, as a feature of cell membrane destabilization, resulting of cell death by necrosis or late apoptosis. Corroborating to these results, the annexinV/PI assay has shown no increase in annexinV marked cell and a moderate number of PI marked cell in 24h,

when p53 was overexpressed, but these levels of PI marked cells were reduced over 48h and 72h. The absence of dying cells was confirmed with the sub-G1 population analysis that has shown no increase, indicating no cell death in response to p53 treatment in U87wt.

The apoptosis resistance when p53 was overexpressed can be clearly seen in western blotting analysis when anti-apoptotic proteins, as Bcl-xL and Bcl-2 had their protein levels increased (mainly in 48h), to offset the increase of natural target of p53 as pro-apoptotic proteins PUMA and Bax [168, 170, 210-211]. All these cited proteins are involved in mitochondrial membrane permeabilization control and are members of Bcl-2 family. Still p53 did not affect the caspase-3 levels in U87wt and, surprisingly, slightly reduced XIAP. It is known p53 influences the mitochondrial permeabilization [168, 211] resulting in pro-apoptotic factors release that regulate XIAP functions, as Smac/DIABLO, but through direct interaction and not by transcriptional regulation [135-136]. No direct relationship between p53 and XIAP was related to date.

About the influence of p53 in cell cycle control, when p53 is overexpressed in U87wt, a slightly increase on G2 subpopulation was detected, but this result are unclear since all cells were analyzed and not only transfected cells. This can cause a distortion in interpreting the data causing false-negative result, relating to subpopulation in G1-phase. In Western blotting analysis, when p53 was overexpressed in U87wt cells, the results were more consistent with the literature, showing a slight reduction in CDC-2 protein levels phosphorylated in Tyr15, which is a inhibitory phosphorylation that block G2-M phase transition, and have shown a initial reduction in Cyclin-D1 in 24h that was totally reverted in 48h showing more elevated relating to control.

Moreover, phosphorylated (Ser807/811) Rb protein strongly decrease when p53 was overexpressed both 24h and 48h and it seems to be a direct result of a high increase of p15/INK4B which is one of several regulator proteins of cell cycle transition from G1 to S phase. Decrease on phosphorylated Rb levels is a high signal to affirm a possible cell cycle arrest because Rb interacts to transcription factor E2F when Rb is dephosphorilated,

blocking E2F transcription action. Then, several proteins involved in cell cycle transition, from G1 to S phase, are not transcribed causing a cell cycle arrest. Hiperphosphorylated Rb means progression on cell cycle and indicates cell proliferation. How p53 overexpression highly increases p15 protein levels is unknown. A possible interaction pathway between p15 and p53 is through Transforming Growth Factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) up-regulation, caused by p53 [318-319]. This cytokine TGF- $\beta$ 1 is responsible to control cell proliferation through up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI), such as p15, p16, p21 and p27 [320].

The choice among cell mechanisms controlled by p53 that will be triggered in response to stress stimuli seems to depend of post-translational changes profile in this protein, such as phosphorylation in specific sites, triggering specially apoptosis [219, 321-323]. However, adaptive mechanisms developed by tumor cells such as overexpression or activation of phosphatases, enzymes responsible to remove phosphate group from its substrate, can block some p53 activities through p53 dephosphorylation, impeding that p53 triggers apoptosis [324-325].

When XIAP was downregulated in U87 cells, no significantly effect was seen in cell proliferation profile comparing to wild-type cell profile. Maybe the XIAP downregulation could result in a compensatory increase of another IAP family members that are responsible to the same function of XIAP such as inhibit caspase activities, resulting in no significant effects on cell proliferation [127, 326]. LDH assay results have shown no cytotoxic effects in U87Xi comparing to wild-type cells, corroborating to PD results. However apoptotic features were found in these cells when we have analyzed annexinV stain, cell cycle profile and western blotting analysis, showing increase of phosphatidylserine externalization, enhance in Sub-G1 population and accumulation/increase of caspase-3 and PUMA pro-apoptotic proteins, respectively, and counteracting the cell proliferation profile result.

Besides, a slight increase on G2 subpopulation was seen in cell cycle analysis, comparing to wild-type, corroborating to a high increase in inhibitory phosphorylation of CDC-2, responsible to block G2-M passage. No effects were seen in other cell cycle proteins in U87Xi comparing to U87wt. Despite

the disagreement of PD analysis, all other results related to XIAP downregulation are accordingly to the literature, showing a facilitation to trigger the apoptosis mechanism when XIAP is downregulated, at least in a sub-population that can be more sensitive to this change in XIAP levels. The remaining cells can be responsible for a similar proliferation to wild type cells, masking a significant difference between their proliferation profiles. Remembering that even in a tumor cell line, the heterogeneity is quite large as well as in tumors "*in vivo*" and this fact must be considered.

When we analyzed the cell proliferation profile of cell with Survivin downregulation, another member of XIAP family, which it have similar function in caspases, but less powerful, no reduction was seen. This result was expected, since this protein is not able to completely inhibit both initiator and effector pathways of apoptosis as well as XIAP, and its absence can be compensated by other IAP family members like XIAP itself [115, 127]. Survivin acts only as an auxiliary protein in inhibit effector caspases -3 and -7 [327].

The combining treatment with p53 overexpression and XIAP downregulation has presented greatest results with respect to an antitumor strategy against Gliomas. This simultaneous intervention has caused a decrease in proliferation of treated cells. Interestingly, the anti-proliferative effect of this simultaneous intervention was so strong that it could be seen in a global analysis of cell proliferation and even in no treated cells (no transfected cells at the same culture of the cells that were transfected with p53). This result in the no treated cells was very interesting and curious, suggesting some paracrine effect resulting to this combination. Maybe an altered expression of some secretable cytokine can be the reason of decrease on cell proliferation of this sub-population. As already cited, TGF- $\beta$ 1 is a transcriptional target of p53 and this cytokine is responsible to negatively regulate cell proliferation [318-320], beyond it was already seen being secreted and regulating tumor proliferation [328]. This suggestion becomes more interesting when the western blotting results are analyzed, showing p15 increase, pRb (Ser807/811) decrease, which it is a probable response to p15 increase, and a reduction on phosphorylation in Tyr15 of

CDC-2, reverting that situation of G2-arrest to a possible G1-arrest. The G1 arrest was not seen in cell cycle analysis, but it could have been masked again due to a global analysis and not a specific analysis of only p53 transfected cells. Further investigations must be made to confirm these very interesting western blotting results enabling us to affirm that the simultaneous XIAP downregulation and p53 overexpression besides inducing apoptosis, it can also induce cell cycle arrest. On the other hand, the p53 overexpression in Survivin downregulated cells have resulted in a softly decrease in cell proliferation, proving its soft influence in anti-proliferative mechanisms. Some evidences have shown an antagonistic effects between p53 and Survivin, which p53 inhibits Survivin expression [216, 329-330] contributing to pro-apoptotic effects and Survivin expression cooperates to suppression of these pro-apoptotic effects of p53 [216, 329]. However, Survivin functions related to apoptosis can be compensated by other more strong proteins at same family, resulting in no significant effects when combined with p53 overexpression.

Several results show anti-proliferative effects of this combination and most of them are inclined to suggest cell death as the main mechanism responsible for these effects. Although we have very interesting results about cell cycle arrest, most of results suggest apoptosis being triggered by the combination, since both proteins are involved in this mechanism. Decrease on proliferation, probably is the sum of cell death and cell cycle arrest, indicating a great power for this combinatory therapy that acts in more than one pathway converging to anti-proliferative results. The comparison between effects of p53 overexpression in wild-type and XIAP downregulated cells and p53 only showed effects when combining to XIAP downregulation.

Accordingly to this, the cytotoxicity assay (LDH) have shown a high increase in LDH release as a result of membrane destabilization, signal of cell death, when it was used combining treatment. Some works context LDH result as signal of cell death, because some cell events like senescence, can change the enzyme expression, affecting the final results, since p53 is involved to senescence induction in many cancer, including Gliomas [331-333]. But in this work, this assay is only complementary to confirm other cell death results, like annexinV results that have shown a high increase in

positive stained cells as early as 24h and have persisted throughout 72h. The relative quantity of dead cells (represented by Black bars) in U87wt is different to U87Xi, whereas in the first the most of events are stained to Propidium Iodide and the most of events in the last are doubly stained. These findings suggest a triggering of apoptotic mechanism in U87Xi before the first analysis in 24h, and the p53 overexpression could be represent the decisive step to go ahead in the apoptosis pathway for these cells. Moreover the quantity of PI staining decrease in the course of time in U87wt probably do not represent a cell death event, while in U87Xi it was slowly substituted by just annexinV staining, suggesting new apoptotic events happening along of experiment. This hypothesis is further confirmed by the sub-G1 analysis, representing an apoptotic feature, which was increased when p53 was overexpressed in U87Xi cells.

Moreover, the apoptotic features causing by combining treatment were confirmed by protein expression analysis that have presented increase in pro-apoptotic proteins, as Bax, PUMA and Caspase-3 and decrease of anti-apoptotic proteins like Bcl-2, proving indirectly the triggering of apoptosis.

