

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

Rafael Paschoal de Campos

**Identificação de variantes de *splicing* de *ENTPD5* e seus impactos na
sobrevida de pacientes com câncer**

Porto Alegre
Setembro de 2020

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

Rafael Paschoal de Campos

**Identificação de variantes de *splicing* de *ENTPD5* e seus impactos na
sobrevida de pacientes com câncer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz
Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Rosângela Wink

Porto Alegre
Setembro de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

de Campos, Rafael Paschoal
Identificação de variantes de splicing de ENTPD5 e
seus impactos na sobrevivência de pacientes com câncer /
Rafael Paschoal de Campos. -- 2020.

74 f.

Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Márcia Rosângela Wink.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. ENTPD5. 2. NTPDase5. 3. splicing alternativo. 4.
variantes de transcrição. I. Lenz, Guido, orient. II.
Wink, Márcia Rosângela, coorient. III. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo e amor incondicional.

Aos meus amigos, pelo apoio e parceria na minha caminhada.

Aos professores, técnicos e demais colaboradores desta universidade pelo suporte a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular, pela parceria e torcida.

Aos colegas do LabSinal, pelo acolhimento e pelos ótimos momentos.

À Prof. Márcia, por ter me aberto as portas da ciência e me inspirado tanto nesses quase sete anos de orientação.

Ao Prof. Guido, por constantemente me desafiar e também me inspirar como acadêmico e indivíduo.

Às agências de fomento CNPq e Capes pelo financiamento.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

- ARTHUR SCHOPENHAUER, 1851

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Ectonucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolase 5 (NTPDase5).....	13
1.1.1	Características bioquímicas e localização celular	14
1.1.2	Regulação da expressão.....	15
1.1.3	NTPDase5 como um proto-oncogene	17
1.1.4	NTPDase5 e a reglicosilação de proteínas	17
1.1.5	NTPDase5 e metabolismo.....	20
1.1.6	NTPDase5 em outros mecanismos	22
1.1.7	NTPDase5 em câncer	23
1.2	Splicing	25
1.2.1	Splicing alternativo	26
1.2.2	Regulação do splicing alternativo	28
1.3	Banco de dados The Cancer Genome Atlas.....	29
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	ARTIGO.....	31
4	DISCUSSÃO GERAL	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

3' UTR	3' untranslated region, região não-traduzida 3'
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4e-binding protein 1
5' UTR	5' untranslated region, região não-traduzida 5'
AA	alternative acceptor
ACR	apyrase conserved region
ADP	adenosina difosfato
AK1	adenylate kinase 1
AKT	akt serine/threonine kinase 1
AMP	adenosina monofosfato
AT	alternative terminator
ATP	adenosina trifosfato
Bcl-2	bcl2, apoptosis regulator
BLCA	bladder urothelial carcinoma
BRCA	breast invasive carcinoma
CDS	coding sequence
CELF	cugbp elav-like family
CMPK1	cytidine/uridine monophosphate kinase 1
COAD	colon adenocarcinoma
COQ6	coenzyme q6 monooxygenase
CR	conserved region
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4e
ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
ERK1	extracellular signal-regulated kinase 1
ES	exon skipping
FoxO	forkhead box
GBM	glioblastoma
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HNSC	head and neck squamous cell carcinoma
HR	hazard ratio
HRD1	erad-associated e3 ubiquitin-protein ligase
JNK	c-jun n-terminal kinase
KIRC	kidney renal clear cell carcinoma
LGG	lower grade glioma
LIHC	liver hepatocellular carcinoma
LUAD	lung adenocarcinoma
LUSC	lung squamous cell carcinoma
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1
mt-pcph	mutated proto-oncogen carcinogenic progression of hamster

NOVA nova alternative splicing regulator
NTPDase5 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
OV ovarian serous cystadenocarcinoma
p53 tumor protein p53
PAAD pancreatic adenocarcinoma
pcph proto-oncogen carcinogenic progression of hamster
PKC protein kinase c
PSI percent-spliced in
PTEN phosphatase and tensin homolog
RBFOX rna binding protein fox-1
RBP rna binding protein
SARC sarcoma
SKCM skin cutaneous melanoma
Sp1 specificity protein 1
SPARC secreted protein acidic and rich in cysteine
STAD stomach adenocarcinoma
TCGA The Cancer Genome Atlas
UDP uridina difosfato
UGGT udp-glucose:glycoprotein glucosyltransferase
UMP uridina monofosfato

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Mecanismos de regulação da expressão de ENTPD5/NTPDase5. ...	16
Figura 2. Esquema do papel da NTPDase5 na reglicosilação de proteínas. ...	19
Figura 3. Esquema do papel da NTPDase5 na regulação do metabolismo.....	21
Tabela 1: Resumo das alterações na expressão de <i>ENTPD5/NTPDase5</i> encontradas em tumores humanos.....	24
Figura 4. Esquema das reações de transesterificação envolvidas no processo de <i>splicing</i>	26
Figura 5. Principais eventos de <i>splicing</i> alternativo.....	28

RESUMO

NTPDase5 é uma nucleotidase do retículo endoplasmático que desempenha um importante papel na proteostase como reguladora da N-glicosilação de proteínas e também afeta indiretamente os níveis de ATP intracelular, regulando o metabolismo. Essa enzima foi identificada pela primeira vez em hamster como um proto-oncogene que é ativado após uma deleção pontual que causa uma mudança de fase de leitura e resulta em uma proteína truncada. Proteínas semelhantes em tamanho à NTPDase5 truncada de hamster foram detectadas em amostras humanas através de *western blotting* usando anti-soro contra o homólogo de hamster, mas um oncogene humano nunca foi descrito. Pesquisando variantes de transcrição no banco de dados GenBank e usando dados do TCGA (The Cancer Genome Atlas), descobrimos que *ENTPD5* tem pelo menos 13 variantes de *splicing*. Foi predito que duas delas geram proteínas truncadas que são semelhantes em tamanho à oncoproteína de hamster. Identificamos três eventos de *splicing* principais no gene *ENTPD5*: aceptores alternativos para o éxon 6, salto de éxon e terminadores alternativos. Além disso, também investigamos o impacto dos eventos de *splicing* em cânceres humanos e descobrimos que o salto do éxon 11 - o evento que leva a proteínas truncadas de tamanho semelhante ao do oncogene do hamster - não afeta a taxa de risco da maioria dos tumores e foi, na verdade, um fator de proteção nos únicos dois estudos nos quais foi significativo. Detectamos que dois principais terminadores alternativos são responsáveis pela maioria dos transcritos em cânceres humanos e que, enquanto um deles contém um importante domínio funcional conservado, a sequência do outro possui um alvo potencial para regulação negativa por miR-215. Também conseguimos identificar quatro padrões principais de impacto do *ENTPD5* na sobrevivência de pacientes com câncer. Nossos resultados lançam luz sobre uma incerteza de duas décadas sobre a origem das proteínas NTPDase5 truncadas e contribuem na caracterização dos impactos da NTPDase5 em cânceres humanos.

Palavras-chave: *ENTPD5*; NTPDase5; *splicing* alternativo; variantes da transcrição.

ABSTRACT

NTPDase5 is a nucleotidase of the endoplasmic reticulum that plays an important role in proteostasis as a regulator of protein N-glycosylation and also indirectly affects the levels of intracellular ATP, regulating the metabolism. This enzyme was first identified in hamster as a proto-oncogene that is activated upon a single nucleotide deletion that causes a frame-shift and results in a truncated protein. Proteins similar in size to the truncated hamster NTPDase5 were detected in human samples through western blotting using anti-serum against the hamster homolog, but a human oncogene was never described. Searching for transcript variants in the GenBank database and using TCGA (The Cancer Genome Atlas) data, we discovered that *ENTPD5* has at least 13 splice variants. Two of these are predicted to generate truncated proteins that are similar in size to the hamster oncoprotein. We identified three main splicing events in the *ENTPD5* gene: alternative acceptors for exon 6, exon skipping and alternative terminators. In addition, we also investigated the impact of splicing events in human cancers and found that skipping of exon 11 – the event that leads to truncated proteins similar in size to the hamster oncogene – does not affect the hazard ratio of most tumors and was, in fact, a protective factor in the only two cancer studies where it was significant. We detected that two main alternative terminators account for most transcripts in human cancers and that while one of them contains an important conserved functional domain, the sequence of the other is a potential target for negative regulation by miR-215. We also were able to identify four main patterns of impact of *ENTPD5* in the survival of cancer patients. Our findings shed light on a two-decade uncertainty about the origin of truncated NTPDase5 proteins and contribute in the characterization of the impacts of NTPDase5 in human cancers.

Keywords: *ENTPD5*; NTPDase5; alternative splicing; transcript variants.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolase 5 (NTPDase5)

A proteína ectonucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolase 5 (NTPDase5) - codificada pelo gene *ENTPD5* - é uma enzima intracelular associada à membrana do retículo endoplasmático envolvida na regulação da N-glicosilação de proteínas, dentre outras funções (FANG et al., 2010). Essa enzima foi primeiramente identificada por diferentes grupos recebendo distintas nomenclaturas. Velasco e colaboradores identificaram um oncogene em fibroblastos de embriões de hamster sírio tratados com o agente mutagênico 3-metilcolantreno que foi nomeado *cph* (*carcinogenic progression of hamster*) (VELASCO et al., 1994). Mais tarde, *cph* foi identificado como o produto de uma deleção pontual na sequência de um proto-oncogene (proto-*cph*, *pcph*) que causa uma mudança de fase de leitura e produz uma proteína truncada de 246 aminoácidos ao invés da proteína selvagem de 469 aminoácidos (VELASCO; AVILA; NOTARIO, 1999). Em estudos posteriores, homólogos do proto-oncogene foram identificados em camundongos e humanos (RECIO et al., 1999; RECIO; ZAMBRANO; NOTARIO, 2000). Concomitante a esses estudos, outro grupo identificou um novo membro da família de ectonucleotidasas através de análises de homologia com a já conhecida CD39 (*cluster of differentiation 39*) – hoje, NTPDase1 – que, diferente de seus parálogos, hidrolisava preferencialmente nucleotídeos difosfatos ao invés de trifosfatados. Esse novo membro foi identificado em camundongos e humanos e nomeado CD39L4 (CD39-like 4) (CHADWICK; FRISCHAUF, 1998). Por fim, um terceiro grupo caracterizou uma enzima nucleosídeo difosfatase residente do retículo endoplasmático que estava envolvida na hidrólise do UDP produzido durante o processo de reglicosilação de proteínas em fígado de rato e bovinos, a ER-UDPase (TROMBETTA; HELENIUS, 1999). Posteriormente, a identidade dessas proteínas foi descrita e a nomenclatura NTPDase5 passou a ser adotada (PAEZ et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001).

1.1.1 Características bioquímicas e localização celular

NTPDases são enzimas associadas a membranas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos di e trifosfatados. Em humanos, estão descritos oito membros da família de NTPDases (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Essas enzimas diferem em localização, estrutura e afinidade por substratos, mas todas compartilham cinco domínios conhecidos como regiões conservadas da apirase (ACR1-5) – encontrados desde leveduras a eucariotos superiores - e podem conservar até quatro domínios CR - comuns às NTPDases de vertebrados (KNOWLES, 2011). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na membrana celular, enquanto as NTPDases 4 e 7 são exclusivamente intracelulares e as NTPDases 5 e 6 são intracelulares e podem ser secretadas (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

O substrato preferencial da NTPDase5 é o UDP, que é convertido em UMP com a liberação de uma molécula de fosfato inorgânico. Além disso, a NTPDase5 também hidrolisa outros nucleotídeos difosfatados como GDP, CDP e ADP e os converte a seus respectivos nucleotídeos monofosfatados (FANG et al., 2010; MACCARTHY; NOTARIO, 2013). Sabe-se que a atividade enzimática das NTPDases é dependente de cátions divalentes. Diferente da maior parte das NTPDases, no entanto, a NTPDase5 apresenta maior atividade na presença de Mg^{+2} ao invés de Ca^{+2} (BECKENKAMP et al., 2014; MULERO et al., 1999). A NTPDase5 pode ser glicosilada em três sítios putativos, mas essas modificações não afetam a atividade enzimática. Além disso, dímeros de NTPDase5 foram encontrados, porém, diferente dos oligômeros de outras NTPDases, a NTPDase5 monomérica – que é a forma predominante - é a forma a mais ativa (MULERO et al., 2000).

A maior parte dos estudos envolvendo a NTPDase5 foca na sua forma intracelular associada à membrana do retículo endoplasmático. Nessa organela, a NTPDase5 tem uma pequena porção N-terminal voltada para o citoplasma (1-2), um domínio transmembrana (3-23) e a longa porção C-terminal voltada para o lúmen (24-428) contendo as cinco regiões conservadas da apirase (ACRs) e duas regiões conservadas de NTPDase (CR2 e 4), tratando-se, portanto, de uma proteína transmembrana tipo II (KNOWLES, 2011; ZIMMERMANN; ZEBISCH;

STRÄTER, 2012). No retículo endoplasmático, o principal papel da NTPDase5 é a degradação do UDP formado como produto da glicosilação de proteínas a partir de UDP-glicose (FANG et al., 2010; TROMBETTA; HELENIUS, 1999).

A NTPDase5 já foi detectada como uma enzima solúvel no meio extracelular e um sítio de clivagem putativo na porção N-terminal foi identificado (MULERO et al., 1999, 2000). De fato, a NTPDase5 também já foi encontrada no plasma humano (LIU et al., 2005) e em perfusato de cóclea de ratos (O'KEEFFE et al., 2010). A proteína solúvel supostamente atuaria na regulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos difosfatados como UDP e AMP que atuam como moléculas sinalizadoras. A co-localização da NTPDase5 com receptores P2Y responsivos a UDP corrobora com essa hipótese (O'KEEFFE et al., 2010).

1.1.2 Regulação da expressão

Estudos já indicaram diferentes mecanismos de regulação da expressão de *ENTPD5*/NTPDase5 a nível transcricional (FANG et al., 2010; VOGIATZI et al., 2016), de estabilidade do mRNA (KHORASANI et al., 2019; PERILLI et al., 2014; PIZZINI et al., 2013), traducional (WALSH et al., 2014) e pós-traducional (WEI et al., 2018). A figura 1 resume os principais achados.

A nível transcricional, a regulação da expressão de *ENTPD5* dependente de AKT pode acontecer via inibição do fator de transcrição FoxO que por sua vez inibe a transcrição a partir do promotor de *ENTPD5*. A expressão de *ENTPD5* favorece a produção de proteínas glicosiladas como receptores tirosina-cinase que ativam AKT, portanto há uma retroalimentação positiva no eixo AKT-FoxO-NTPDase5 que é particularmente relevante em tumores PTEN-negativos (FANG et al., 2010). Outro mecanismo já descrito envolve variantes de p53 com ganho de função que passam a interagir com alvos distintos da p53 selvagem. Um deles é o fator de transcrição Sp1 que ativa o promotor da *ENTPD5* quando ancorado por variantes de p53 (VOGIATZI et al., 2016). Em camundongo, uma potencial regulação do fator de transcrição Nrf2 foi identificada através de alterações nos níveis de mRNA e proteína da NTPDase5 (OKAWA et al., 2006; WALSH et al., 2014, p. 2).