The effects of p53 in autophagy control are quite complex and totally dependent of protein localization [334-335]. We have found p53 overexpression reduces the autophagic features in both U87wt and U87Xi. Many works have shown cytosolic p53 inhibiting autophagy [336-337] unlike nuclear p53 that is responsible to activate autophagy through expression of p53 transcription targets responsible to or directly modulate autophagy as Bax, Puma, DRAM1, DAP-K1, or modulate mTOR, through TSC2, AMPK and SESN2 [338-344]. Therefore, to evaluate the reasons why p53 is reducing autophagy levels in these cells, independently of XIAP downregulation, would need further investigations to affirm what is in fact the main reason for this cell event responding to p53 overexpression. We suggest, in U87 wild type, the softly increase in Bcl-xL and Bcl-2 can be one of reasons for this autophagy reduction since the anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family can interact to initiator proteins of autophagy mechanism, like beclin-1, and block them, reducing autophagy levels [308, 345-346]. These interactions occur through their BH (Bcl-2 Homology) domain, which are

responsible for the most interaction of BH-containing proteins, as Bcl-2 family [345-346]. Maybe it can also be the reason for the strong increase in autophagic features in U87Xi, since these cells have shown a high decrease in Bcl-xL levels comparing to wild-type cells and a increase of Bcl-2, supposedly because this Bcl-xL reduction as an attempt to compensate this decrease, and to respond to increase of pro-apoptotic proteins like Bax and PUMA [347]. Thereby, the bcl-2 increase seems not to be sufficient to compensate all of these protein changes and autophagy can be triggered [346]. Regarding the decrease of autophagy in U87Xi when p53 was overexpressed, we suggest a response like a detour of autophagy pathway to apoptosis pathway, since both routes share some control proteins like a PUMA and Bax [338], DRAM [348] and the p53 itself [349].

After all of these results and based on literature information, we have hypothesized an intercommunication pathway between p53 and XIAP, and a explanation how the modulation of these proteins can contribute to anti-proliferative and antitumor effects each other, as summarized in **Figure 10**. The main suggestion is p21 being the key point of potentiation of p53 effects by XIAP downregulation.

P21 is one of main transcriptional targets of p53 and has been shown not only to promote cell cycle arrest but also to inhibit apoptotic cell death [203], in part by blocking the cleavage and consequently activation of pro-caspase-3 to active caspase-3 [204]. Consequently, p53-induced apoptosis can be blunted by 21, and some strategy that removes p21 may potentiate the apoptotic effects of p53. It is clear in our finding that p53 overexpression increase p21 protein in U87wt, but the apoptotic effects of p53 were not seen. Moreover, it was described that XIAP overexpression induce p21 and block cell proliferation in endothelial cells [244] and that an activated caspase-3 was found to cleave p21, converting its growth arresting effect into an apoptotic effect [246]. Then, a decrease on XIAP levels in tumor cells can allows more activation of caspase-3 and decrease p21 induction. On the other hand, p53 overexpression can activate more caspase-3, through mitochondrial apoptotic pathway, resulting in ablation of p21 and establishing a positive feedback in the caspase-3 activation, resulting in increase of



apoptosis. We demonstrated that p53 overexpression induced an increase in PUMA and Bax, two proteins responsible for activating the mitochondrial apoptosis pathway, probably resulting in the release of apoptotic factors such as Cytochrome C and Smac/DIABLO, that activate caspase-3 and block XIAP function, respectively. Thereby, simultaneous downregulation of XIAP and p53 overexpression are potentiating their antitumor effects by maximizing the pro-apoptotic stimuli and minimizing the anti-apoptotic stimuli each other [302].

A few studies have exploring these combination and all have shown the same results showed in this work, enhancing the credibility of this hypothesis [247-249, 302]. Some phase I/II clinical trials using or molecules that downregulate XIAP or molecules that increase p53 in cells are being performed for some cancers and have shown great results [350]. Thereby, the simultaneous modulation can represent a new strategy to be tested in Clinical Trials.

Therefore, from this work and other similar works that support these ideas, we can conclude that the combined effect of p53 overexpression and XIAP downregulation has a high clinic potential, as combining gene therapy, for GBM treatment. New studies have to be performed to indeed verify the hypothesis suggested and to confirm this connection point between these proteins. Maybe, further investigations using this therapy concomitant with conventional chemotherapies, as TMZ, can result in a discovery of a good strategy of treatment. Thereby, it will be possible to advance in the concept to apply this strategy in Glioma treatment and even other kinds of cancers.

## **2.6 ACKNOWLEDGEMENT**

We would like to thank CNPq and FAPERGS by financial grants, all workmates of Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, specially to Eduardo C. F. Chiela and José E. Vargas for ideas, criticisms and suggestions, and Dr. Tamotsu Yoshimori for the GFP-LC3 plasmid.

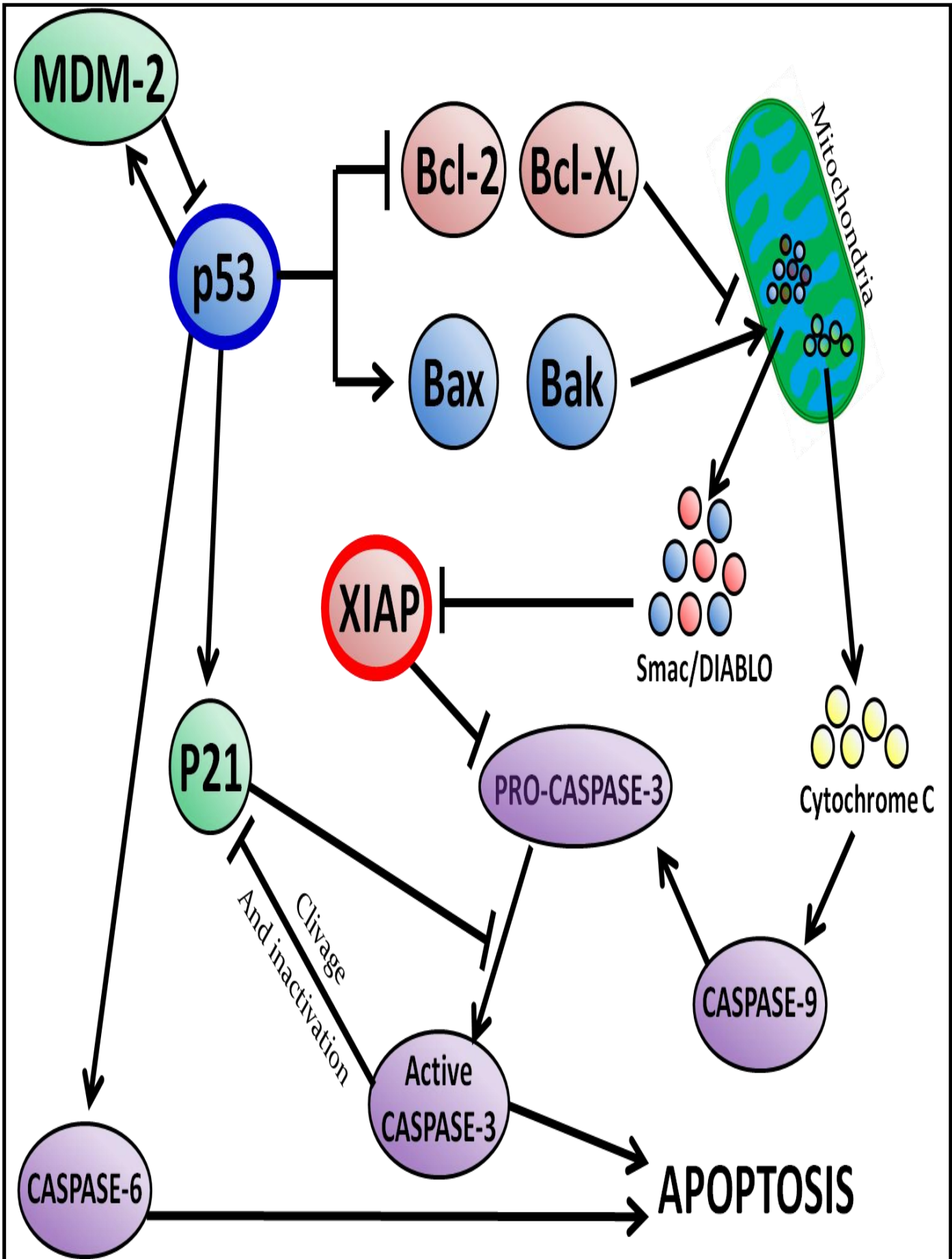
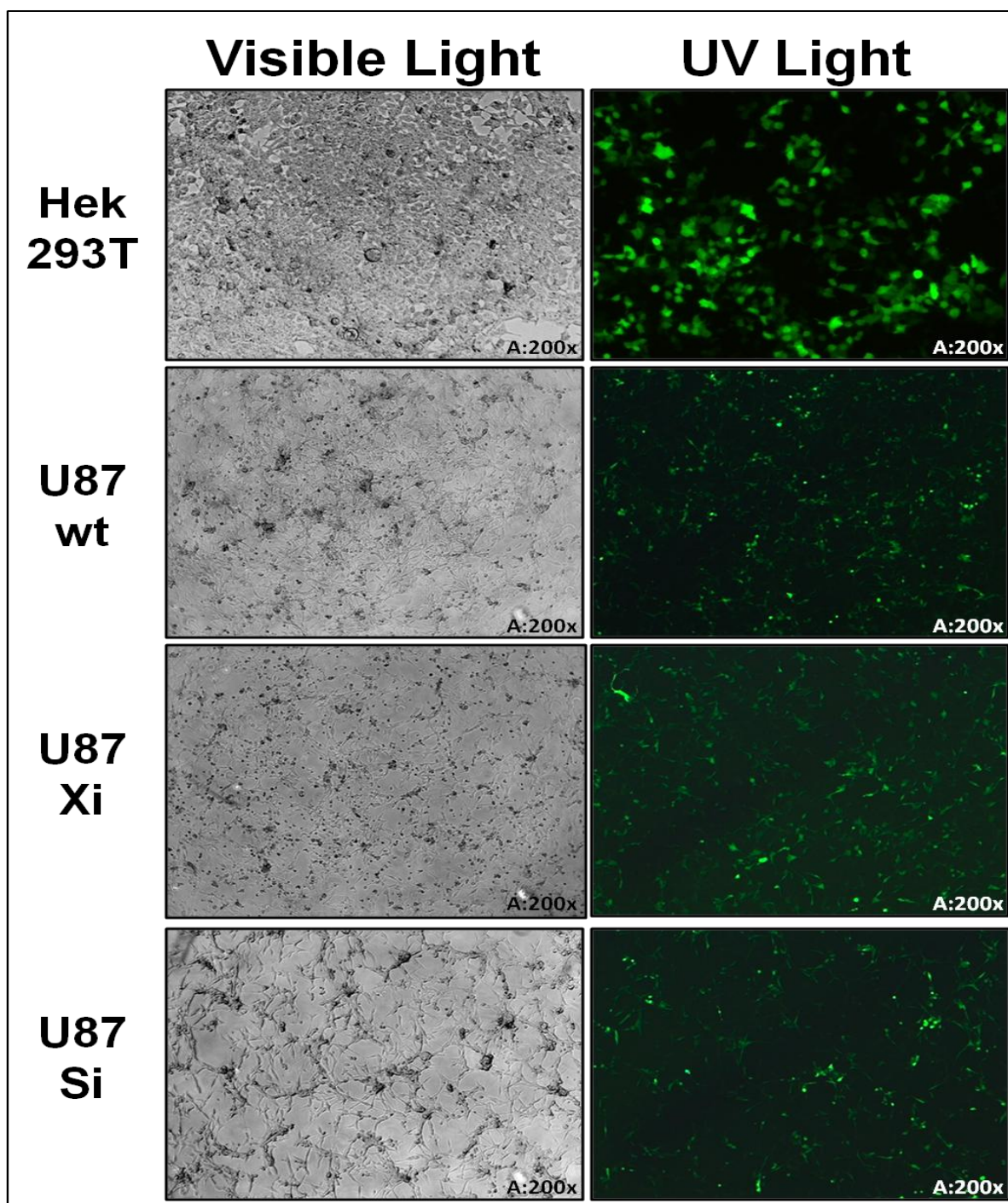