A nível traducional, outro mecanismo de regulação envolvendo AKT inclui a ativação de mTORC1 e subsequente fosforilação de 4EBP1 para impedir que esse

sequestre eIF4E que atua como fator de iniciação da tradução (WANG et al., 2015). Ainda que eIF4E seja geralmente considerado um regulador global da tradução, evidências indicam que esse iniciador contribui para tumorigênese através da regulação de proteínas específicas (CARROLL; BORDEN, 2013; HUA et al., 2019). Dessa forma, AKT parece estimular a expressão de NTPDase5 tanto a nível transcricional como transducional.

HRD1 é uma enzima ubiquitina ligase E3 associada ao retículo endoplasmático que catalisa a ubiquitinação de proteínas a serem degradadas pela via proteossomal e/ou lipossomal. Essa proteína interage diretamente com a NTPDase5 causando sua ubiquitinação e subsequente degradação juntamente com outras proteínas envolvidas na regulação metabólica hepática (WEI et al., 2018). Por fim, os microRNAs miR-143-5p e miR-182 foram identificados como reguladores negativos dos níveis de *ENTPD5* em tumores de próstata e cólon, respectivamente (KHORASANI et al., 2019; PERILLI et al., 2014; PIZZINI et al., 2013).

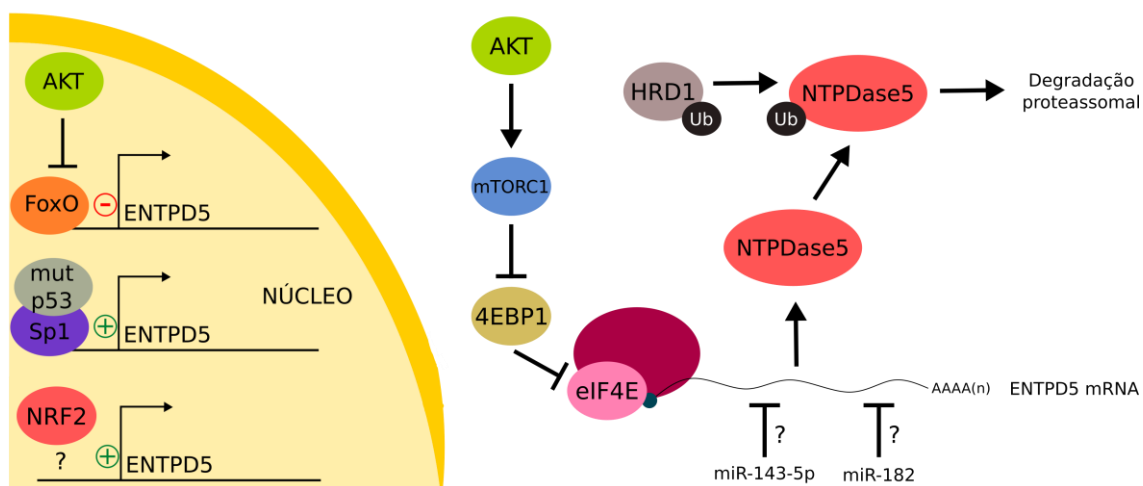


Figura 1. Mecanismos de regulação da expressão de ENTPD5/NTPDase5. A nível transcricional, o gene *ENTPD5* é regulado negativamente pelo fator de transcrição FoxO, que é inibido por AKT. Além disso, *ENTPD5* pode ser regulado positivamente por variantes de p53 (mut p53) ancorados a Sp1, e por NRF2 através de um mecanismo ainda não esclarecido. Estudos genômicos sugerem que miR-143-5p e miR-182 possam atuar na regulação negativa dos níveis de mRNA de *ENTPD5*. A nível traducional, AKT ativa o complexo mTORC1 que por sua vez inibe 4EBP1, um inibidor do fator de tradução eIF4E, possibilitando a tradução da proteína NTPDase5. A nível pós-traducional,

a NTPDase5 pode ser ubiquitinada pela HRD1, o que a encaminha para degradação proteossomal.
(Do autor)

1.1.3 NTPDase5 como um proto-oncogene

Uma deleção pontual no gene da NTPDase5 de hamster sírio causa uma mudança de fase de leitura que produz uma proteína oncogênica truncada conhecida como mt-PCPH. Essa proteína truncada possui 27kDa e difere da NTPDase5 selvagem tanto na massa atômica – a selvagem tem 47kDa – como na capacidade de causar a ativação sustentada de ERK1, contribuindo para a transformação maligna por estimular a proliferação celular (RECIO et al., 2000).

Variações equivalentes no gene da NTPDase5 humana não foram descritas até o momento, porém proteínas de tamanho similar ao mt-PCPH foram detectadas por *Western blotting* em tecidos humanos usando anticorpo contra a proteína de hamster (ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001). De maneira controversa, muitos autores consideraram a presença de proteínas humanas e de hamster de tamanho similar como evidência de que a NTPDase5 também seja um proto-oncogene em humanos. Estudos subsequentes foram realizados expressando o oncogene de hamster a fim de caracterizar o papel de proteínas truncadas de NTPDase5 na tumorigênese humana. Nesses trabalhos, o mt-PCPH parece ter efeitos similares a proteína NTPDase5 selvagem mas com intensidade maior (TIRADO et al., 2003; VILLAR et al., 2009). No entanto, é crucial ressaltar que esses estudos se basearam na expressão heteróloga do mt-PCPH de hamster e não há estudos funcionais das variantes da NTPDase5 endógena encontradas em células humanas. Assim, a origem e significado biológico dos peptídeos truncados de NTPDase5 em humanos ainda é desconhecido.

1.1.4 NTPDase5 e a reglicosilação de proteínas

Glicosilação de proteínas é um dos mais importantes mecanismos co- e pós-traducionais. Estima-se que mais da metade das proteínas é glicosilada, principalmente proteínas de membrana celular como proteínas de adesão e receptores de crescimento. O mecanismo mais comum de glicosilação é a N-

glicosilação que se inicia no retículo endoplasmático a partir da transferência de um oligossacarídeo complexo a um resíduo de asparagina da proteína nascente (KRIŠTIĆ; LAUC, 2017). Em seguida, glicosidases clivam o oligossacarídeo, constituindo um receptor para que chaperonas auxiliem no dobramento da proteína. A remoção do resíduo de glicose pela glicosidase II culmina no transporte da proteína dobrada para o complexo de Golgi onde ocorre a maturação de N-glicanos (FANG et al., 2010). No entanto, a permanência de resíduos hidrofóbicos expostos na superfície da proteína nascente é reconhecida pela UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase) como um indicativo de dobramento inadequado, desencadeando a retenção da proteína no retículo endoplasmático e a transferência de uma molécula de glicose para a proteína mal-dobrada a partir de UDP-glicose – portanto, reglicosilação – a fim de encaminhá-la para uma nova tentativa de dobramento mediada por chaperonas (Figura 2) (IZUMI et al., 2017).

O UDP liberado como produto da clivagem de UDP-glicose é substrato para NTPDase5 que o converte a UMP para que seja transportado para fora do retículo endoplasmático em mecanismo de antiporte com UDP-glicose. Tal mecanismo é essencial para equilibrar a sublocalização celular de nucleotídeos de uridina e permitir a reciclagem do UMP que pode ser usado para produção de novas moléculas de UDP-glicose a partir de refosforilação e transferência de glicose-1-P (FANG et al., 2010). Além disso, a remoção de UDP do lúmen do retículo endoplasmático é importante pois esse inibe a atividade da UGGT (TROMBETTA; HELENIUS, 1999).

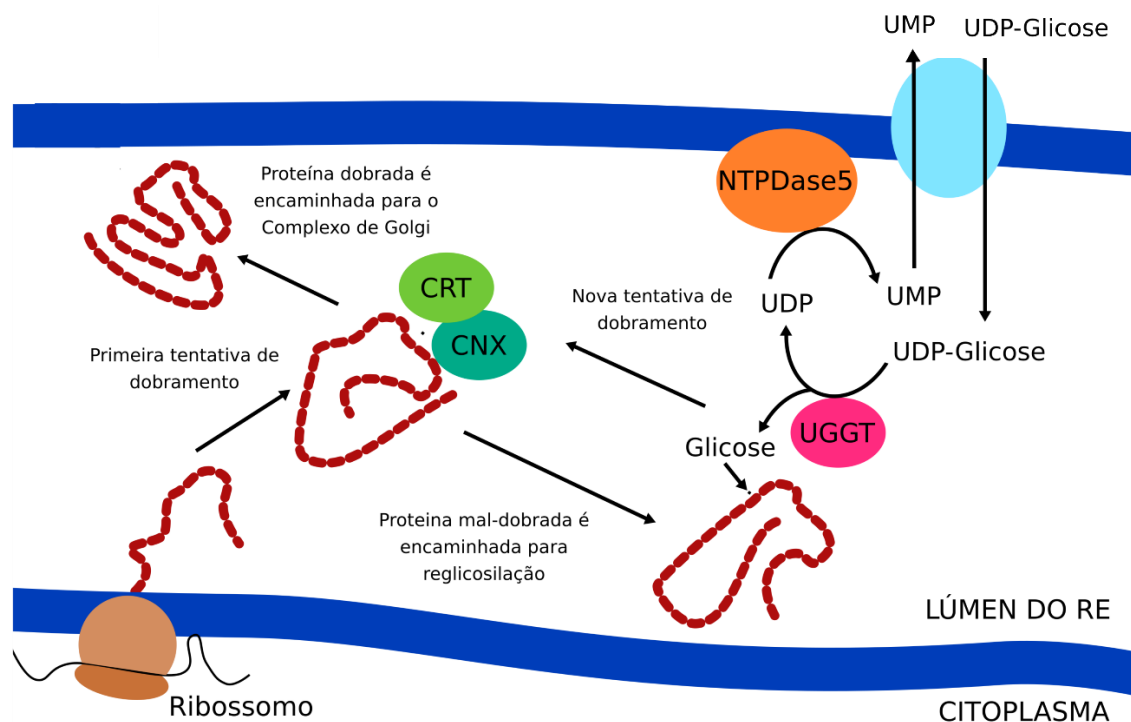


Figura 2. Esquema do papel da NTPDase5 na reglicosilação de proteínas. A NTPDase5 está associada a membrana do retículo endoplasmático (RE) com seu sítio catalítico voltado para o lúmen. Lá, essa enzima hidroliza o UDP produzido a partir da reglicosilação de proteínas mal-dobradas mediada pela UGGT a partir de UDP-glicose. O UMP produzido como resultado sai do RE em mecanismo de antiporte com UDP-glicose. (Do autor)

Em concordância, o silenciamento da NTPDase5 leva à secreção de proteínas mal-dobradas, retenção de proteínas no retículo endoplasmático e/ou degradação precoce de proteínas, induzindo estresse no retículo endoplasmático que pode levar a célula a apoptose ou ao desenvolvimento de respostas adaptativas (FANG et al., 2010; GWAK et al., 2016; VOGIATZI et al., 2016). Dessa forma, não surpreende que em muitos tumores a NTPDase5 está altamente expressa para aumentar a capacidade de processamento do retículo endoplasmático frente a alta demanda proteica de células proliferativas e garantir o dobramento adequado de diversas proteínas glicosiladas, principalmente receptores tirosina-cinase e integrinas envolvidas na proliferação, invasão e metástase de células tumorais (FANG et al., 2010; SHEN; HUANG; FANG, 2011; VOGIATZI et al., 2016).

1.1.5 NTPDase5 e metabolismo

Células altamente proliferativas como células tumorais e células-tronco embrionárias compartilham um desvio do metabolismo celular para o anabolismo. Nessas condições, as células optam por favorecer processos de síntese de biomoléculas e de acúmulo de biomassa em detrimento da eficiência energética máxima buscada por células quiescentes (RODRIGUES; PEREIRA; RAMALHO-SANTOS, 2020). O efeito Warburg é um dos mais clássicos mecanismos de desvio metabólico, sendo definido como o aumento no catabolismo da glicose pela via anaeróbica mesmo em presença de oxigênio (BAYLEY; DEVILEE, 2012). Esse desvio no metabolismo glicolítico, apesar de ser menos favorável do ponto de vista energético do que a fosforilação oxidativa, é importante por aumentar a disponibilidade de intermediários da glicólise. Esses podem ser desviados para o anabolismo, garantindo a produção de nucleotídeos, aminoácidos e outras moléculas indispensáveis a progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Apesar da atividade enzimática ATPásica ser uma das características mais bem conhecidas da família das NTPDases, a NTPDase5 tem preferência por nucleotídeos difosfatados e não é capaz de hidrolisar ATP em níveis consideráveis. No entanto, essa enzima participa de um ciclo de transferência de fosfatos de alta energia entre o retículo endoplasmático e o citoplasma que consome ATP (FANG et al., 2010; MULERO et al., 1999). Nesse ciclo, a NTPDase5 no lúmen do retículo endoplasmático converte UDP em UMP que é então transportado para o citoplasma em antiporte com UDP-glicose. No citoplasma, o UMP é fosforilado a UDP pela CMPK1 com gasto de ATP e produção de ADP. A subsequente fosforilação do UDP a UTP também ocorre com gasto de ATP e produção de ADP. Duas moléculas de ADP são substrato para a AK1 produzir uma molécula de ATP e uma molécula de AMP. Como resultado do ciclo ENTPD5/CMPK1/AK1, há conversão líquida de ATP em AMP (FANG et al., 2010; SHEN; HUANG; FANG, 2011).

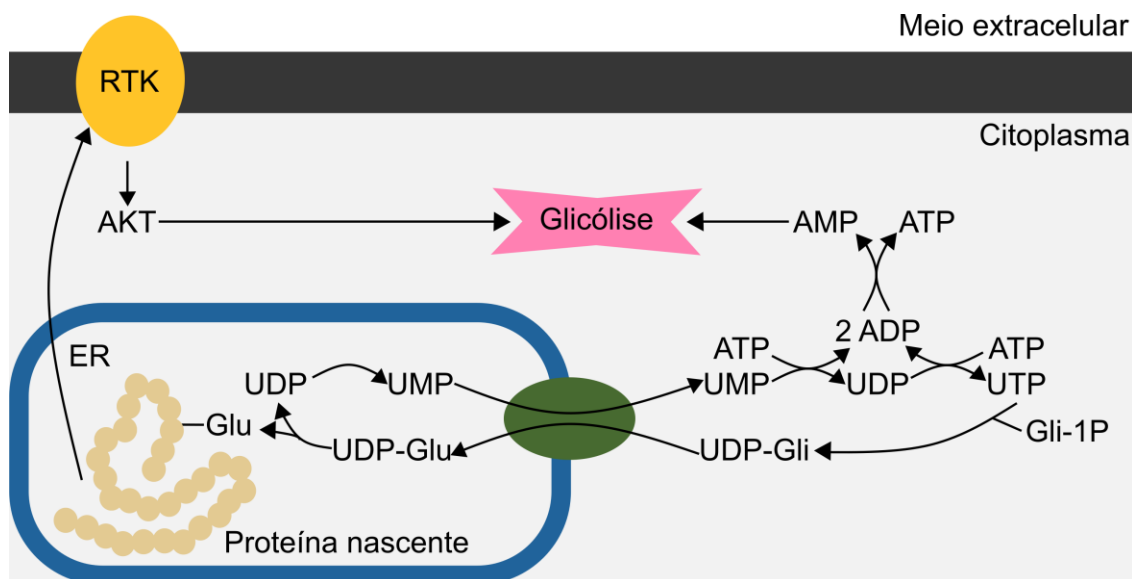


Figura 3. Esquema do papel da NTPDase5 na regulação do metabolismo. A atividade da NTPDase5 no RE produz UMP que é transportado para o citoplasma e refosforilado a UDP e então a UTP, com gasto de ATP. A refosforilação de UMP a UTP permite que esse, junto com glicose-1-fosfato (Gli-1P) produzam UDP-glicose (UDP-Gli) que retorna ao RE em antiporte com UMP. As moléculas de ADP resultantes das duas refosforilações consecutivas são substrato para formação de uma molécula de ATP e uma de AMP. Como resultado do ciclo, há conversão líquida de ATP em AMP, que é um importante regulador alostérico das enzimas da glicólise. A NTPDase5 também contribui indiretamente para a regulação da glicólise por ser fundamental para a glicosilação de proteínas como receptores tirosina-cinase (RTK) que são reguladores positivos da glicólise através da AKT. (Do autor)

Em células tumorais, a disponibilidade de intermediários para síntese de moléculas precursoras é um limitante para a divisão celular mais importante que os níveis de ATP. Além disso, os níveis de ATP necessários para proliferação são bem menores que aqueles necessários para a manutenção celular durante a quiescência (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Consoante, a expressão da NTPDase5 em células tumorais favorece a proliferação através da diminuição nos níveis intracelulares de ATP e consequente estímulo à glicólise (FANG et al., 2010; MACCARTHY; NOTARIO, 2013; RECIO et al., 2002; ZADRAN et al., 2012). Nessas circunstâncias, o aumento no consumo de ATP parece ser importante para diminuir a inibição sobre as enzimas da via glicolítica e aumentar os níveis de AMP que, por sua vez, estimulam a glicólise e a expressão e translocação de transportadores de

glicose, aumentando a disponibilidade de intermediários que podem ser desviados para o anabolismo (FANG et al., 2010).

1.1.6 NTPDase5 em outros mecanismos

Além dos mais bem caracterizados papéis da NTPDase5 na reglicosilação de proteínas e regulação do metabolismo (FANG et al., 2010), alguns trabalhos descrevem outros potenciais mecanismos de atuação que ainda necessitam abordagens mais aprofundadas. Pode-se citar aqui o envolvimento da NTPDase5 na insensibilidade a sinais apoptóticos (RECIO et al., 2002; TIRADO et al., 2003; VILLAR et al., 2009; XUE et al., 2015) e invasão tumoral (FANG et al., 2010; VILLAR et al., 2007; VOGIATZI et al., 2016; WIRTHSCHAFT et al., 2019; XUE et al., 2015).

Os primeiros estudos mecanísticos da NTPDase5 investigavam o seu papel na resistência a sinais de estresse sinalizado por proteínas fosforiladas. Sabe-se que a expressão de NTPDase5 está relacionada com efeitos inibitórios sobre a sinalização de estresse da via JNK (c-Jun N-terminal kinase) além de reduzir a fosforilação de mTOR e sua subsequente translocação da mitocôndria para o núcleo, onde mTOR fosforilado regula a expressão de genes pró-apoptóticos em resposta a radiação ionizante (RECIO et al., 2002; TIRADO et al., 2003). Em ambos, é sugerido que a NTPDase5 regula esses mecanismos pela diminuição na disponibilidade de doadores de fosfato, visto o seu papel na diminuição dos níveis intracelulares de ATP. Estudos posteriores propuseram papéis da NTPDase5 na regulação da apoptose que parecem não ser mediados pela diminuição de doadores de fosfato. Em câncer de pulmão, o silenciamento da NTPDase5 intensifica os níveis de apoptose mediados por caspase 3 (XUE et al., 2015). Ainda, em câncer de próstata, a NTPDase5 parece impedir que a cisplatina inative PKC α , ativando a fosforilação e estabilização de Bcl-2 que protege a célula de apoptose (VILLAR et al., 2009).

Em relação ao papel da NTPDase5 na invasão, a maior parte dos estudos encontrou uma associação entre a expressão dessa enzima e um aumento na capacidade invasiva de células tumorais que parece ser explicado pela importância da NTPDase5 na glicosilação de proteínas, muitas delas proteínas transmembrana ou secretadas que estão envolvidas com componentes estruturais da matriz

extracelular, além de receptores de crescimento (FANG et al., 2010; VOGIATZI et al., 2016; XUE et al., 2015). Além disso, se conhece mais a fundo um envolvimento da NTPDase5 na expressão de colágeno tipo I que parece ser dependente de PKC δ (VILLAR et al., 2007). Ainda, sabe-se que a regulação de AKT sob a expressão de NTPDase5 é importante para aumentar a capacidade de células de glioblastoma de produzirem e secretarem SPARC, uma proteína extracelular que favorece a invasão cerebral em regiões ricas em mielina (WIRTHSCHAFT et al., 2019).

1.1.7 NTPDase5 em câncer

Desregulações na expressão de *ENTPD5* foram encontradas em diversos tumores. Comparações com o tecido normal adjacente e diferentes estágios do desenvolvimento tumoral permitiram estabelecer que o mRNA de *ENTPD5* e os níveis de proteína NTPDase5 parecem estar tanto superexpressos como subregulados dependendo do tumor. A tabela 1 resume os principais trabalhos já publicados. Em glioblastoma e carcinomas de mama, próstata e testículo, a expressão da proteína NTPDase5 é maior do que nos respectivos tecidos normais (BLÁNQUEZ et al., 2004; KHORASANI et al., 2019; REGADERA et al., 2006; ZADRAN et al., 2012). Em relação a malignidade, já está descrito que formas mais avançadas e invasivas de carcinomas de mama e próstata apresentam expressão mais alta de NTPDase5 do que estágios anteriores e pré-malignos (BLÁNQUEZ et al., 2004; VILLAR et al., 2007). Consoante, em neoplasias de pulmão a ausência de detecção de NTPDase5 por imuno-histoquímica está relacionada a um melhor prognóstico (XUE et al., 2015). Por outro lado, em tumores de cólon e laringe a diminuição dos níveis de NTPDase5 parece ser um dos eventos que ocorre durante a transformação maligna (BLÁNQUEZ et al., 2002; MIKULA et al., 2011). Ainda, em tumores de ovário, o carcinoma seroso de alto grau que tem um mau prognóstico tem níveis mais baixos de *ENTPD5* do que o carcinoma de células claras que é menos agressivo (FRIDLEY et al., 2018).

São conhecidos diversos mecanismos pró-tumorais da NTPDase5 como o estímulo ao efeito Warburg e a adaptações metabólicas, aumento da expressão de receptores de crescimento tirosina-cinase, aumento da capacidade de

processamento do retículo endoplasmático, desregulação de respostas pró-apoptóticas, etc (FANG et al., 2010; SHEN; HUANG; FANG, 2011; VILLAR et al., 2007). Por outro lado, não se sabe como a diminuição da expressão de NTPDase5 poderia estar relacionada à progressão tumoral em alguns tumores. Há de se considerar a possibilidade da subregulação de NTPDase5 ser um evento do tipo *passenger*, isto é, uma alteração celular que não dá uma vantagem seletiva *per se*, mas ocorre como consequência de outro evento que é vantajoso, um evento *driver*. Por exemplo, em carcinomas de cólon o miR-182 - um regulador negativo da *ENTPD5* - está relacionado com um pior prognóstico (PERILLI et al., 2014). Considerando que nesse tumor níveis mais altos de *ENTPD5* são um fator de bom prognóstico, não é possível concluir até que ponto a diminuição de risco se deve à funcionalidade da NTPDase5 ou é uma consequência de níveis mais baixos de outro fator de risco como o miR-182.

Tabela 1: Resumo das alterações na expressão de *ENTPD5*/NTPDase5 encontradas em tumores humanos

Impacto da <i>ENTPD5</i> na sobrevivência/malignidade	Tecido de origem	Histologia ou subtipo	Resumo	Metodologia	Referência
Negativo	Cérebro	Glioblastoma	Níveis elevados em comparação com o tecido normal adjacente	IHQ	(ZADRAN et al., 2012)
	Mama	Carcinoma in situ, lobular e ductal	Indetectável em amostras normais e benignas, aumentado no carcinoma ductal e lobular em comparação com o carcinoma in situ	IHQ, WB	(BLÁNQUEZ et al., 2004)
	Próstata	Intraepithelial neoplasia and carcinoma	Indetectável em tecido normal, níveis baixos em hiperplasia, elevado em neoplasia intraepitelial e carcinoma	IHQ	(VILLAR et al., 2007)
		Não especificado	Expressão aumentada no câncer de próstata em comparação ao tecido normal	Microarray	(KHORASANI et al., 2019)
	Pulmão	Não especificado	Expressão negativa está relacionada a uma sobrevivência mais longa	IHQ	(XUE et al., 2015)
Inconclusivo	Testículo	Não especificado	Perda de expressão em células escamosas desdiferenciadas, mas aumentado em tumores em comparação com o tecido normal	IHQ, WB	(REGADERA et al., 2006)
Positivo	Cólon	Adenocarcinoma, adenoma colônico	Redução de expressão durante a progressão de tecido normal para adenocarcinoma	MS, RT-qPCR	(MIKULA et al., 2011)
	Laringe	Lesões displásicas	Níveis mais baixos em displasia grave do que leve e muito mais baixos do que o tecido normal	IHQ	(BLÁNQUEZ et al., 2002)

Ovário	Carcinoma seroso, carcinoma de células claras	O carcinoma seroso de alto grau de mau prognóstico tem níveis mais baixos de expressão do que o carcinoma de células claras de bom prognóstico	Microarray	(FRIDLEY et al., 2018)
--------	---	--	------------	------------------------

IHQ: imuno-histoquímica; WB: Western blotting.

1.2 Splicing

O *splicing* de mRNA é um evento essencial para a expressão de mais de 95% dos genes humanos. Durante esse processo, regiões do pré-mRNA conhecidas como íntrons devem ser removidas enquanto as porções denominadas éxons são retidas para compor o mRNA maduro (BONNAL; LÓPEZ-OREJA; VALCÁRCEL, 2020). Na maior parte dos genes eucarióticos, o *splicing* de mRNA ocorre com o auxílio do spliceossomo, um complexo molecular de proteínas e snRNAs (small nuclear RNAs). O spliceossomo reconhece, aproxima e ajuda a catalisar a clivagem de regiões específicas do mRNA que delimitam os íntrons além de auxiliar na junção de éxons adjacentes (RAHMAN et al., 2020).

A reação de *splicing* acontece em duas reações de transesterificação consecutivas (Figura 4). Primeiro, o grupo 2'-OH de uma adenina conservada no sítio de ramificação presente no íntron faz um ataque nucleofílico ao grupo fosforil de uma guanosina conservada no sítio de *splicing* 5', também conhecido como sítio doador. Essa reação cliva a ligação fosfodiéster da junção 5' entre o éxon e o íntron e forma uma estrutura em alça entre a extremidade 5' do íntron e a adenina do sítio de ramificação. Em seguida, o grupo 3'-OH do éxon 5' faz um ataque nucleofílico ao grupo fosforil do éxon 3', também chamado de sítio aceptor. Assim, os éxons 5' e 3' são unidos e o íntron em alça é liberado da sequência de mRNA (BONNAL; LÓPEZ-OREJA; VALCÁRCEL, 2020; RAHMAN et al., 2020; WATSON, 2014).

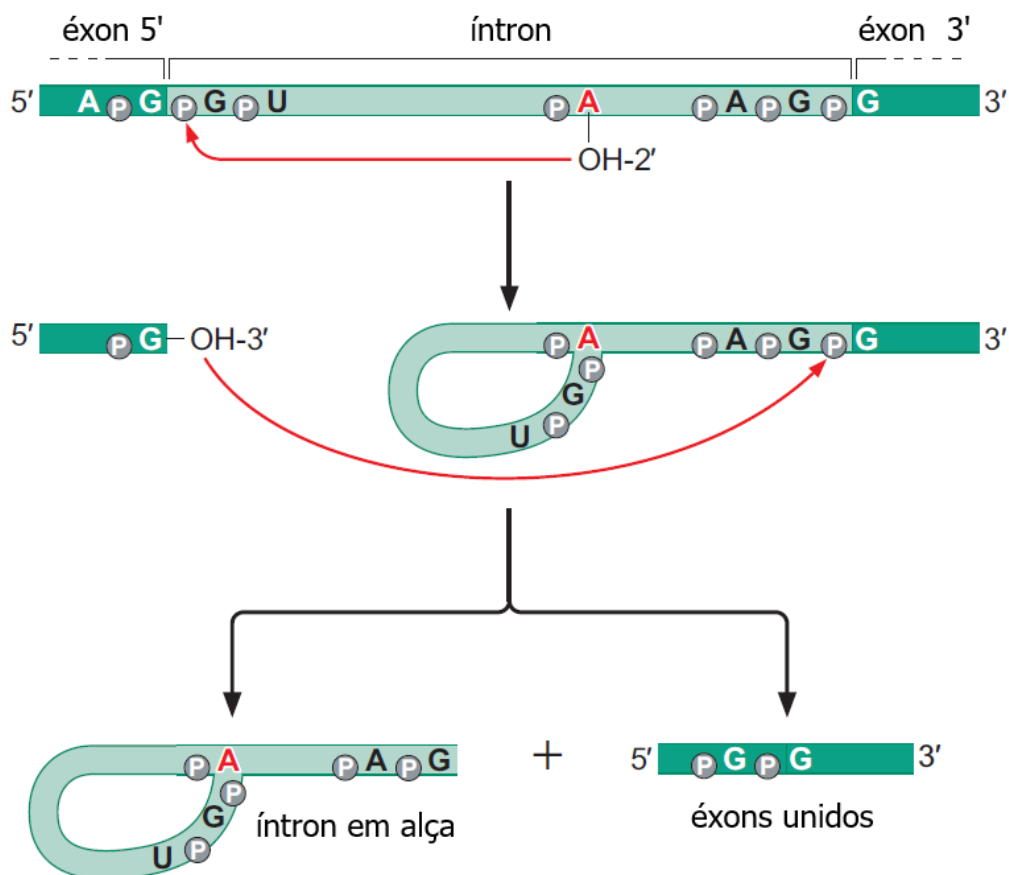


Figura 4. Esquema das reações de transesterificação envolvidas no processo de *splicing*. Primeiro, o grupo OH-2' de uma adenina faz um ataque nucleofílico ao grupo fosforil do éxon 5' clivando a ligação fosfodiéster e formando uma alça intrônica. Em seguida, a extremidade OH-3' livre do éxon 5' faz um ataque nucleofílico ao éxon 3'. Como resultado, os éxons adjacentes são unidos e um íntron em alça é removido. Adaptado de (WATSON, 2014).