Figure 6: Hypothesis suggested for a p53 and XIAP interaction.

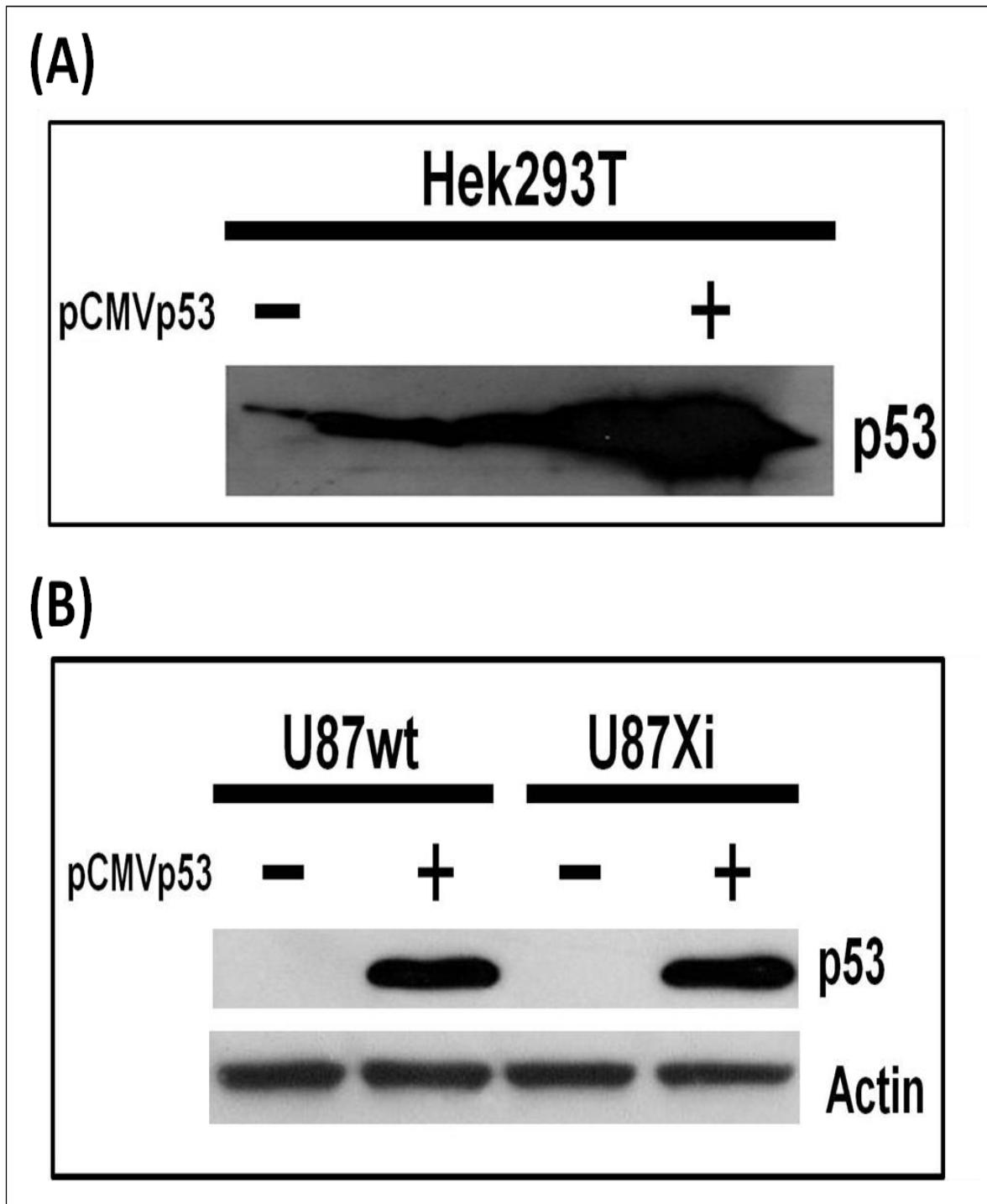
## 2.7 Supplementary Figure List

### 2.7.1 Supplementary Figure 1



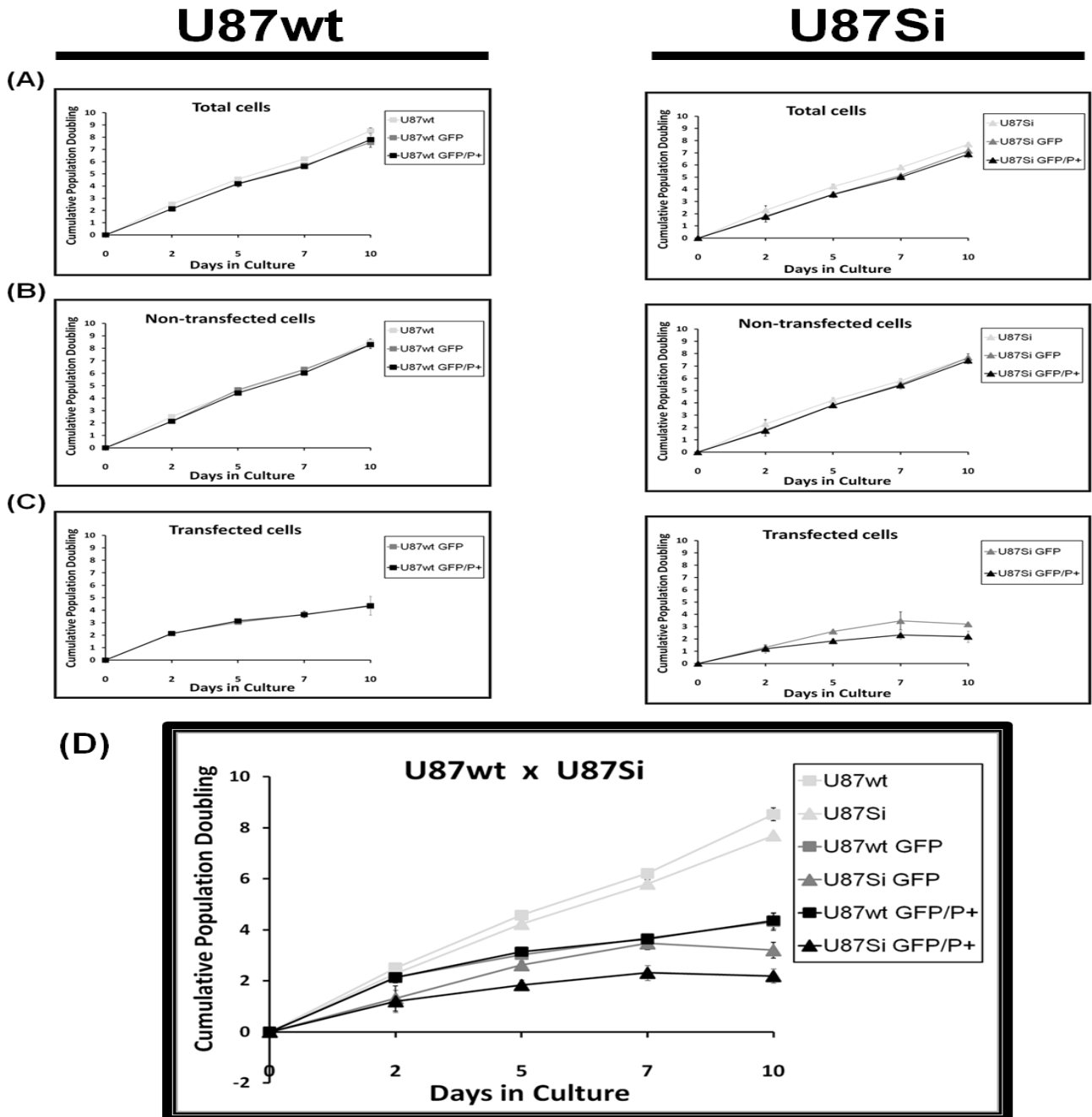
**Supplementry Figure 1: Efficiency of Gene transference mechanism.** The images show that the efficiency of transfection reagent was not affected by gene downregulation through RNAi, resulting in great levels of transfection, visualized through Green Fluorescence Protein (GFP) reporter gene expression, for all cell lines used in this work. Images were obtained through fluorescence microscopy in visible light (left column) and ultraviolet light (right column) with 200x magnification. The images are representative of transfection process using lipofectamine 2000 and the transfection efficiency was around 40% to U87 cells and 70% to Hek293t cells.