1.2.1 Splicing alternativo

Genes humanos têm em média sete íntrons, mas muitos chegam a mais de 300 (WATSON, 2014). Assim, formas alternativas de excisar ou não determinados íntrons contribuem para a produção de distintos mRNA maduros a partir de um mesmo pré-mRNA, tornando possível uma rica diversidade proteômica com um número limitado de genes (BONNAL; LÓPEZ-OREJA; VALCÁRCEL, 2020). De fato, estima-se que 90% dos genes que codificam proteínas em humanos sofrem *splicing* alternativo para gerar mais de uma isoforma (WATSON, 2014), o que pode estar associado a diferentes estágios do desenvolvimento e adaptações célula- e tecido-específicas (RAHMAN et al., 2020).

Diversos eventos de *splicing* são descritos, sendo geralmente classificados em pelo menos sete categorias (Figura 5). A forma mais comum de *splicing* alternativo é o salto de éxon (exon skipping) na qual a sequência inteira de um éxon é removida do transcrito maduro. Em muitos casos, eventos de salto de éxon são mutuamente exclusivos entre dois ou mais éxons, ou seja, transcritos maduros sempre expressam um éxon enquanto pulam o outro ou outros. Saltos de éxon mutuamente exclusivos nas extremidades dos transcritos podem configurar uso alternativo de promotores e terminadores. *Splicing* alternativo também pode ocorrer quando sítios 5' (doadores) e 3' (aceptores) alternativos são usados durante as reações de transesterificação ou ainda, devido a alterações de bases únicas uma vez que a presença de variantes pode enfraquecer o reconhecimento das sequências canônicas pelas proteínas que compõem a maquinaria de *splicing* convencional e alternativo (ANNA; MONIKA, 2018). Por fim, a retenção de um íntron na sequência do mRNA maduro também pode ocorrer (BONNAL; LÓPEZ-OREJA; VALCÁRCEL, 2020; CHERRY; LYNCH, 2020; RYAN et al., 2016).

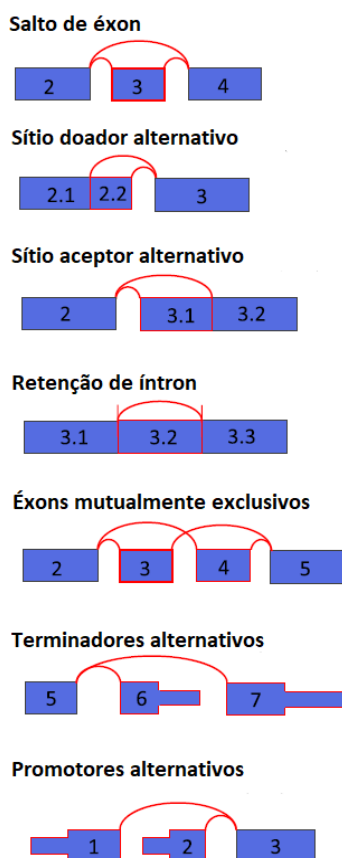


Figura 5. Principais eventos de *splicing* alternativo. Retângulos representam éxons e o espaçamento entre éxons representa íntrons. A região larga de éxons representa regiões codificantes enquanto a região estreita indica regiões não-codificantes. As linhas vermelhas conectam os sítios onde há junção de éxons (ou retenção de íntron). Adaptado de (RYAN et al., 2016).

1.2.2 Regulação do *splicing* alternativo

A regulação dos eventos de *splicing* ocorre principalmente através da associação de proteínas ligadoras de RNA (RNA-binding proteins, RBP) nas adjacências de sítios de *splicing* e subsequente recrutamento ou repressão da maquinaria catalítica do spliceossomo. RBPs são classicamente divididas em três categorias: proteínas SR, hnRNPs (partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas) canônicas e hnRNPs tecido-específicas (DVINGE, 2018; LEE; RIO, 2015). As proteínas SR são assim chamadas por serem ricas em serina e arginina. Essas proteínas atuam principalmente como ativadores de *splicing*, ligando-se a sítios ativadores de *splicing* (*splicing* enhancers) em éxons (ESE) e íntrons (ISE) através de um domínio de reconhecimento de RNA enquanto interagem e recrutam proteínas da maquinaria de *splicing* através do domínio RS, rico em arginina e serina. hnRNPs canônicos, por outro lado, geralmente se ligam a sítios silenciadores de *splicing* (*splicing* silencers) em éxons (ESS) e íntrons (ISS). Essas ribonucleoproteínas possuem sítios de reconhecimento de RNA de forma semelhante às proteínas SR, mas não possuem domínios RS que recrutam a maquinaria de *splicing*, dessa forma ocupam e bloqueiam sítios de *splicing* (DVINGE, 2018; FU; ARES, 2014).

Apesar de proteínas SR e hnRNPs canônicos serem classicamente associados com ativação e repressão de *splicing*, respectivamente, ambas podem atuar de maneira oposta em determinados contextos. Essa variabilidade muitas vezes se deve à posição no pré-mRNA onde essas proteínas se ligam. Por exemplo, hnRNP L geralmente atua como repressor da inclusão de éxons nos quais se liga ao respectivo domínio de silenciamento (ESS), mas quando se liga a regiões intrônicas pode atuar tanto como ativador ou repressor (FU; ARES, 2014; LEE; RIO, 2015).

Muitas famílias de hnRNPs tecido-específicas são descritas, sendo as famílias *NOVA*, *RBFOX* e *CELF* provavelmente as mais bem estudadas. Essas ribonucleoproteínas atuam tanto como ativadoras e silenciadoras de *splicing* dependendo da região do RNA que se ligam e da presença de outros reguladores de *splicing* (DVINGE, 2018; LEE; RIO, 2015). Sua atuação tecido-específica se deve tanto a expressão em tecidos limitados como o a preferência de ligação a motivos de RNA de genes que são expressos de forma seletiva entre diferentes tipos celulares (DVINGE, 2018; FU; ARES, 2014).

1.3 Banco de dados *The Cancer Genome Atlas*

Bancos de dados públicos como o Gene Expression Omnibus (GEO) e The Cancer Genome Atlas (TCGA) vêm revelando a alta complexidade do genoma humano e a importância da regulação dos processos de transcrição em tecidos saudáveis e tumorais. O TCGA é um projeto multi-institucional apoiado pelo National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos que inclui no seu catálogo análises moleculares de tecidos tumorais de mais de 11 mil pacientes de 33 tipos de câncer (LIU et al., 2018). O acesso, uso e publicação dos dados produzidos e derivados dessa iniciativa é livre à comunidade acadêmica contanto que sejam respeitadas as suas diretrizes éticas (TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015). Os dados disponíveis abertamente incluem informações clínicas e histopatológicas; dados de sequenciamento de DNA, mRNA e miRNA; e dados de metilação de DNA e expressão gênica e proteica baseados em microarranjo (LIU et al., 2018; TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015). O acesso a esses dados é geralmente feito através de ferramentas facilitadoras como o CBioPortal (CERAMI et al., 2012) e o GDAC Broad Firehose (DENG et al., 2017) nas suas versões *web* e para linguagens de programação como R e Python.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi esclarecer a origem de transcritos que geram peptídeos não-canônicos da NTPDase5 e avaliar seu papel no câncer.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os eventos de *splicing* que possam ocorrer em transcritos da *ENTPD5*;
- Descrever possíveis impactos dos eventos de *splicing* nas proteínas preditas;
- Investigar a frequência de detecção de eventos de *splicing* em amostras de tumores humanos;
- Avaliar o impacto de eventos de *splicing* na sobrevida de pacientes com câncer.

3 ARTIGO

O artigo a seguir intitulado “*ENTPD5: identification of splicing variants and their impact on cancer survival*” será submetido ao periódico internacional Human Genetics.

ENTPD5: identification of splicing variants and their impact on cancer survival

Rafael Paschoal de Campos^{1,2}, Marcia Rosângela Wink^{3*}, Guido Lenz^{1,2*}

1 – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil

2 – Departamento de Biofísica; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Brazil

3 – Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS – Brazil;

*These authors share senior authorship.

Corresponding author:

Guido Lenz, lenz@ufrgs.br, Departamento de Biofísica, e Centro de Biotecnologia, Rua Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431 – Lab. 115, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Declarations

Funding

Rafael P. de Campos was recipient of a Master fellowship from CNPq (Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Marcia R. Wink and Guido Lenz are recipients of research fellowship from CNPq. This study was supported by CAPES, PROCAD (158819); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PqG 17/2551-0001, Pronex 16/2551-0000473-0, FAPERGS-FAPESP, 2019/15477-3).

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval

Not applicable.

Consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated. The data analyzed during the current study are available in NCBI Protein (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein), Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org/index.html), cBioPortal (www.cbioportal.org/), GDAC Firehose (www.gdac.broadinstitute.org/), miRDB (www.mirdb.org/), miRCancerdb (<https://mahshaaban.shinyapps.io/miRCancerdb/>) and TCGA SpliceSeq (www.bioinformatics.mdanderson.org/TCGASpliceSeq/).

Code availability

Not applicable.

Authors' contributions

R.P.d.C conceived and designed the work, analyzed and interpreted data, and drafted the manuscript. M.R.W and G.L. interpreted data, edited and revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Abstract

NTPDase5 is a nucleotidase of the endoplasmic reticulum that plays an important role in proteostasis as a regulator of protein N-glycosylation. This enzyme was first identified in hamster as a proto-oncogene that is activated upon a single nucleotide deletion that causes a frame-shift and results in a truncated protein. Proteins similar in size to the truncated hamster NTPDase5 were detected in human samples through western blotting, but a human oncogene was never identified. Searching for transcript variants in the GenBank database and using TCGA data, we discovered that splice variants could originate truncated human NTPDase5 proteins. We identified three main splicing events in transcripts of the *ENTPD5* gene: alternative acceptors, exon skipping and alternative terminators. In addition, we also investigated the impact of splicing events in human cancers and found that skipping of exon 11 – the event that leads to truncated proteins similar in size to the hamster oncogene – does not affect the hazard ratio of most tumors and was, in fact, a protective factor in the only two cancer studies where it was significant. We also were able to identify four main patterns of impact of *ENTPD5* in cancer and a potential variant-specific regulation by miR-215. Our findings shed light on a two-decade uncertainty about the origin of truncated NTPDase5 proteins and contribute in the characterization of the impacts of NTPDase5 in human cancers.

Keywords: *ENTPD5*; NTPDase5; splicing events; transcript variants.

1. Introduction

The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) family of enzymes is composed of eight paralogs in humans involved in the degradation of di- and triphosphate nucleotides (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). NTPDase5, specifically, is an endoplasmic reticulum enzyme whose catalytic site is directed to the lumen (FANG et al., 2010; TROMBETTA; HELENIUS, 1999). The main substrate of NTPDase5 is UDP which is converted to UMP with the release of inorganic phosphate, albeit it also hydrolyzes other diphosphate nucleotides to a lesser extent (MACCARTHY; NOTARIO, 2013). In addition to the intracellular

localization, it has already been shown that NTPDase5 can be secreted as a soluble enzyme upon cleavage of the signal peptide sequence (MULERO et al., 1999; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005) and therefore could regulate UDP-binding receptors (O'KEEFFE et al., 2010). One of the established roles of NTPDase5 is in the N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. During this process, misfolded proteins need to be glycosylated by UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) in order to recruit calnexin and calreticulin for another attempt of proper folding. The substrate for UGGT is UDP-glucose, which enters the endoplasmic reticulum through an antiport mechanism with UMP produced by NTPDase5 (FANG et al., 2010).

NTPDase5 has also been associated with cancer development in several models. It has been identified as a mediator of pro-tumoral effects of AKT - namely stimulation of the Warburg effect (CURRY et al., 2013; FANG et al., 2010) - and p53 variants (VOGIATZI et al., 2016). It is also known that NTPDase5 is involved in the process of white matter invasion of glioblastomas (WIRTHSCHAFT et al., 2019), regulation of liver metabolism (WEI et al., 2018) and resistance to apoptosis (RECIO et al., 2002; VILLAR et al., 2009; XUE et al., 2015).

In Syrian hamster, a single nucleotide deletion at codon 214 of the NTPDase5 gene leads to the production of a 246 amino acid (~27kDa) truncated protein containing the first 213 amino acids of NTPDase5 and 33 amino acids from the altered reading frame produced by the deletion, which is considerably smaller than the 469 amino acids (~47kDa) of the wild-type NTPDase5. This truncated protein lacks enzymatic activity (MACCARTHY; NOTARIO, 2013) and was described as the oncogene mt-PCPH (VELASCO; AVILA; NOTARIO, 1999), which has transforming activity by cooperating with Ras to produce sustained activation of ERK1, a kinase intimately involved in cell proliferation (RECIO et al., 2000). In humans peptides of unknown origin equivalent in molecular size to mt-PCPH (~27kDa) have been detected in both normal tissue and tumor cell lines through western blotting using anti-serum against the hamster protein (RECIO; ZAMBRANO; NOTARIO, 2000; ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001) which made several authors hypothesize that NTPDase5 could also be a proto-oncogene in humans. It is not clear, however, whether these related proteins play a role in the malignant transformation of human cells, as the literature presents conflicting data about their expression in normal and

tumor cells. For example, while benign breast tissue express only the 47 kDa peptide, fragments other than the wild-type protein were detected in breast carcinomas (BLÁNQUEZ et al., 2004). In contrast, another study showed only the presence of 27 kDa peptides, related to mt-PCPH, in extracts from epithelial cells derived from normal breast (ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001).

Some pro-tumor roles of mt-PCPH have been found in human tumor cell lines with ectopic expression of the hamster oncogene. In most of them, mt-PCPH appears to have similar effects to the wild-type NTPDase5 protein but with greater intensity (TIRADO et al., 2003; VILLAR et al., 2007, 2009). However, as mt-PCPH was heterologously-expressed in these works and there are no functional studies of the variants of endogenous NTPDase5 found in human cells, the biological significance of peptides related to mt-PCPH in humans is still unknown. Also, some of these studies attributed the pro-tumoral effects of mt-PCPH to the depletion of intracellular ATP levels (RECIO et al., 2002; VILLAR et al., 2007). This effect was later very well characterized for the canonical full-length NTPDase5 through the identification of the ENTPD5/CMPK1/AK1 cycle which is dependent on its enzymatic activity (FANG et al., 2010). However, mt-PCPH does not show enzymatic activity *in situ* (MACCARTHY; NOTARIO, 2013). Since *ENTPD5* is a unique gene in mammals, some authors suggest that these other detected peptides could be splice variants (BLÁNQUEZ et al., 2004; ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001; SOLANAS et al., 2002) but no evidence was presented so far. Considering the increasing interest in the study of NTPDase5 as a potential target for cancers and the uncertainty about the origin and relevance of its non-canonical peptides, the aim of this article was to analyze transcripts of the human *ENTPD5* gene in order to identify possible correspondents to mt-PCPH and also assess the impact of non-canonical transcripts in the overall survival of cancer patients. Searching for transcript variants in the GenBank database and using TCGA data, we discovered that splice variants could originate truncated human NTPDase5 proteins. We describe here the splicing events that occur in the *ENTPD5* gene, four main patterns of impact of *ENTPD5* in cancer and a potential variant-specific regulation by miR-215.