## 2.7.2 Supplementary Figure 2



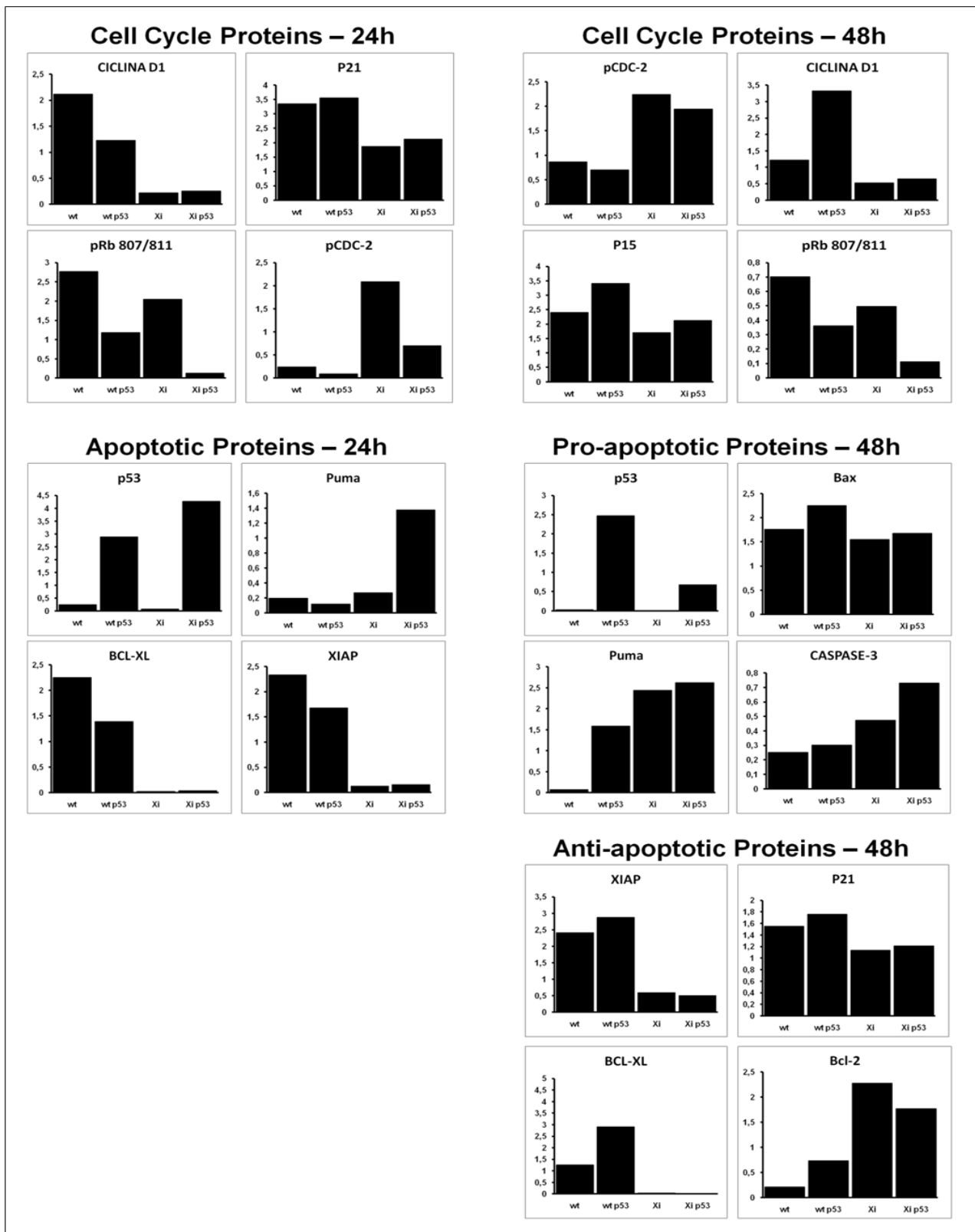
**Supplementary Figure 2: Efficiency of expression vector pCMVp53.** Western blot analysis have shown an increase in p53 expression when cells were transfected with pCMVp53, proving the functioning of the overexpression tool. Protein extraction was performed 24h after p53 transfection and the protein expression profile have already shown a high increase in p53 expression in different cell lines. Moreover, in U87 cells, the negative column for pCMVp53 was transfected only with GFP plasmid, showing that the GFP expression do not influence p53 expression.

### 2.7.3 Supplementary figure 3



**Supplementary Figure 3: p53 overexpression does not affect U87Si proliferation.** Cumulative population Doubling (PD) graphics show no effects of p53 overexpression in U87 downregulated for another member of IAP family, Survivin (U87Si) (right images) when compared with control U87 wt (left images). Cells were transfected with pCMVp53 at day 0 and at days 2, 5, 7 and 10 after transfection, the PD was determined through flow cytometry. Gray lines, dark gray lines and black lines correspond to non-transfected cells, GFP only transfected cells and GFP plus p53 cotransfected cells. **(A)** Cumulative PD Global analysis. **(B)** Cumulative PD of cells that were not efficiently transfected in each group. **(C)** Cumulative PD of cells that were efficiently transfected in each group. The specific analysis of transfected and non-transfected were performed through GFP green fluorescence presence or not. **(D)** Comparative population Doubling (PD) graphic between p53 overexpression effects in U87wt and U87Si. Each graphic represents the average  $\pm$  SD of five independent experiments performed in duplicate.  $P < 0,05$  were considered significant (represented by asterisk). (n=5)

## 2.7.4 Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4: Global quantification of protein expression profile.** Proteins involved with apoptosis and cell cycle control were investigated and a relative quantification was performed using pan-actin expression as loading control. Protein expressions showed in graphics are resulting of the ratio between each protein and pan-actin expression. Bars are the result of average of two independent experiments. (n=2)

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir do presente trabalho, mostramos que o efeito da superexpressão de p53, combinado com o silenciamento de XIAP, resulta em um aumento na ativação de mecanismos antitumorais na linhagem de Glioma U87. Vimos que os principais mecanismos pelos quais esta modulação gênica combinatória atua são baseados nos efeitos da indução do processo de morte celular por apoptose e, supostamente, uma parada no ciclo celular. A grande maioria dos resultados mostrou-se coerente com os efeitos já relatados das proteínas p53 e XIAP moduladas de forma individual. Além disso, a potencialização dos seus efeitos, como resultado da combinação simultânea, representa um grande avanço na luta pela descoberta de uma terapia eficiente para o tratamento de Gliomas. Ainda, a manipulação gênica combinada também apresentou algumas novidades que estimulam futuras investigações para maiores esclarecimentos, como o possível efeito parácrino resultante da superexpressão de P53 em células silenciadas para XIAP.

Além disso, não foi possível constatar um potencial efeito anti-proliferativo em células tumorais, quando combinamos a superexpressão de p53 com outra proteína da família das IAP, a Survivina, confirmando que o efeito da combinação se dá pela peculiaridade de cada uma das integrantes da terapia e não pela característica geral nas quais estas estão engajadas. Este trabalho consolida a idéia de que XIAP é a mais potente proteína da sua família através do bloqueio das etapas iniciadora e efetora do processo apoptótico, uma vez que somente ela foi capaz de potencializar significativamente os efeitos de p53.

O uso de terapias combinatórias vem crescendo cada vez mais na pesquisa oncológica, na busca de uma simultânea modulação de vias diferentes que possam potencializar os efeitos antitumorais uma da outra. O presente trabalho é um dos muitos exemplos e mostra que a busca de respostas satisfatórias no tratamento de neoplasias usando componentes isolados das células pode ser substituído pela terapia combinatória, uma vez

que hoje já se tem um vasto conhecimento sobre as funções e interações da maioria dos componentes protéicos da célula. Aplicar estes conhecimentos na busca de uma combinação de efeitos que possam mostrar uma maior resposta antitumoral torna-se uma necessidade cada vez mais iminente na pesquisa do câncer e os resultados obtidos podem ser melhores do que se espera.

A partir dos resultados aqui mostrados, muitas dúvidas surgiram, várias hipóteses foram elaboradas e novas idéias foram sugeridas. Assim, outros experimentos deverão ser realizados para obtermos um total entendimento do efeito combinado de p53 e XIAP e através de quais mecanismos de ação esses efeitos se mostram tão potentes no tratamento de GBM. Como perspectivas para este trabalho, temos:

- A) Confirmar se realmente a apoptose é a principal razão da redução da proliferação celular, realizando alguns experimentos adicionais como atividade de caspase, presença de proteínas fundamentais para o processo apoptótico mais efetoras do que as apresentadas neste trabalho, como liberação de citocromo c e SMAC/Diablo, resultante da permeabilização da mitocôndria, caspase-3 e -7 e Apaf-1 clivadas, como resultado da efetivação do processo apoptótico entre outras.
- B) Analisar com maior precisão os efeitos da interação de XIAP e p53 no controle do ciclo celular através da verificação das sub-populações em cada etapa do ciclo por análise do ciclo celular por citometria de fluxo.
- C) Investigar se realmente há algum efeito parácrino, resultante da combinação da modulação de XIAP e p53
- D) Analisar os efeitos anti-proliferativos da expressão de p53, a longo prazo, nas células silenciadas para XIAP
- E) Verificar os efeitos da modulação de XIAP e p53 em outros mecanismos celulares controlados por p53 como senescência, migração celular e reparo ao DNA



- F) Realizar os mesmos experimentos utilizando uma linhagem celular de Glioma que contém p53 inativada e verificar o perfil dos efeitos induzidos pela modulação gênica combinada de p53 e XIAP.
- G) Realizar experimentos para verificar o efeito da terapia combinada de p53 e XIAP em resposta a quimioterápicos mais usados (Temozolomida, Cisplatina e Doxorubicina) e outros compostos com efeitos antitumorais como o Resveratrol.
- H) Realizar experimentos *in vivo* com células tratadas com o combinado de XIAP e p53 e verificar a influência do microambiente na modulação do crescimento tumoral.
- I) Investigar as causas do aumento de autofagia quando XIAP é silenciada e elucidar como p53 estaria revertendo este quadro autofágico nestas células

## 4. REFERÊNCIAS

1. Westphal, M. and K. Lamszus, *The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(9): p. 495-508.
2. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
3. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
4. Ashby, L.S. and T.C. Ryken, *Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches*. Neurosurg Focus, 2006. **20**(4): p. E3.
5. CBTRUS, *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2007*. 2011.
6. Gladson, C.L., R.A. Prayson, and W.M. Liu, *The pathobiology of glioma tumors*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 33-50.
7. Society, A.A.C., *American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007*. 2007.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
9. Porter, K.R., et al., *Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology*. Neuro Oncol, 2010. **12**(6): p. 520-7.
10. Pollack, I.F., *Brain tumors in children*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1500-7.
11. *Preview of the Medifocus Guidebook on: Glioblastoma*. Disponível em <http://www.glioblastoma-guidebook.com>, Acessado em 27 de novembro de 2009.
12. Medifocus, *Preview of the Medifocus Guidebook on: Glioblastoma Disponível no site: <http://www.glioblastoma-guidebook.com>*. 2011.
13. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
14. Bondy, M.L., et al., *Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. Cancer, 2008. **113**(7 Suppl): p. 1953-68.

15. Kaye A. H, L.E.R., *Historical Perspective in Brain Tumors*. 1995: p. pp 3-8.
16. Louis, D.N., *Molecular pathology of malignant gliomas*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 97-117.
17. Mason, W.P. and J.G. Cairncross, *Invited article: the expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas*. Neurology, 2008. **71**(5): p. 365-73.
18. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
19. Vitucci, M., D.N. Hayes, and C.R. Miller, *Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy*. Br J Cancer, 2011. **104**(4): p. 545-53.
20. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
21. Eyupoglu, I.Y., et al., *Malignant glioma-induced neuronal cell death in an organotypic glioma invasion model. Technical note*. J Neurosurg, 2005. **102**(4): p. 738-44.
22. Kleihues, P. and L.H. Sobin, *World Health Organization classification of tumors*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2887.
23. Gladson, C.L., R.A. Prayson, and W.M. Liu, *The Pathobiology of Glioma Tumors*. Annu Rev Pathol, 2009.
24. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
25. Fuller, G.N. and B.W. Scheithauer, *The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities*. Brain Pathol, 2007. **17**(3): p. 304-7.
26. Rao, R.D., et al., *Genetic and signaling pathway alterations in glioblastoma: relevance to novel targeted therapies*. Front Biosci, 2003. **8**: p. e270-80.
27. Sathornsumetee, S. and J.N. Rich, *Designer therapies for glioblastoma multiforme*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1142**: p. 108-32.
28. Miller, C.R. and A. Perry, *Glioblastoma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(3): p. 397-406.
29. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.

30. Godard, S., et al., *Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6613-25.
31. Furuta, M., et al., *Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme*. *Oncogene*, 2004. **23**(40): p. 6806-14.
32. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 159-67.
33. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
34. Mischel, P.S., S.F. Nelson, and T.F. Cloughesy, *Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(3): p. 242-7.
35. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 157-73.
36. Maher, E.A., et al., *Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities*. *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11502-13.
37. Liang, Y., et al., *Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(16): p. 5814-9.
38. Sanson, M., J. Thillet, and K. Hoang-Xuan, *Molecular changes in gliomas*. *Curr Opin Oncol*, 2004. **16**(6): p. 607-13.
39. Ferguson, S.D., *Malignant gliomas: diagnosis and treatment*. *Dis Mon*, 2011. **57**(10): p. 558-69.
40. (TCGA), T.C.G.A., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
41. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(12): p. 2235-41.
42. Kita, D., et al., *PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas*. *Acta Neuropathol*, 2007. **113**(3): p. 295-302.

43. Wang, S.I., et al., *Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 1997. **57**(19): p. 4183-6.
44. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. *Brain Pathol*, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
45. Gan, H.K., A.H. Kaye, and R.B. Luwor, *The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme*. *J Clin Neurosci*, 2009. **16**(6): p. 748-54.
46. Huang, H.S., et al., *The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(5): p. 2927-35.
47. Humphrey, P.A., et al., *Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(11): p. 4207-11.
48. Moscatello, D.K., et al., *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. *Cancer Res*, 1995. **55**(23): p. 5536-9.
49. Lee, J.C., et al., *Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain*. *PLoS Med*, 2006. **3**(12): p. e485.
50. Ekstrand, A.J., et al., *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4309-13.
51. Han, W., et al., *Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(10): p. 1361-8.
52. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. *Science*, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
53. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. *Nat Genet*, 1997. **15**(4): p. 356-62.

54. Myers, M.P., et al., *The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13513-8.
55. Tamura, M., et al., *Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1614-7.
56. Myers, M.P., et al., *P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9052-7.
57. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
58. Mellingerhoff, I.K., et al., *Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors*. N Engl J Med, 2005. **353**(19): p. 2012-24.
59. Chu, E.C. and A.S. Tarnawski, *PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology*. Med Sci Monit, 2004. **10**(10): p. RA235-41.
60. Tohma, Y., et al., *PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(7): p. 684-9.
61. Nevins, J.R., *The Rb/E2F pathway and cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 699-703.
62. Wu, X. and A.J. Levine, *p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3602-6.
63. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
64. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
65. Ohtani, N., et al., *The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression*. J Med Invest, 2004. **51**(3-4): p. 146-53.
66. Gonzalez-Fernandez, F., et al., *Expression of developmentally defined retinal phenotypes in the histogenesis of retinoblastoma*. Am J Pathol, 1992. **141**(2): p. 363-75.
67. James, C.D., et al., *Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages*. Cancer Res, 1988. **48**(19): p. 5546-51.

68. Henson, J.W., et al., *The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas*. Ann Neurol, 1994. **36**(5): p. 714-21.
69. Nakamura, M., et al., *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. **81**(1): p. 77-82.
70. James, C.D., et al., *Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon alpha and interferon beta-1 gene deletions in human glial tumors*. Cancer Res, 1991. **51**(6): p. 1684-8.
71. Olopade, O.I., et al., *Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas*. Cancer Res, 1992. **52**(9): p. 2523-9.
72. Nakamura, M., et al., *p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas*. Brain Pathol, 2001. **11**(2): p. 159-68.
73. Biernat, W., et al., *Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas*. Acta Neuropathol, 1997. **94**(4): p. 303-9.
74. Fuse, T., et al., *p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma*. J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1393-9.
75. Reifenberger, G., et al., *Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2*. Cancer Res, 1994. **54**(16): p. 4299-303.
76. Nishikawa, R., et al., *Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas*. Cancer Res, 1995. **55**(9): p. 1941-5.
77. Amundson, S.A., T.G. Myers, and A.J. Fornace, Jr., *Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3287-99.
78. Hoh, J., et al., *The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8467-72.
79. Levine, A.J., W. Hu, and Z. Feng, *The P53 pathway: what questions remain to be explored?* Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1027-36.
80. Rich, J.N. and D.D. Bigner, *Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(5): p. 430-46.
81. Higashimoto, Y., et al., *Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23199-203.
82. Agarwal, M.L., et al., *The p53 network*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 1-4.