2. Methodology

2.1. Identification of splicing variants

Protein entries in the NCBI Protein database were queried using “ENTPD5” OR “PCPH” as a search term on July 14, 2020. After filtering for human data, 31 items were found. The sequences of the equivalent mRNA transcripts were then aligned to the human *ENTPD5* gene using the BLAST tool. The Ensembl database was also queried for transcript variants of ENTPD5 and complete sequences for 3 protein-coding transcripts were found. PSI (percent spliced-in) data for *ENTPD5* splicing events in human cancers were downloaded from the TCGA SpliceSeq database (RYAN et al., 2016) which uses RNA-Seq data.

2.2. Gene expression, miRNA target prediction and survival analyses

Gene expression (RNA-Seq) and clinical data were downloaded from the TCGA Research Network using cBioPortal (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013). Detailed information for the selected studies can be found in Supplementary File 1. miRNA data was downloaded from miRCancerdb (AHMED et al., 2018) and TCGA GDAC Firehose (Broad Institute TCGA Genome Data Analysis Center (2016): Firehose stddata__2016_01_28 run. Broad Institute of MIT and Harvard. DOI doi:10.7908/C11G0KM9). miRNA target prediction was made using miRDB (CHEN; WANG, 2020). Cox proportional-hazard was performed using the “survival” package of R (www.r-project.org). Unadjusted models were performed separately for z-score transformed of global expression and of PSI. The adjusted model accounted for clinical variables, as described in Supplementary File 1. Analysis of weighted Schoenfeld residuals was used to test the proportional hazard assumption. Variables that did not respect the proportional hazard assumption were stratified and included if appropriate. All graphs and analyses were made using GraphPad Prism version 6.04 for Windows (La Jolla, California, USA) unless stated otherwise. Results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of splicing variants

Considering the uncertainty about the origin of non-canonical NTPDase5 peptides in humans, we decided to investigate potential sequence variations or

splicing variants of *ENTPD5*. First, we queried DNA sequencing data from the TCGA PanCancer Atlas database using cBioPortal and found that truncating variants in the *ENTPD5* gene are infrequent. Out of 10,953 patients from 32 different studies, only 64 variations were detected in 19 types of cancer. Variations were encountered throughout the sequence of the *ENTPD5* gene with no particular hotspot site. The cancer study with the highest amount of variants was uterine corpus endometrial carcinoma (15 patients) followed by skin cutaneous melanoma with 12 samples. Variants in other studies were encountered in five or less patients. Considering all studies, the most common type of events are missense variations (43 patients), followed by 15 truncating variations which correspond to less than 0.2% of patients. The other six variations involve gene fusion. Since non-canonical peptides were frequently described in earlier studies (BLÁNQUEZ et al., 2002, 2004; RECIO; ZAMBRANO; NOTARIO, 2000; ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001), it is highly unlikely that the majority of those events could be explained by truncating variations taking into account their very low prevalence.

Then, we looked for transcript variants of the human *ENTPD5* in order to investigate whether splicing variants could be identified. Interestingly, the NCBI Protein database has 31 entries predicted from transcript sequences, 17 of them equivalent to the canonical protein, which has 428 amino acids, while the others included seven unique proteins ranging from 236 to 410 amino acids. Aligning the consensus human *ENTPD5* gene to the mRNA sequences corresponding to the eight unique protein entries, we detected alternative use of exons that indicate that these are indeed splicing variants. Using the TCGA SpliceSeq database, we encountered several of those splicing events in samples from human cancers and identified a few others that were not present in the transcripts from the NCBI database. The Ensembl database contains two transcripts that match the sequences deposited in the NCBI Protein database and another transcript that was predicted from TCGA SpliceSeq data. Table 1 summarizes the identified variants and correspondent splicing events.

The human *ENTPD5* gene has 23 exons. Previous comparisons of the sequence of *NTPDase5* with its orthologs and paralogs revealed important conserved domains and residues. *NTPDase5* has all the five apyrase-conserved regions (ACR) found from yeast to superior eukaryotes and two out of the four

conserved regions (CR) among mammalian NTPDases. In addition, three putative N-glycosylation sites and four cysteine residues predicted to form disulfide bond were described (Figure 1).

We identified that the coding sequence of *ENTPD5* starts at the exon 5, may use different acceptors for exon 6 (referred to as exons 6.1, 6.2 and 6.3) and uses one exon among exons 17 to 21 as an alternative terminator. In addition, skipping of exons 11, 13 and/or 14 may also happen in some transcripts. Additionally, skipping of exons 2 and 4 in the 5' UTR of *ENTPD5* were also detected (Table 2) but were not included in the following analyses since they do not alter the protein sequence.

Both alternative acceptors to exon 6 result in putative truncated proteins that share the same amino acid sequence of the canonical NTPDase5 for 73 residues and 18 or 5 unconserved residues when exon 6.1 or 6.3 are used, respectively. These truncated proteins would miss several important domains and residues such as four out of the five apyrase conserved regions (ACR2-5), the two conserved regions shared among mammalian NTPDases (CR2 and 4), two asparagine residues predicted to be sites of N-glycosylation and all four cysteine residues involved in putative disulfide bonds. The absence of these features probably abrogates the enzyme activity.

Alternative use of terminators appears to also be an important feature of *ENTPD5*. The transcripts deposited in the NCBI database indicate the use of five different terminators (exons 17 to 21). These variants share the same first 400 amino acids and only differ in their final 2 to 28 residues. Since most residues are conserved, these variants retain all the important domains and residues identified in the literature so far with the exception of the ACR5 domain which is only found in the sequence of exon 17. Therefore, transcripts that use exons 18 to 21 only have the first four ACRs which could affect the enzymatic activity of these variants.

Skipping of exon 13 remains in-frame and results in a deletion of 34 residues which includes one conserved cysteine residue expected to be involved in disulfide bonds. Similarly, skipping of exon 14 also maintains the reading frame and causes a 47 amino acid gap that misses a conserved cysteine (KNOWLES, 2011). Skipping of exon 11 or both 11 and 13, however, results in a frameshift and a premature stop codon usage. Transcripts that skip exon 11 are predicted to encode a 236-amino

acid truncated protein while skipping both exons 11 and 13 encodes a 239-amino acid protein. It is interesting to note that these variants are similar in length to the hamster mt-PCPH that has 246 amino acids. Strikingly, both hamster and human truncated proteins differ from their full-length counterparts at the exact same amino acid position. While the point deletion in the nucleotide sequence of hamster NTPDase5 causes a frameshift and an amino acid change from serine to arginine at residue 214 (VELASCO; AVILA; NOTARIO, 1999), in humans, this position corresponds to the first amino acid after exon 10, which is a glutamic acid encoded by either exon 11 or 12. Surely, the subsequent residues of human and hamster truncated proteins are not conserved since the human transcripts contain the sequence of exon 12 while the hamster transcript only skips a nucleotide from the hamster-equivalent to the human exon 11.

Table 1 Putative variants of NTPDase5 based on transcripts detected and predicted

Level of evidence	Protein length	Splicing event(s)	Impact in the protein sequence
Transcript detected	428 aa	AA6.2, AT17	None (canonical protein)
	410 aa	AA6.2, AT21	Missing ACR5
	407 aa	AA6.2, AT19	Missing ACR5
	405 aa	AA6.2, AT18	Missing ACR5
	402 aa	AA6.2, AT20	Missing ACR5
	381 aa	AA6.2, ES14, AT17	Missing conserved Cys residue
	360 aa	AA6.2, ES14, AT19	Missing conserved Cys residue and ACR5
	236 aa	AA6.2, ES11	Truncated protein
	91 aa	AA6.1	Truncated protein – missing CR2-4, ACR2-5, conserved Asn and Cys residues
Transcript predicted	394 aa	AA6.2, ES13, AT17	Missing conserved Cys residue
	373 aa	AA6.2, ES13, AT19	Missing conserved Cys residue and ACR5
	239 aa	AA6.2, ES11, ES13	Truncated protein – missing CR4, ACR5, conserved Asn and Cys residues
	78 aa	AA6.3	Truncated protein – missing CR2-4, ACR2-5, conserved Asn and Cys residues

AA: Alternative acceptors; AT: Alternative terminators; ES: Exon skipping; ACR: apyrase conserved region; CR: conserved region

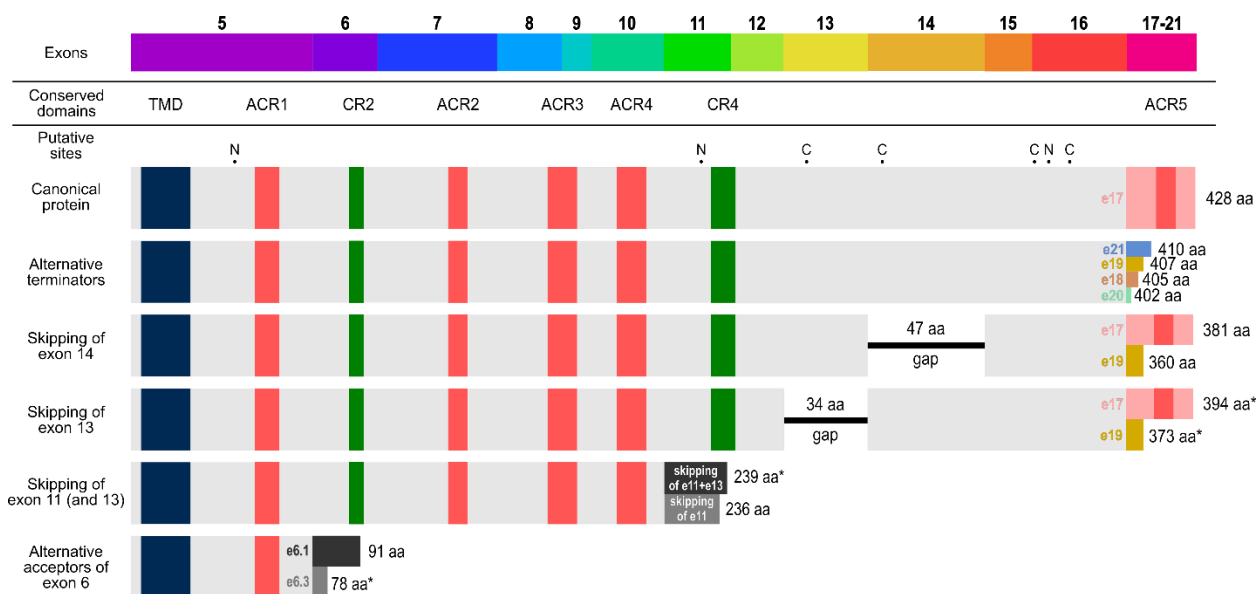


Fig. 1 Schematic representation of the exons of the *ENTPD5* gene aligned to the predicted protein variants. The coding sequence of *ENTPD5* starts at the exon 5 (the UTRs are not shown). Conserved domains and putative sites of N-glycosylation (N) and conserved cysteines (C) involved in disulfide bonds are shown. For the proteins: light grey regions represent conserved residues; dark blue indicates the transmembrane domain (TMD); dark red indicates apyrase conserved regions (ACR); dark green represents conserved regions (CR) of NTPDases; dark shades of grey indicate unconserved residues of the truncated proteins; light colors represent different alternative terminators. * = transcript predicted

3.2. Frequency of splicing events in human cancers

Using the TCGA SpliceSeq database we identified that *ENTPD5* splicing events appear to occur in different frequencies in human cancers depending on the tissue of origin and type of tumor (Table 2). Alternative use of exon 6.1 could be detected in samples from 85.1% of patients and in all the 15 types of cancer analyzed (Table 2). The median percentage of reads with this splicing event (PSI, percent-splice in), however, ranged from 3.6% to 10.9% in kidney renal clear cell carcinoma (KIRC) and lung adenocarcinoma (LUAD), respectively (Figure 2A). Nonetheless, many outliers were detected and a few patients even had PSI values of 100%. On the other hand, although alternative use of exon 6.3 was detected in all samples (Table 2), the median PSI values were lower than 0.6% (Figure 2A).

Five alternative terminators for *ENTPD5* were encountered in transcripts deposited in the NCBI Protein database, however only the use of exons 17 and 19 could be detected in the TCGA SpliceSeq database, where they were present in all samples (Table 2). Together, these two terminators account for more than 99% of all reads (Figure 2B). Therefore the other terminators probably could not be detectable above the noise threshold. Exon 17 is the preferred terminator for all the investigated studies, reaching a median of 86.7% in liver hepatocellular carcinoma (LIHC). However, in some tumors the difference is not so substantial, such as in lower-grade glioma (LGG), where a median of 40.4% of reads used exon 19 instead.

Additionally, we identified three exon skipping events that affect the coding sequence of *ENTPD5*. Skipping of exons 11, 13 and 14 were detected only in a fraction of patients - 7.1%, 8.7% and 29.6%, respectively - and not in all tumor types (Table 2). Interestingly, however, the PSI for the samples where those events are detected is usually high (Figure 2C). Mutations in the splicing sites of human *ENTPD5* were detected in only four patients of the TCGA PanCancer Atlas database, which corresponds to less than 0.04% of patients and indicates that the alternative use of exons appears to be mainly a result of differential mRNA processing and not mutations in acceptor or donor sites.