83. Carnero, A., et al., *The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(3): p. 187-98.
84. Bogler, O., et al., *The p53 gene and its role in human brain tumors*. *Glia*, 1995. **15**(3): p. 308-27.
85. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 817-25.
86. Stott, F.J., et al., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2*. *EMBO J*, 1998. **17**(17): p. 5001-14.
87. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. *Cell*, 1992. **69**(7): p. 1237-45.
88. Oliner, J.D., et al., *Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 80-3.
89. Mitchell, E.L., et al., *Mapping of gene loci in the Q13-Q15 region of chromosome 12*. *Chromosome Res*, 1995. **3**(4): p. 261-2.
90. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
91. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
92. Picksley, S.M. and D.P. Lane, *The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?* *Bioessays*, 1993. **15**(10): p. 689-90.
93. Barak, Y., et al., *Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential*. *Genes Dev*, 1994. **8**(15): p. 1739-49.
94. Zauberman, A., et al., *A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(14): p. 2584-92.
95. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 8292-7.



96. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.
97. Fleming, T.P., et al., *Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors*. Cancer Res, 1992. **52**(16): p. 4550-3.
98. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.
99. Chen, D., et al., *ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1071-83.
100. Zhong, Q., et al., *Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1085-95.
101. Sharpless, N.E., *INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus*. Mutat Res, 2005. **576**(1-2): p. 22-38.
102. Gallagher, S.J., R.F. Kefford, and H. Rizos, *The ARF tumour suppressor*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1637-41.
103. Sauvageot, C.M., S. Kesari, and C.D. Stiles, *Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells*. Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 891-924, vii.
104. Royds, J.A. and B. Iacopetta, *p53 and disease: when the guardian angel fails*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1017-26.
105. Soussi, T., et al., *Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations*. Hum Mutat, 2005. **25**(1): p. 6-17.
106. Shu, K.X., B. Li, and L.X. Wu, *The p53 network: p53 and its downstream genes*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **55**(1): p. 10-8.
107. Bak, M., et al., *[The clinical value of mdm-2 (proto-oncogene) expression in testicular cancer, Correlation with tumor progression]*. Orv Hetil, 1999. **140**(33): p. 1837-40.
108. Kominami, K., et al., *Methylation in p14(ARF) is frequently observed in colorectal cancer with low-level microsatellite instability*. J Int Med Res, 2009. **37**(4): p. 1038-45.

109. Sun, L.P., et al., [*Relationship between gastric cancer and gene amplification of p14 and mdm2*]. *Ai Zheng*, 2004. **23**(1): p. 36-9.
110. Zawlik, I., et al., *Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(2): p. 188-94.
111. Srivastava, S., et al., *Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome*. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 747-9.
112. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. *Science*, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
113. Olive, K.P., et al., *Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome*. *Cell*, 2004. **119**(6): p. 847-60.
114. Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. *Apoptosis*, 2007. **12**(9): p. 1543-68.
115. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
116. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. *EMBO J*, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
117. Deveraux, Q.L., et al., *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases*. *EMBO J*, 1999. **18**(19): p. 5242-51.
118. Duckett, C.S., et al., *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. *EMBO J*, 1996. **15**(11): p. 2685-94.
119. Roy, N., et al., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. *EMBO J*, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
120. Sun, C., et al., *NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP*. *Nature*, 1999. **401**(6755): p. 818-22.
121. Sun, C., et al., *NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33777-81.

122. Hu, S. and X. Yang, *Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10055-60.
123. Huang, H., et al., *The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26661-4.
124. Yang, Y., et al., *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli*. Science, 2000. **288**(5467): p. 874-7.
125. Holcik, M., H. Gibson, and R.G. Korneluk, *XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target*. Apoptosis, 2001. **6**(4): p. 253-61.
126. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
127. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
128. Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 988-94.
129. Schimmer, A.D., et al., *Targeting XIAP for the treatment of malignancy*. Cell Death Differ, 2006. **13**(2): p. 179-88.
130. Takahashi, R., et al., *A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7787-90.
131. Johnson, D.E., et al., *Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1818-23.
132. Joazeiro, C.A. and A.M. Weissman, *RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity*. Cell, 2000. **102**(5): p. 549-52.
133. Gyrd-Hansen, M., et al., *IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1309-17.
134. Liston, P., et al., *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 128-33.

135. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
136. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins*. Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
137. Yamaguchi, K., et al., *XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway*. EMBO J, 1999. **18**(1): p. 179-87.
138. Sanna, M.G., et al., *Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6015-20.
139. LaCasse, E.C., et al., *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3247-59.
140. Kashkar, H., *X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(18): p. 4496-502.
141. Tamm, I., et al., *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
142. Mizutani, Y., et al., *Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis*. Int J Oncol, 2007. **30**(4): p. 919-25.
143. Liston, P., W.G. Fong, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8568-80.
144. Wagenknecht, B., et al., *Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma*. Cell Death Differ, 1999. **6**(4): p. 370-6.
145. LaCasse, E.C., et al., *IAP-targeted therapies for cancer*. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6252-75.
146. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
147. Moll, U.M. and L.M. Schramm, *p53--an acrobat in tumorigenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(1): p. 23-37.
148. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *p53: good cop/bad cop*. Cell, 2002. **110**(1): p. 9-12.

149. Vousden, K.H., *p53: death star*. Cell, 2000. **103**(5): p. 691-4.
150. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
151. Linzer, D.I. and A.J. Levine, *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell, 1979. **17**(1): p. 43-52.
152. DeLeo, A.B., et al., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(5): p. 2420-4.
153. Harris, C.C., *p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment*. Science, 1993. **262**(5142): p. 1980-1.
154. Soussi, T. and C. Beroud, *Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 233-40.
155. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
156. Courtois, S., C.C. de Fromental, and P. Hainaut, *p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms*. Oncogene, 2004. **23**(3): p. 631-8.
157. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000919.
158. Michael, D. and M. Oren, *The p53 and Mdm2 families in cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 53-9.
159. Michael, D. and M. Oren, *The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(1): p. 49-58.
160. Marine, J.C., et al., *Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 927-34.
161. Grossman, S.R., *p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2773-8.
162. Teufel, D.P., et al., *Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7009-14.
163. Feng, H., et al., *Structural basis for p300 Taz2-p53 TAD1 binding and modulation by phosphorylation*. Structure, 2009. **17**(2): p. 202-10.

164. Walker, K.K. and A.J. Levine, *Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15335-40.
165. Muller-Tiemann, B.F., T.D. Halazonetis, and J.J. Elting, *Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6079-84.
166. Baptiste, N., et al., *The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells*. Oncogene, 2002. **21**(1): p. 9-21.
167. Sakamuro, D., et al., *The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest*. Oncogene, 1997. **15**(8): p. 887-98.
168. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1010-4.
169. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science, 1994. **265**(5170): p. 346-55.
170. Hainaut, P. and K. Wiman, *25 Years of p53 Research*. 2005. 448.
171. Brosh, R. and V. Rotter, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 701-13.
172. Nicholls, C.D., et al., *Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12937-45.
173. Prives, C. and J.L. Manley, *Why is p53 acetylated?* Cell, 2001. **107**(7): p. 815-8.
174. Stommel, J.M., et al., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1660-72.
175. Geyer, R.K., Z.K. Yu, and C.G. Maki, *The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 569-73.
176. Shaulsky, G., et al., *Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(12): p. 6565-77.
177. Hainaut, P. and M. Hollstein, *p53 and human cancer: the first ten thousand mutations*. Adv Cancer Res, 2000. **77**: p. 81-137.

178. Petitjean, A., et al., *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database*. Hum Mutat, 2007. **28**(6): p. 622-9.
179. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis*. J Nippon Med Sch, 2006. **73**(2): p. 54-64.
180. Hsiao, M., et al., *Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness*. Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 702-14.
181. Wolf, D., N. Harris, and V. Rotter, *Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene*. Cell, 1984. **38**(1): p. 119-26.
182. Oren, M. and V. Rotter, *Mutant p53 gain-of-function in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a001107.
183. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
184. Sengupta, S. and C.C. Harris, *p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 44-55.
185. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
186. Bourdon, J.C., et al., *Further characterisation of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for trans-activation by p53*. Oncogene, 1997. **14**(1): p. 85-94.
187. Riley, T., et al., *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 402-12.
188. Bennett, M., et al., *Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis*. Science, 1998. **282**(5387): p. 290-3.
189. El-Deiry, W.S., *The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7486-95.
190. Suzuki, K. and H. Matsubara, *Recent advances in p53 research and cancer treatment*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 978312.
191. Webster, G.A. and N.D. Perkins, *Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3485-95.

192. Raman, V., et al., *Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 974-8.
193. Fu, L., M.D. Minden, and S. Benchimol, *Translational regulation of human p53 gene expression*. EMBO J, 1996. **15**(16): p. 4392-401.
194. Grossman, S.R., et al., *Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300*. Science, 2003. **300**(5617): p. 342-4.
195. Leng, R.P., et al., *Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation*. Cell, 2003. **112**(6): p. 779-91.
196. Dornan, D., et al., *The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 86-92.
197. Amano, T., et al., *Simultaneous phosphorylation of p53 at serine 15 and 20 induces apoptosis in human glioma cells by increasing expression of pro-apoptotic genes*. J Neurooncol, 2009. **92**(3): p. 357-71.
198. Lahav, G., et al., *Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 147-50.
199. Kang, K.B., et al., *Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 66.
200. Ouyang, G., et al., *Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways*. Cell Biol Int, 2009. **33**(12): p. 1237-44.
201. Giono, L.E. and J.J. Manfredi, *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. J Cell Physiol, 2006. **209**(1): p. 13-20.
202. Cazzalini, O., et al., *Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 12-20.
203. Liu, S., W.R. Bishop, and M. Liu, *Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy*. Drug Resist Updat, 2003. **6**(4): p. 183-95.
204. Suzuki, A., et al., *Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP*. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 931-9.
205. Taylor, W.R. and G.R. Stark, *Regulation of the G2/M transition by p53*. Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1803-15.



206. Adimoolam, S. and J.M. Ford, *p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(9): p. 947-54.
207. Wang, X.W., et al., *p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity*. Nat Genet, 1995. **10**(2): p. 188-95.
208. Sengupta, S., et al., *BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination*. EMBO J, 2003. **22**(5): p. 1210-22.
209. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-40.
210. Nakajima, W. and N. Tanaka, *Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma*. J Nihon Med Sch, 2007. **74**(2): p. 148-57.
211. Tobiume, K., *Involvement of Bcl-2 family proteins in p53-induced apoptosis*. J Nihon Med Sch, 2005. **72**(4): p. 192-3.
212. Kannan, K., et al., *DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1*. Oncogene, 2001. **20**(26): p. 3449-55.
213. Wu, G.S., K. Kim, and W.S. el-Deiry, *KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death*. Adv Exp Med Biol, 2000. **465**: p. 143-51.
214. Liu, X., et al., *p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5078-83.
215. Martin, L.J., K. Chen, and Z. Liu, *Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation*. J Neurosci, 2005. **25**(27): p. 6449-59.
216. Hoffman, W.H., et al., *Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3247-57.
217. Perfettini, J.L., R.T. Kroemer, and G. Kroemer, *Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 386-8.
218. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.

219. Shono, T., et al., *Apoptosis induced by adenovirus-mediated p53 gene transfer in human glioma correlates with site-specific phosphorylation*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 1069-76.
220. Oda, K., et al., *p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53*. Cell, 2000. **102**(6): p. 849-62.
221. Christophorou, M.A., et al., *The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 214-7.
222. Louis, D.N., *The p53 gene and protein in human brain tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(1): p. 11-21.
223. Frankel, R.H., et al., *p53 mutations in human malignant gliomas: comparison of loss of heterozygosity with mutation frequency*. Cancer Res, 1992. **52**(6): p. 1427-33.
224. Watanabe, K., et al., *Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(4): p. 523-30.
225. Reifenberger, G., et al., *Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2736-9.
226. Hulleman, E. and K. Helin, *Molecular mechanisms in gliomagenesis*. Adv Cancer Res, 2005. **94**: p. 1-27.
227. Rainov, N.G., et al., *Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival*. J Neurooncol, 1997. **35**(1): p. 13-28.
228. Korkolopoulou, P., et al., *MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor*. Br J Cancer, 1997. **75**(9): p. 1269-78.
229. Schmitt, C.A., et al., *Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo*. Cancer Cell, 2002. **1**(3): p. 289-98.
230. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
231. Chen, Z., et al., *A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(3): p. 847-54.

232. Scott, F.L., et al., *XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs*. EMBO J, 2005. **24**(3): p. 645-55.
233. Hiscutt, E.L., et al., *Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein to increase the efficacy of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis for melanoma therapy*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(9): p. 2250-8.
234. Wilkinson, J.C., et al., *Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7003-14.
235. Berezovskaya, O., et al., *Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2378-86.
236. Tong, Q.S., et al., *Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(5): p. 509-14.
237. Ma, J.J., B.L. Chen, and X.Y. Xin, *XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. **146**(2): p. 222-6.
238. Sasaki, H., et al., *Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5659-66.
239. Holcik, M., et al., *Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death*. Oncogene, 2000. **19**(36): p. 4174-7.
240. Chawla-Sarkar, M., et al., *Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2004. **11**(8): p. 915-23.
241. McManus, D.C., et al., *Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics*. Oncogene, 2004. **23**(49): p. 8105-17.
242. Shrikhande, S.V., et al., *Silencing of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) decreases gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells*. Anticancer Res, 2006. **26**(5A): p. 3265-73.

243. Harlin, H., et al., *Characterization of XIAP-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3604-8.
244. Levkau, B., et al., *xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells*. Circ Res, 2001. **88**(3): p. 282-90.
245. Kojima, K., et al., *Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML*. Cell Cycle, 2006. **5**(23): p. 2778-86.
246. Zhang, Y., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis*. Oncogene, 1999. **18**(5): p. 1131-8.
247. Mohapatra, S., et al., *Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7717-23.
248. Tun, C., et al., *Activation of the extrinsic caspase pathway in cultured cortical neurons requires p53-mediated down-regulation of the X-linked inhibitor of apoptosis protein to induce apoptosis*. J Neurochem, 2007. **102**(4): p. 1206-19.
249. Vaughn, A.E. and M. Deshmukh, *Essential postmitochondrial function of p53 uncovered in DNA damage-induced apoptosis in neurons*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 973-81.
250. Carter, B.Z., et al., *Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML*. Blood, 2009.
251. Hou, L.C., et al., *Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options*. Neurosurg Focus, 2006. **20**(4): p. E5.
252. Sathornsumetee, S., et al., *Molecularly targeted therapy for malignant glioma*. Cancer, 2007. **110**(1): p. 13-24.
253. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
254. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.

255. Gaviani, P., et al., *Rechallenge with temozolomide in recurrent glioma*. *Neurol Sci*, 2011. **32 Suppl 2**: p. S247-9.
256. Wick, W., M. Platten, and M. Weller, *New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma*. *Neuro Oncol*, 2009. **11**(1): p. 69-79.
257. Roos, W.P., et al., *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine*. *Oncogene*, 2007. **26**(2): p. 186-97.
258. Sathornsumetee, S. and J.N. Rich, *Molecularly targeted therapy in neuro-oncology*. *Handb Clin Neurol*, 2012. **104**: p. 255-78.
259. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
260. Quinn, J.A., et al., *Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1262-7.
261. Stupp, R., et al., *High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2010. **21 Suppl 5**: p. v190-3.
262. Nagpal, S., *The role of BCNU polymer wafers (Gliadel) in the treatment of malignant glioma*. *Neurosurg Clin N Am*, 2012. **23**(2): p. 289-95, ix.
263. Rosenthal, M.A., D.L. Ashley, and L. Cher, *BCNU as second line therapy for recurrent high-grade glioma previously treated with Temozolomide*. *J Clin Neurosci*, 2004. **11**(4): p. 374-5.
264. Westphal, M., et al., *Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2006. **148**(3): p. 269-75; discussion 275.
265. Mason, W.P. and J.G. Cairncross, *Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma--impact of a recent trial*. *Nat Clin Pract Neurol*, 2005. **1**(2): p. 88-95.
266. Tisdale, M.J., *Antitumour imidazotetrazines--XI: Effect of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one [CCRG 81045; M and B 39831 NSC 362856] on poly(ADP-ribose) metabolism*. *Br J Cancer*, 1985. **52**(5): p. 789-92.

267. Asai, A., [*Gene therapy for brain tumors: induction of apoptosis and immunogenic modulation in glioma cells (series 5)*]. No Shinkei Geka, 1995. **23**(1): p. 7-15.
268. Chandrashekhar, Y. and S. Sen, *Gene therapy and pharmaceutical modulation of apoptosis*. Cardiol Clin, 2001. **19**(1): p. 173-90, x.
269. Coll, J.L., [*Biology of bronchial cancer. Therapeutic modalities of the future. Apoptosis and gene therapy*]. Rev Mal Respir, 1999. **16 Suppl 3**: p. S17-8.
270. Shinoura, N., et al., *Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implications for gene therapy*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(14): p. 1983-93.
271. Shinoura, N. and H. Hamada, *Gene therapy using an adenovirus vector for apoptosis-related genes is a highly effective therapeutic modality for killing glioma cells*. Curr Gene Ther, 2003. **3**(2): p. 147-53.
272. Kurozumi, K., et al., *Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus*. J Neurooncol, 2004. **66**(1-2): p. 117-27.
273. Hattori, Y., *Development of non-viral vector for cancer gene therapy*. Yakugaku Zasshi, 2010. **130**(7): p. 917-23.
274. Lu, Y. and C.O. Madu, *Viral-based gene delivery and regulated gene expression for targeted cancer therapy*. Expert Opin Drug Deliv, 2010. **7**(1): p. 19-35.
275. Jia, W. and Q. Zhou, *Viral vectors for cancer gene therapy: viral dissemination and tumor targeting*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(1): p. 133-42.
276. Kastan, M.B., *Wild-type p53: tumors can't stand it*. Cell, 2007. **128**(5): p. 837-40.
277. Badie, B., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene delivery inhibits 9L glioma growth in rats*. Neurol Res, 1995. **17**(3): p. 209-16.
278. Roth, J.A., *Adenovirus p53 gene therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(1): p. 55-61.
279. Lang, F.F., et al., *Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results*. J Clin Oncol, 2003. **21**(13): p. 2508-18.
280. Lang, F.F., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human gliomas*. Neurosurgery, 1999. **45**(5): p. 1093-104.