Table 2 Frequency of samples with each splicing event among cancer studies

Study	n	Samples with AA6.1	Samples with AA6.3	Samples with AT17	Samples with AT19	Samples with ES11	Samples with ES13	Samples with ES14	Samples with ES2	Samples with ES4
BLCA	406	281 (69.2%)	406 (100%)	406 (100%)	406 (100%)	18 (4.4%)	19 (4.7%)	41 (10.1%)	ND	225 (55.4%)
BRCA	1094	986 (90.1%)	1094 (100%)	1094 (100%)	1094 (100%)	152 (13.9%)	165 (15.1%)	385 (35.2%)	60 (5.5%)	932 (85.2%)
COAD	456	379 (83.1%)	456 (100%)	456 (100%)	456 (100%)	24 (5.3%)	26 (5.7%)	133 (29.2%)	ND	258 (56.6%)
GBM	155	108 (69.7%)	155 (100%)	155 (100%)	155 (100%)	ND	ND	15 (9.7%)	ND	87 (56.1%)
HNSC	501	422 (84.2%)	501 (100%)	501 (100%)	501 (100%)	16 (3.2%)	12 (2.4%)	78 (15.6%)	12 (2.4%)	370 (73.9%)
KIRC	533	496 (93.1%)	533 (100%)	533 (100%)	533 (100%)	30 (5.6%)	120 (22.5%)	442 (82.9%)	22 (4.1%)	442 (82.9%)
LGG	515	362 (70.3%)	515 (100%)	515 (100%)	515 (100%)	ND	10 (1.9%)	59 (11.5%)	ND	345 (67%)
LIHC	371	333 (89.8%)	371 (100%)	371 (100%)	371 (100%)	17 (4.6%)	78 (21%)	149 (40.2%)	ND	253 (68.2%)

LUAD	514	470 (91.4%)	514 (100%)	514 (100%)	514 (100%)	44 (8.6%)	25 (4.9%)	108 (21%)	ND	417 (81.1%)
LUSC	501	467 (93.2%)	501 (100%)	501 (100%)	501 (100%)	34 (6.8%)	23 (4.6%)	120 (24%)	11 (2.2%)	442 (88.2%)
OV	412	377 (91.5%)	412 (100%)	412 (100%)	412 (100%)	39 (9.5%)	25 (6.1%)	146 (35.4%)	44 (10.7%)	334 (81.1%)
PAAD	178	136 (76.4%)	178 (100%)	178 (100%)	178 (100%)	12 (6.7%)	ND	37 (20.8%)	ND	111 (62.4%)
SARC	259	160 (61.8%)	259 (100%)	259 (100%)	259 (100%)	ND	ND	27 (10.4%)	ND	125 (48.3%)
SKCM	103	78 (75.7%)	103 (100%)	103 (100%)	103 (100%)	ND	ND	ND	ND	76 (73.8%)
STAD	412	398 (96.6%)	412 (100%)	412 (100%)	412 (100%)	72 (17.5%)	56 (13.6%)	159 (38.6%)	63 (15.3%)	367 (89.1%)
Total	6410	5453 (85.1%)	6410 (100%)	6410 (100%)	6410 (100%)	458 (7.1%)	559 (8.7%)	1899 (29.6%)	212 (3.3%)	4784 (74.6%)

ND: not detected

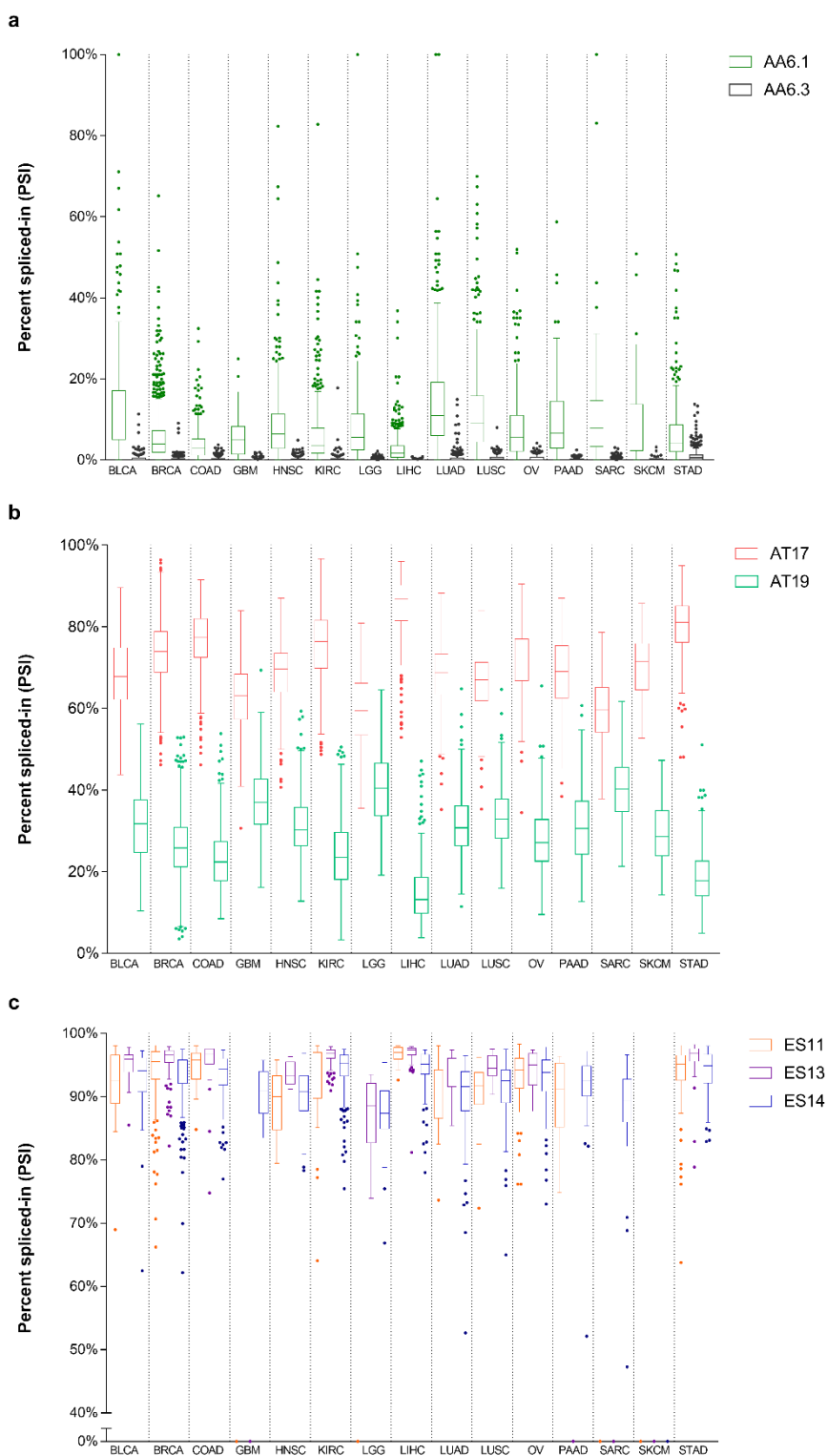


Fig. 2 Percentage of reads with each class of splicing events. **a.** Alternative acceptors (AA) of exon 6. **b.** Alternative terminators (AT). **c.** Exon skipping (ES). BLCA: bladder urothelial carcinoma. BRCA: breast invasive carcinoma. COAD: colon adenocarcinoma. GBM: glioblastoma. HNSC: head and neck squamous cell carcinoma. KIRC: kidney renal clear cell carcinoma. LGG: lower grade glioma. LIHC: liver hepatocellular carcinoma. LUAD: lung adenocarcinoma. LUSC: lung squamous cell

carcinoma. OV: ovarian serous cystadenocarcinoma. PAAD: pancreatic adenocarcinoma. SARC: sarcoma. SKCM: skin cutaneous melanoma. STAD: stomach adenocarcinoma

3.3. Prediction of the impact and regulation of alternative terminators

A transcript variant of the paralog enzyme NTPDase3 that uses an alternative terminator that lack ACR5 and does not have enzymatic activity was already described. Interestingly, this variant named NTPDase3 β negatively interferes with the protein levels of the canonical and functional NTPDase3 α variant (CRAWFORD et al., 2007). Since we encountered that the ACR5 sequence of *ENTPD5* is only found in exon 17 which is subject to alternative splicing, we were interested to know if the use of exon 19 as an alternative terminator impacted the global levels of *ENTPD5* in a similar way to the *ENTPD3* variant. For this, we first correlated *ENTPD5* mRNA levels with the PSI of exons 17 and 19. We found a significant correlation in 12 out of the 15 cancers analyzed. In all of them, use of exon 17 was positively correlated ($0.16 < r < 0.68$) while there was a negative correlation with exon 19 ($-0.68 < r < -0.17$) (Figure 3A). The absolute correlation values were similar between variants for all cancers since alternative terminators are mutually exclusive and together exons 17 and 19 account for more than 99% of reads. The correlation of *ENTPD5* levels with the PSI of exons 17 and 19 when all tumors are considered is 0.61 and -0.62, respectively (Figure 3B-C). This suggests a strong relationship between the absolute levels of *ENTPD5* and the type of alternative terminator used.

In the search of functional impacts of alternative splicing events and also considering the existence of five different terminators and, hence, five different 3'UTR sequences in *ENTPD5* transcripts, we decided to evaluate the potential of differential miRNA regulation of transcript variants. In order to investigate this, we used the miRDB target prediction database to identify potential binding sites for miRNAs and then looked for the correlation levels of the identified miRNAs with *ENTPD5* levels. We decided to also include exons of the 5'UTR and coding sequence (CDS) of *ENTPD5* as there is growing evidence that they can also be targeted by miRNAs (CHIPMAN; PASQUINELLI, 2019). Using the suggested score of 80 as a cut-off for likely target sites, we encountered 23 potential miRNAs that could bind to exons involved in alternative splicing (Supplementary File 2). One of the target sites is in the 5'UTR, four of them are in the CDS and the remaining 18

are encountered in the 3'UTR of three different terminators, exons 17, 19 and 21. Using miRCancerdb, we found expression data for only ten of these miRNAs in the TCGA database. Nine miRNAs regulators had weak correlations ($-0.25 < r < 0.23$) with *ENTPD5* mRNA levels and the sign of the correlation coefficient was not consistent among tumor types. However, miR-215, which was found as a potential target in exon 19, presented positive correlations in all significant tumors and had a stronger range of correlation coefficients in comparison with the other potential miRNAs ($0.22 < r < 0.41$). Since this miRNA potentially targets exon 19, we evaluated the correlation of miR-215 and the PSI of exon 19 in all tumors. Interestingly, there is a negative correlation of -0.44, which corroborates with the target prediction and suggests that miR-215 is a potential negative regulator of *ENTPD5* transcripts that use exon 19 as an alternative terminator (Figure 3D). Since the use of exon 19 itself is negatively correlated with *ENTPD5* levels, this probably explains why miR-215 is positively correlated with global *ENTPD5* mRNA. It is interesting to note that the distribution of data in the miR-215 vs. PSI AT19 correlation resulted in two big populations: most samples had lower levels of miR-215 and higher levels of PSI for exon 19, while a smaller subset of samples presented the opposite pattern. Interestingly, this pattern appears to be tumor-specific as the smaller subset of higher miR-215 expression and lower exon 19 usage samples is mainly composed of tumors from the COAD, LIHC and STAD cohorts.

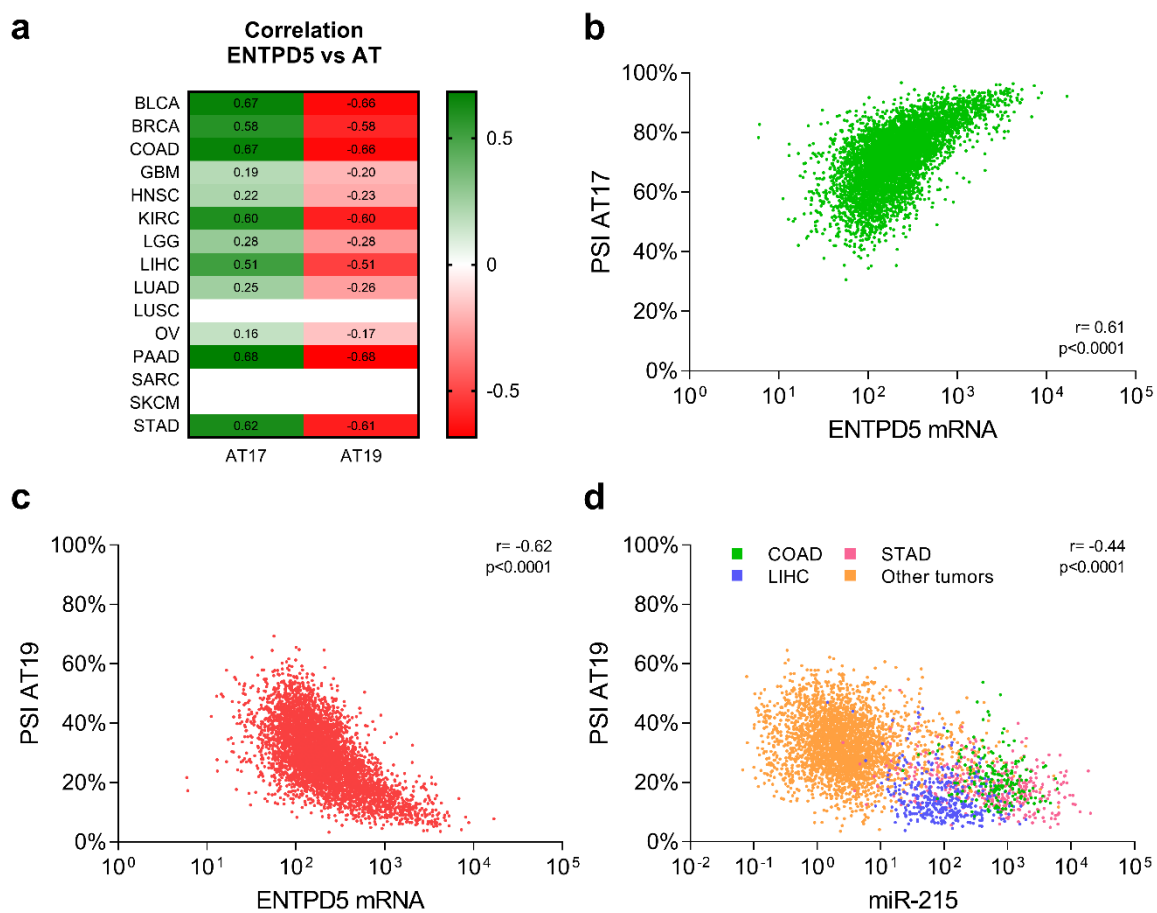


Fig. 3 Correlation of alternative terminators and *ENTPD5* and *miR-215*. **a.** Heat map showing the correlation of *ENTPD5* mRNA levels with the PSI of alternative terminators 17 and 19 for 15 cancers. Blank cells indicate non-significant values. **b-c.** Correlation of *ENTPD5* mRNA levels with the PSI of exons 17 and 19 for all tumors samples combined. **d.** Correlation of *miR-215* with the PSI of exons 17 and 19 for all tumors samples combined. Spearman's correlation coefficients are shown.

3.4. Impact of splicing events in the overall survival of cancer patients

After the identification of splicing events of *ENTPD5* in human cancers, we were interested in evaluating whether these events were related to the malignancy of tumors since *ENTPD5* peptides appeared to be differentially expressed in normal and tumor samples. For this, we selected the 15 solid tumors included in the TCGA database with the highest number of deceased patients. Studies with only non-significant results are presented in Supplementary File 3. First, we assessed the impact of global levels of *ENTPD5* using the Cox proportional-hazard model and identified that *ENTPD5* has a significant impact on the hazard ratio (HR) of four types of tumors when adjusted for clinical variables (Figure 4A). However, when the HR of these tumors is adjusted for the PSI of alternative terminators, global levels of *ENTPD5* only affect the HR of tumors in which clinically adjusted *ENTPD5* was a risk factor, suggesting that for COAD and KIRC it is not the expression level of *ENTPD5 per se* that is a risk factor, but the higher occurrence of a splicing event.

Next, we looked for the impact of the splicing events of *ENTPD5* in the HR adjusting or not for the impact of global levels of *ENTPD5*. Alternative use of terminators impacted the HR of patients of five studies (Figure 4B). Similarly to *ENTPD5* global levels, alternative terminators do not affect tumors in the same way. For COAD and KIRC patients, alternative use of exon 17 is a protective factor (HR: 0.69, IC95%: 0.54-0.88, and HR: 0.68, IC95%: 0.59-0.79, respectively) and use of exon 19 is a risk factor (HR: 1.5, IC95%: 1.1-1.9, and HR: 1.5, IC95%: 1.3-1.7, respectively). Adjusting the HR of these tumors for the levels of *ENTPD5* does not alter the pattern of impact in the HR. This indicates that the effect of alternative terminators is independent of the *ENTPD5* levels in these tumors. Furthermore, alternative use of exon 17 is a risk factor for LGG patients – and use of exon 19, a protective factor - only when not adjusted for *ENTPD5* levels. Together with SARC, this is indicative that, for these tumors, *ENTPD5* levels are an independent risk factor. Contrastingly, for lung adenocarcinoma (LUAD) and pancreatic adenocarcinoma (PAAD) the use of exon 19 is protective, while use of exon 17 is a risk factor, although global levels of *ENTPD5* did not significantly affect the HR in these studies (Figure 4B).