281. Gomez-Manzano, C., et al., *Characterization of p53 and p21 functional interactions in glioma cells en route to apoptosis*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(14): p. 1036-44.
282. Cerrato, J.A., W.K. Yung, and T.J. Liu, *Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis*. Neuro Oncol, 2001. **3**(2): p. 113-22.
283. Gomez-Manzano, C., et al., *Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis*. Cancer Res, 1996. **56**(4): p. 694-9.
284. Lang, F.F., et al., *Enhancement of radiosensitivity of wild-type p53 human glioma cells by adenovirus-mediated delivery of the p53 gene*. J Neurosurg, 1998. **89**(1): p. 125-32.
285. Colletier, P.J., et al., *Adenoviral-mediated p53 transgene expression sensitizes both wild-type and null p53 prostate cancer cells in vitro to radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **48**(5): p. 1507-12.
286. Kawabe, S., et al., *Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts*. Int J Radiat Biol, 2001. **77**(2): p. 185-94.
287. Bilim, V., et al., *Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro*. Int J Cancer, 2003. **103**(1): p. 29-37.
288. Lacasse, E.C., et al., *Application of XIAP antisense to cancer and other proliferative disorders: development of AEG35156/ GEM640*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1058**: p. 215-34.
289. Cummings, J., et al., *Validation of pharmacodynamic assays to evaluate the clinical efficacy of an antisense compound (AEG 35156) targeted to the X-linked inhibitor of apoptosis protein XIAP*. Br J Cancer, 2005. **92**(3): p. 532-8.
290. Naumann, U., et al., *Adenoviral expression of XIAP antisense RNA induces apoptosis in glioma cells and suppresses the growth of xenografts in nude mice*. Gene Ther, 2007. **14**(2): p. 147-61.
291. Mahadevan, D., et al., *Phase I Trial of AEG35156 an Antisense Oligonucleotide to XIAP Plus Gemcitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Am J Clin Oncol, 2012.

292. Ohgaki, H., *Epidemiology of brain tumors*. Methods Mol Biol, 2009. **472**: p. 323-42.
293. Aoki, T., N. Hashimoto, and M. Matsutani, *Management of glioblastoma*. Expert Opin Pharmacother, 2007. **8**(18): p. 3133-46.
294. Soffiatti, R., B. Leoncini, and R. Ruda, *New developments in the treatment of malignant gliomas*. Expert Rev Neurother, 2007. **7**(10): p. 1313-26.
295. Lesniak, M.S., R. Langer, and H. Brem, *Drug delivery to tumors of the central nervous system*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2001. **1**(3): p. 210-6.
296. Nakagawa, T., et al., *The combined effects of multiple chemotherapeutic agents for malignant glioma cells*. J Neurooncol, 2007. **84**(1): p. 31-7.
297. Kyritsis, A.P., et al., *Temozolomide and resistant glioma cells*. J Neurosurg, 2008. **108**(1): p. 197; author reply 197-8.
298. Franco-Hernandez, C., V. Martinez-Glez, and J.A. Rey, *[Biology molecular of glioblastomas]*. Neurocirugia (Astur), 2007. **18**(5): p. 373-82.
299. Dittmer, D., et al., *Gain of function mutations in p53*. Nat Genet, 1993. **4**(1): p. 42-6.
300. Kim, E.H., et al., *Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 446-56.
301. Cirielli, C., et al., *Adenovirus-mediated wild-type p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of experimental intracranial human malignant glioma*. J Neurooncol, 1999. **43**(2): p. 99-108.
302. Carter, B.Z., et al., *Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML*. Blood, 2010. **115**(2): p. 306-14.
303. Janicke, R.U., D. Sohn, and K. Schulze-Osthoff, *The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 959-76.
304. Luu, Y., et al., *The p53 stabilizing compound CP-31398 induces apoptosis by activating the intrinsic Bax/mitochondrial/caspase-9 pathway*. Exp Cell Res, 2002. **276**(2): p. 214-22.
305. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 621-32.
306. Heiss, E.H., Y.D. Schilder, and V.M. Dirsch, *Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-*



- dependent senescence in p53-positive cancer cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 26759-66.
307. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.* EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
308. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.* Cell, 2005. **122**(6): p. 927-39.
309. Jiang, H., et al., *Autophagy pathways in glioblastoma.* Methods Enzymol, 2009. **453**: p. 273-86.
310. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes.* Autophagy, 2008. **4**(2): p. 151-75.
311. Zamin, L.L., et al., *Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway.* Neurobiol Dis, 2006. **24**(1): p. 170-82.
312. Peterson, G.L., *Determination of total protein.* Methods Enzymol, 1983. **91**: p. 95-119.
313. Ruckert, F., et al., *Simultaneous gene silencing of Bcl-2, XIAP and Survivin re-sensitizes pancreatic cancer cells towards apoptosis.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 379.
314. Liu, X., et al., *Gene-viro-therapy targeting liver cancer by a dual-regulated oncolytic adenoviral vector harboring IL-24 and TRAIL.* Cancer Gene Ther, 2012. **19**(1): p. 49-57.
315. Sun, W., et al., *[Combined gene therapy for murine liver cancer with interleukin-18 and cytosine deaminase genes].* Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2001. **9**(5): p. 300-2.
316. Huang, X., et al., *Combined TRAIL and Bax gene therapy prolonged survival in mice with ovarian cancer xenograft.* Gene Ther, 2002. **9**(20): p. 1379-86.
317. Chen, B., et al., *Evaluation of combined vaccinia virus-mediated antitumor gene therapy with p53, IL-2, and IL-12 in a glioma model.* Cancer Gene Ther, 2000. **7**(11): p. 1437-47.
318. Dupont, S., et al., *Convergence of p53 and TGF-beta signaling networks.* Cancer Lett, 2004. **213**(2): p. 129-38.

319. Chen, Y.Z., et al., [New insight into the mechanism of p53 inducing leukemia cell apoptosis]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2003. **24**(12): p. 640-3.
320. Robson, C.N., et al., *Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium*. *J Endocrinol*, 1999. **160**(2): p. 257-66.
321. Chao, C., et al., *Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression*. *EMBO J*, 2006. **25**(11): p. 2615-22.
322. Chehab, N.H., et al., *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(24): p. 13777-82.
323. Unger, T., et al., *Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity*. *Oncogene*, 1999. **18**(21): p. 3205-12.
324. Mumby, M., *PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 21-4.
325. Moule, M.G., et al., *Role for PP2A in ARF signaling to p53*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(39): p. 14063-6.
326. Rumble, J.M. and C.S. Duckett, *Diverse functions within the IAP family*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 21): p. 3505-7.
327. Shin, S., et al., *An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7*. *Biochemistry*, 2001. **40**(4): p. 1117-23.
328. Bizzarri, M., et al., *Melatonin and vitamin D3 increase TGF-beta1 release and induce growth inhibition in breast cancer cell cultures*. *J Surg Res*, 2003. **110**(2): p. 332-7.
329. Mirza, A., et al., *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway*. *Oncogene*, 2002. **21**(17): p. 2613-22.
330. Zhou, M., et al., *DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(1): p. 124-31.
331. Villalonga-Planells, R., et al., *Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18588.
332. Yi, J. and J. Luo, *SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(8): p. 1684-9.

333. Kang, J.Y., et al., *The p53-p21(Cip1/WAF1) pathway is necessary for cellular senescence induced by the inhibition of protein kinase CKII in human colon cancer cells*. Mol Cells, 2009. **28**(5): p. 489-94.
334. Maiuri, M.C., et al., *Autophagy regulation by p53*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 181-5.
335. Tasdemir, E., et al., *A dual role of p53 in the control of autophagy*. Autophagy, 2008. **4**(6): p. 810-4.
336. Morselli, E., et al., *Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy*. Cell Cycle, 2008. **7**(19): p. 3056-61.
337. Tasdemir, E., et al., *Regulation of autophagy by cytoplasmic p53*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 676-87.
338. Yee, K.S., et al., *PUMA- and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis*. Cell Death Differ, 2009. **16**(8): p. 1135-45.
339. Feng, Z., et al., *The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3043-53.
340. Harrison, B., et al., *DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9999-10014.
341. Martoriati, A., et al., *dapk1, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1461-6.
342. Budanov, A.V. and M. Karin, *p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling*. Cell, 2008. **134**(3): p. 451-60.
343. Maiuri, M.C., et al., *Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2*. Cell Cycle, 2009. **8**(10): p. 1571-6.
344. Eby, K.G., et al., *ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 95.
345. Erlich, S., et al., *Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 561-8.
346. Maiuri, M.C., et al., *BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L)*. Autophagy, 2007. **3**(4): p. 374-6.

347. Kirkin, V., S. Joos, and M. Zornig, *The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1644**(2-3): p. 229-49.
348. Crighton, D., S. Wilkinson, and K.M. Ryan, *DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death*. *Autophagy*, 2007. **3**(1): p. 72-4.
349. Ryan, K.M., *p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(1): p. 44-50.
350. Schimmer, A.D., et al., *Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(28): p. 4741-6.