We also investigated the hazard ratio of a one unit increase in the z-score of the PSI of exon skipping events. After adjusting for *ENTPD5* levels, skipping of

exon 11 was a protective factor for LUAD patients (HR: 0.34; IC95%: 0.17-0.69) (Figure 4C). This event is related to the encoding of truncated NTPDase5 proteins and was only detected in 8.6% of patients with this tumor (Table 2). In addition, skipping of exon 13 and 14 were protective factors for breast invasive carcinoma (BRCA) (HR: 0.48; IC95%: 0.32-0.71) and KIRC patients (HR: 0.80; IC95%: 0.67-0.96), respectively (Figure 4C). These in-frame splicing events were found in 15.1% and 82.9% of samples of the respective studies (Table 2).

The impact of alternative use of exon 6 acceptors was also assessed. Alternative use of exon 6.1 or 6.3 result in putative 91 or 78-amino acid truncated proteins, respectively, that lack most conserved domains and residues. After adjusting for *ENTPD5* levels, increases in the PSI of exon 6.1 were a protective factor for bladder carcinoma (BLCA) and breast invasive carcinoma (BRCA) patients (HR: 0.76, IC95%: 0.59-0.97 and HR: 0.82, IC95%: 0.67-1.00, respectively), and a risk factor in the KIRC and liver hepatocellular carcinoma (LIHC) studies (HR: 1.34, IC95%: 1.21-1.49, and HR: 1.26, IC95%: 1.09-1.47, respectively) (Figure 4D). Increases in the PSI of exon 6.3 in any tumor, on the other hand, did not present a significant HR (Supplementary File 3).

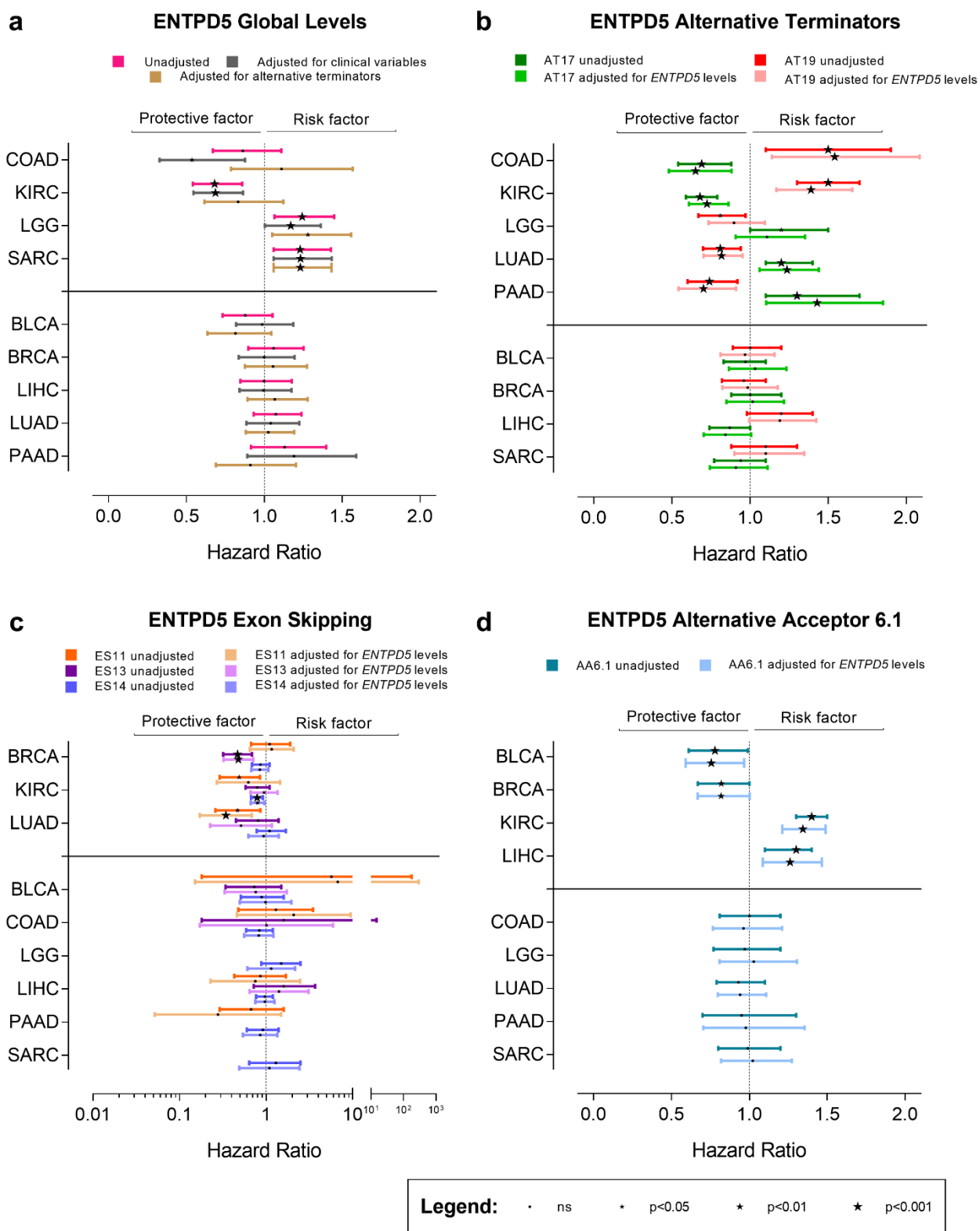


Fig. 4 Cox proportional hazard analysis of overall survival data. The hazard ratio of global mRNA levels of *ENTPD5* is shown in **a**. **b-d** indicates the hazard ratios of splicing events. The horizontal line separates significant and not significant results

4. Discussion

Combining the identified transcripts from the NCBI database and the predicted transcripts from the splicing events detected in the TCGA SpliceSeq database, we provide here the first description of alternative splicing of *ENTPD5*. Of note, in this study, we were able to identify transcripts that encode putative proteins that are remarkably similar in size to the hamster mt-PCPH oncoprotein and the 27 kDa NTPDase5 peptides detected through Western blotting in human samples in previous studies using anti-serum raised in rabbits against a recombinant hamster NTPDase5 (BLÁNQUEZ et al., 2002, 2004; RECIO; ZAMBRANO; NOTARIO, 2000; ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001). Considering that mt-PCPH is catalytically inactive (MACCARTHY; NOTARIO, 2013) and that these predicted truncated human variants similarly lack the four conserved cysteine residues, CR4 (KNOWLES, 2011) and the putative substrate-binding pocket - predicted from the rat NTPDase2 crystal structure (MACCARTHY; NOTARIO, 2013; ZEBISCH; STRÄTER, 2008), these variants probably are also inactive. It was previously suggested that mt-PCPH could act through protein-protein interactions instead, since it was predicted that it lacks one of the lobes that shape the catalytic cleft of NTPDases and potentially exposes residues otherwise protected (MACCARTHY; NOTARIO, 2013). Further studies are needed to evaluate whether these putative proteins are indeed expressed and their potential functions, if any. It is interesting to note, however, that contrary to hamster, these putative truncated proteins are possibly non-oncogenic in humans since skipping of exon 11 was a protective factor in the tumors where it affected the risk of death and the 27 kDa NTPDase5 protein was detected in several normal tissues (BLÁNQUEZ et al., 2002; RECIO; ZAMBRANO; NOTARIO, 2000; ROUZAUT; RECIO; NOTARIO, 2001). Two other smaller putative truncated proteins resulting from alternative use of acceptors for exon 6 are expected from transcript data and would lack four ACRs alongside the other same missing features of mt-PCPH.

In addition, we identified that *ENTPD5* has five different terminators, two of which account for more than 99% of reads in human cancers. The two most common terminators differ in that the most abundant, exon 17, contains the sequence for the ACR5, a conserved functional site encountered in enzymes with ectonucleotidase

activity while the other, exon 19, does not. Interestingly, an increase in the PSI of those terminators affects the risk of mortality in opposite manners. Since this is the first time that these variants are described, it is difficult to address why they affect tumors differently but we hypothesize that the lack of ACR5 in exon 19 may be one of the factors. Although the impact of missing ACR5 is unknown, it was also identified in a NTPDase3 splicing variant - named NTPDase3 β - that uses an alternative terminator. This variant is not enzymatically active and also significantly reduces the amount of canonical NTPDase3 α that is adequately processed and trafficked to the cell membrane (CRAWFORD et al., 2007). In our analysis, use of the ACR5-lacking exon 19 was negatively correlated with global levels of *ENTPD5*, which may indicate a regulatory role similar to NTPDase3 β of this *ENTPD5* variant. We also encountered a possible site for miR-215 targeting in the sequence of exon 19 that is absent in exon 17 and in the remaining coding sequence of *ENTPD5*. This miRNA correlated negatively with the PSI of exon 19 which suggests that the predicted targeting indeed occurs and is important for the regulation of *ENTPD5* levels since it correlated positively with global levels of mRNA. Interestingly, miR-215-3p has been found dysregulated in many cancers and directly targets the transcription factor FoxM, which is inhibited by FoxO, an inhibitor of *ENTPD5* transcription (FANG et al., 2010; TANG et al., 2019). A cross-talk between FoxM and FoxO may selectively affect the expression of *ENTPD5* variants. Another potential difference between alternative terminators 17 and 19 is that a complementary sequence to exon 19, but not 17, is partially transcribed in transcripts of the *COQ6* gene in the opposite strand, which could form double-strand RNA structures and generate small RNAs.

Skipping of exons 13 and 14 was also identified in our data. As previously shown, transcripts with these exons spliced out remain in-frame and do not affect conserved functional domains, although they lack conserved cysteines predicted to form disulfide bonds. The effect of these events on the enzymatic activity of NTPDase5 is unknown, although it can be expected that some alteration in the tertiary structure of the proteins should happen due to the residue gap and the missing conserved cysteine. Skipping of exon 14 occurred on 29.6% of all patients, but was especially frequent in kidney renal clear cell carcinoma where it was detected in 82.9% of samples with a median PSI of 95.3% of all reads. This

implicates that the 428-amino acid protein, considered as the canonical NTPDase5 in the literature, is not the most abundant variant in this tumor.

Although deregulations in the expression of NTPDase5 have been found in many cancers, their impacts are diverse and often antagonistic. In glioblastoma and testis, prostate and breast tumors, for example, NTPDase5 levels are only detectable or more highly encountered in malignant tissues in comparison to normal samples (BLÁNQUEZ et al., 2004; REGADERA et al., 2006; VILLAR et al., 2007; ZADRAN et al., 2012). Accordingly, NTPDase5 levels appear to gradually increase during the malignant transformation of breast and prostate cancers (BLÁNQUEZ et al., 2004; VILLAR et al., 2007) and expression of NTPDase5 was associated with shorter survival rates of lung cancer patients (XUE et al., 2015). In contrast, however, the opposite pattern is observed in colon and larynx carcinomas where *ENTPD5* mRNA levels and NTPDase5 protein levels, respectively, appear to be progressively lost during carcinogenesis (BLÁNQUEZ et al., 2002; MIKULA et al., 2011). In our study, global levels of *ENTPD5* adjusted for clinical variables affected the risk of death of four tumors as either a protective – COAD and KIRC - or a risk factor – LGG and SARC. Corroborating with the literature, *ENTPD5* expression in colon adenocarcinoma also was a protective factor, but surprisingly, the alternative use of exon 17 - which has a PSI of 77.4% of reads – appears to be the main responsible for these findings since *ENTPD5* levels do not affect the HR significantly when adjusted for alternative terminators. We also could identify that lower-grade gliomas follow the same pattern of glioblastomas - which are grade IV gliomas - in that *ENTPD5* expression is a risk factor. *ENTPD5* also negatively impacted the HR of sarcoma patients, while it was a protective factor for kidney renal clear cell carcinoma. Similarly to the dual role of global levels of *ENTPD5*, alternative use of acceptors and terminators appears to affect tumors differently, and no pattern of risk or protective factor could be determined when different tumor types are considered. Exon skipping, however, appeared to either be protective or not affect the HR at all. The lower frequency of exon skipping in comparison to other events probably also imposes statistical limitations to better assess their impacts. Nonetheless, we were able to summarize our findings in four main groups of cancer studies: those where the alternative use of exon 17 – the most abundant - was a protective factor, those where this feature was a risk factors, those where *ENTPD5* global levels were a risk

factor and those where these characteristics did not affect the HR but other splicing events did (Figure 5).

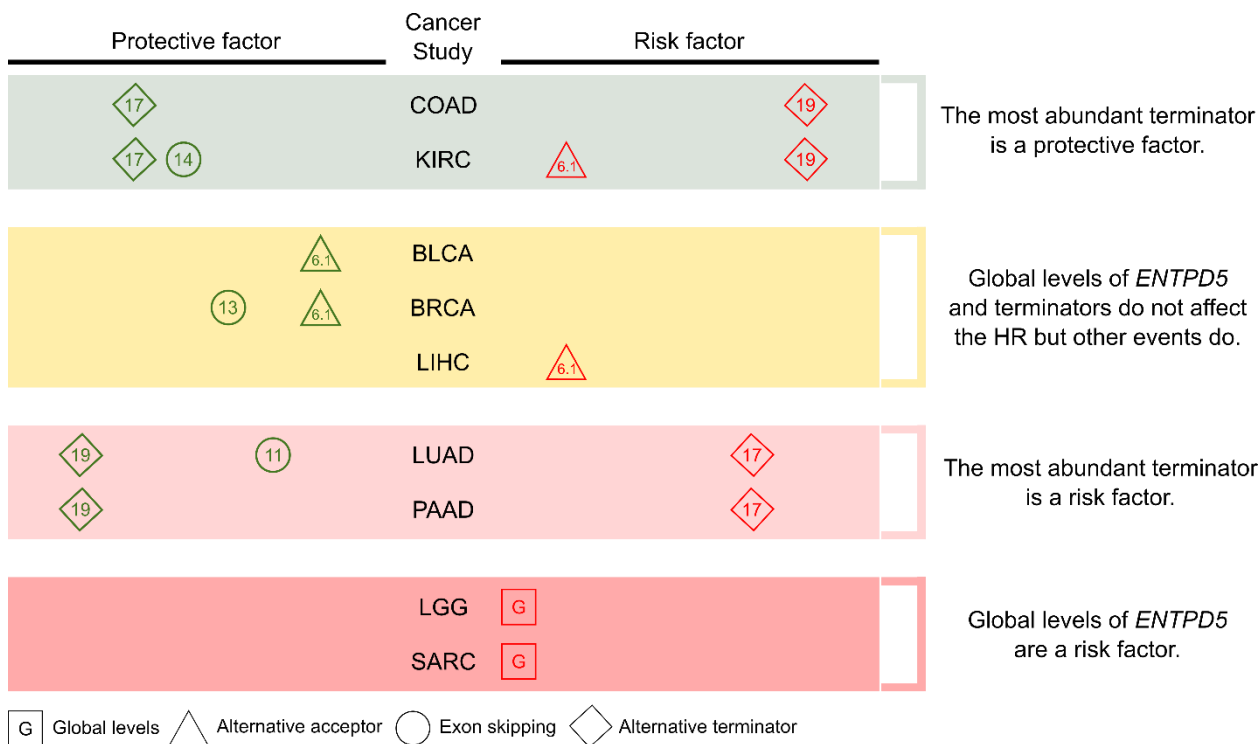


Fig. 5 Summary of Cox proportional-hazard results. Global levels of *ENTPD5* and splicing events are only shown when significant. Cancer studies were grouped in accordance with the patterns of impact of global levels of *ENTPD5* and alternative use of exon 17, the most abundant terminator, on the risk of mortality. HR: Hazard ratio

Conclusion

Our results indicate that there are three main splicing events in the *ENTPD5* gene, namely alternative acceptors for exon 6, exon skipping and alternative terminators. In addition, we evaluated the impact of global levels of *ENTPD5* and splicing events in the overall survival of cancer patients using data from the TCGA database and found that, similarly to previous studies in the literature, *ENTPD5* and its splicing variants can act as both risk and protective factors depending on the type of tumor. We also described a potential tumor-specific mechanism of transcript variant regulation by miR-215. Together, our findings shed light on a two-decade uncertainty about the origin of non-canonical NTPDase5 proteins and contribute to the literature in the characterization of the dual role of NTPDase5. Further studies

are necessary to investigate the distribution and functionality of *ENTPD5* splicing variants.

References

Ahmed M, Nguyen H, Lai T, Kim DR (2018) miRCancerdb: a database for correlation analysis between microRNA and gene expression in cancer. *BMC Res Notes* 11:103. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3160-9>

Blázquez MJ, Arenas MI, Conde I, et al (2004) Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in human breast cancers. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 10

Blázquez MJ, Regadera J, Mariño J, et al (2002) Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia: PCPH EXPRESSION IN LARYNGEAL CARCINOGENESIS. *Mol Carcinog* 35:186–195. <https://doi.org/10.1002/mc.10091>

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al (2012) The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* 2:401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>

Chen Y, Wang X (2020) miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res* 48:D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>

Chipman LB, Pasquinelli AE (2019) MiRNA Targeting – Growing Beyond the Seed. *Trends Genet* 35:215–222. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.12.005>

Crawford PA, Gaddie KJ, Smith TM, Kirley TL (2007) Characterization of an alternative splice variant of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): A possible modulator of nucleotidase activity and purinergic signaling. *Arch Biochem Biophys* 457:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.10.013>

Curry NL, Mino-Kenudson M, Oliver TG, et al (2013) Pten-Null Tumors Cohabiting the Same Lung Display Differential AKT Activation and Sensitivity to Dietary Restriction. *Cancer Discovery* 3:908–921. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0507>

Fang M, Shen Z, Huang S, et al (2010) The ER UDPase ENTPD5 Promotes Protein N-Glycosylation, the Warburg Effect, and Proliferation in the PTEN Pathway. *Cell* 143:711–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.010>

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6:pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>

Knowles AF (2011) The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal* 7:21–45. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9214-7>

MacCarthy CM, Notario V (2013) The ENTPD5/mt-PCPH oncoprotein is a catalytically inactive member of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *International Journal of Oncology* 43:1244–1252. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2052>

Mikula M, Rubel T, Karczmarski J, et al (2011) Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct Integr Genomics* 11:215–224. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0200-5>

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE (1999) CD39-L4 Is a Secreted Human Apyrase, Specific for the Hydrolysis of Nucleoside Diphosphates. *J Biol Chem* 274:20064–20067. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20064>

Murphy-Piedmonte DM, Crawford PA, Kirley TL (2005) Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1747:251–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.11.017>

O'Keeffe MG, Thorne PR, Housley GD, et al (2010) Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. *Histochem Cell Biol* 133:425–436. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0682-1>

Recio JA, Paez JG, Maskeri B, et al (2000) Both Normal and Transforming PCPH Proteins Have Guanosine Diphosphatase Activity But Only the Oncoprotein Cooperates with Ras in Activating Extracellular Signal-regulated Kinase ERK1. *Cancer Res* 60:1720–8

Recio JA, Paez JG, Sanders S, et al (2002) Partial Depletion of Intracellular ATP Mediates the Stress-Survival Function of the PCPH Oncoprotein. *Cancer Res* 62:2690–4

Recio JA, Zambrano N, Notario V (2000) The Human PCPH Proto-oncogene: cDNA Identification, Primary Structure, Chromosomal Mapping, and Expression in Normal and Tumor Cells. *Mol Carcinog* 62:8

Regadera J, Blázquez M, González-Peramato P, et al (2006) PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. *Int J Oncol*. <https://doi.org/10.3892/ijo.28.3.595>

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2:409. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>

Rouzaut A, Recio JA, Notario V (2001) Expression of the Protein Product of the PCPH Proto-oncogene in Human Tumor Cell Lines. *Radiation Research* 155:181–187. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0181:EOTPPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0181:EOTPPO]2.0.CO;2)

Ryan M, Wong WC, Brown R, et al (2016) TCGASpliceSeq a compendium of alternative mRNA splicing in cancer. *Nucleic Acids Res* 44:D1018-1022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1288>

Solanas M, Escrich E, Rouzaut A, et al (2002) Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene: PCPH Expression in Mammary Tumors. *Mol Carcinog* 33:219–227. <https://doi.org/10.1002/mc.10039>

Tang X, Shi X, Wang N, et al (2019) MicroRNA-215-3p Suppresses the Growth, Migration, and Invasion of Colorectal Cancer by Targeting FOXM1: Technology in Cancer Research & Treatment. <https://doi.org/10.1177/1533033819874776>

Tirado OM, Mateo-Lozano S, Sanders S, et al (2003) The PCPH Oncoprotein Antagonizes the Proapoptotic Role of the Mammalian Target of Rapamycin in the Response of Normal Fibroblasts to Ionizing Radiation. *Cancer Res* 63:6290–8

Trombetta ES, Helenius A (1999) Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 18:3282–3292. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3282>

Velasco JA, Avila MA, Notario V (1999) The product of the cph oncogene is a truncated, nucleotide-binding protein that enhances cellular survival to stress. *Oncogene* 18:689–701. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202324>

Villar J, Arenas MI, MacCarthy CM, et al (2007) PCPH/ENTPD5 Expression Enhances the Invasiveness of Human Prostate Cancer Cells by a Protein Kinase C δ -Dependent Mechanism. *Cancer Res* 67:10859–10868. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2041>

Villar J, Quadri HS, Song I, et al (2009) PCPH/ENTPD5 Expression Confers to Prostate Cancer Cells Resistance against Cisplatin-Induced Apoptosis through Protein Kinase C -Mediated Bcl-2 Stabilization. *Cancer Research* 69:102–110. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2922>

Vogiatzi F, Brandt DT, Schneikert J, et al (2016) Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E8433–E8442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612711114>

Wei J, Yuan Y, Chen L, et al (2018) ER-associated ubiquitin ligase HRD1 programs liver metabolism by targeting multiple metabolic enzymes. *Nat Commun* 9:3659. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06091-7>

Wirthschaft P, Bode J, Soni H, et al (2019) RhoA regulates translation of the Nogo-A decoy SPARC in white matter-invading glioblastomas. *Acta Neuropathol* 138:275–293. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02021-z>

Xue Y, Wu L, Liu Y, et al (2015) ENTPD5 Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells via Regulating Caspase 3 Expression. *PLoS ONE* 10:e0120046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120046>

Zadran S, Amighi A, Otiniano E, et al (2012) ENTPD5-mediated modulation of ATP results in altered metabolism and decreased survival in gliomablastoma multiforme. *Tumor Biol* 33:2411–2421. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0505-1>

Zebisch M, Sträter N (2008) Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6882–6887. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802535105>

Supplementary File 1 Summary of selected TCGA cohorts and the respective clinical variables used in survival analyses

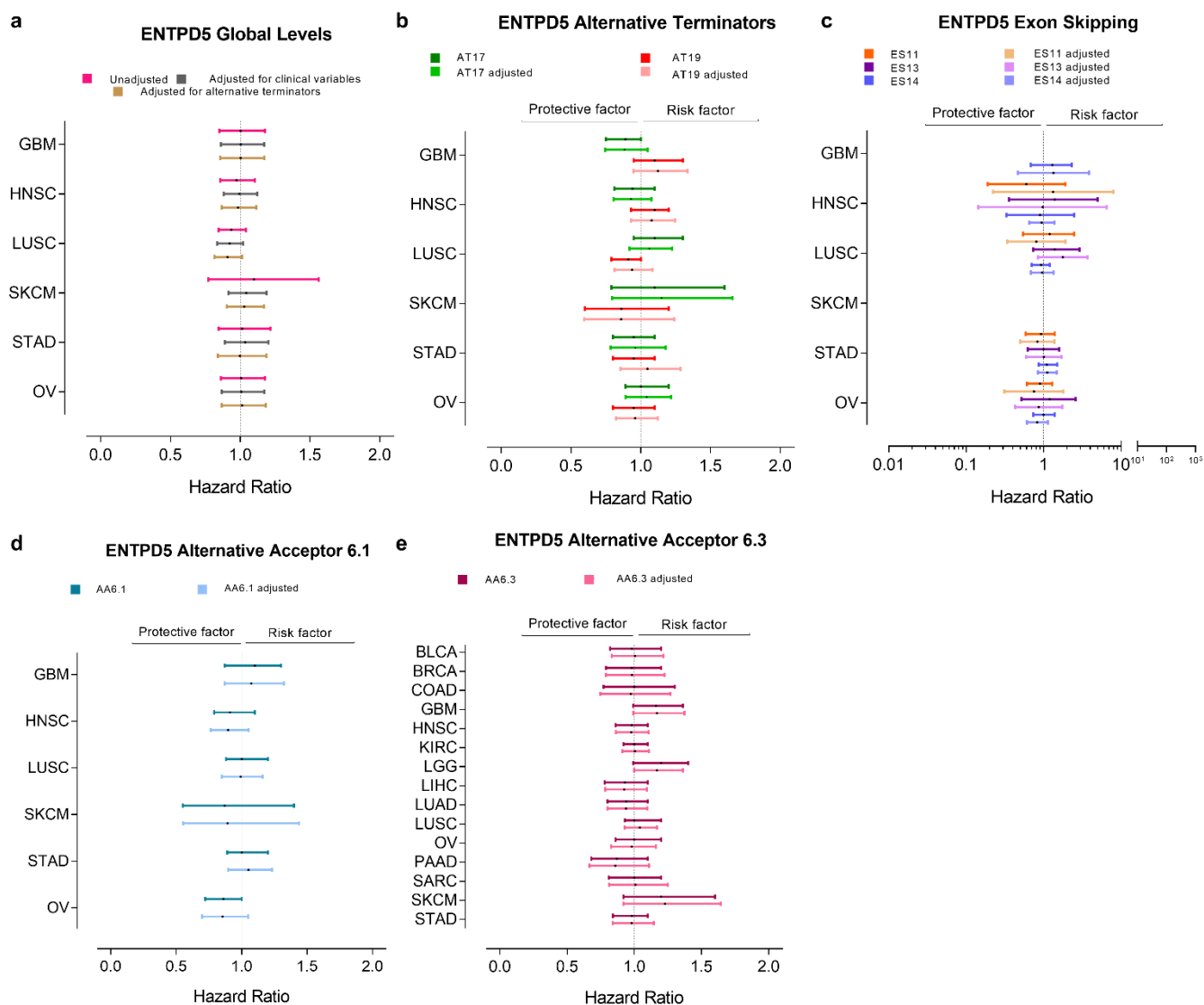
Study	N (total)	N (deceased)	Survival median (months)	Adjusted for:
BLCA	408	173	33	Age, Sex, Stage, Histological Subtype, Tobacco Smoking History Indicator
BRCA	1100	154	129	Age, Sex, Stage*
COAD	382	87	82	Age*, Sex, Stage, Cancer Type*
GBM	166	132	14	Sex
HNSC	522	221	55	Age, Sex, Grade, Alcohol history
KIRC	534	175	91	Age, Sex
LGG	530	133	88	Age*, Sex, Grade*
LIHC	373	130	56	Age, Sex, Grade
LUAD	517	170	49	Age, Sex, Stage*, Tobacco Smoking History Indicator
LUSC	501	209	54	Age, Sex, Stage, Tobacco Smoking History Indicator
OV	307	185	45	Age, Grade
PAAD	179	76	19	Age, Sex, Stage, Tobacco Smoking History Indicator
SARC	263	99	65	Age, Sex
SKCM	472	222	78	Age, Sex
STAD	415	158	29	Age, Sex, Stage*, Cancer Type, Primary Site

*: stratified

Supplementary File 2 Predicted miRNA targets in the sequence of exons of *ENTPD5* involved in alternative splicing and their correlations with *ENTPD5* mRNA levels

Exon	miRNA Name	Target Score	BLCA	BRCA	COAD	GBM	HNSC	KIRC	LGG	LIHC	LUAD	LUSC	OV	PAAD	SARC	SKCM	STAD
2	<u>miR-3065-3p</u>	84	ns	ns	ND	ns	ns	0.21	ns	ns	ns	ns	ND	-0.11	ns	ns	ns
6.1	<u>miR-409-5p</u>	94	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.14	ns	0.11	ns	ns	0.13	ns	-0.13
	<u>miR-431-5p</u>	90	ns	ns	0.11	ns	ns	ns	ns	-0.13	ns	0.18	ns	ns	0.2	ns	-0.12
	<u>miR-593-3p</u>	80	ns	ns	ND	ns	ND	ND	ND	ns	ND	ns	ns	ns	ns	ns	ND
11	<u>miR-302e</u>	81	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	<u>miR-6744-5p</u>	90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-6875-5p</u>	88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-3126-5p</u>	88	ns	ns	ND	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.11	ns	-0.12
	<u>miR-4744</u>	87	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-4311</u>	86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-4709-3p</u>	86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-155-5p</u>	85	-0.12	ns	-0.11	0.14	-0.2	-0.25	0.14	-0.13	ns	-0.18	ns	ns	ns	ns	ns
	<u>miR-7106-5p</u>	83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-5692a</u>	83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-22-5p</u>	81	ns	ns	-0.15	0.23	ns	ns	0.23	0.16	ns	-0.13	ns	ns	ns	0.11	ns
	<u>miR-1206</u>	80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	<u>miR-4723-3p</u>	83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-215-3p</u>	81	0.39	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.22	0.29	ns	ns	0.41	ns	ns	ns
	<u>miR-4425</u>	81	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	<u>miR-4772-3p</u>	94	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-5192</u>	94	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<u>miR-3663-5p</u>	84	ns	ns	ND	ns	ns	ns	ns	-0.11	ns	ns	ND	ns	0.14	ns	ND
	<u>miR-496</u>	83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no data; ns: non-significant



Supplementary File 3 Cox proportional hazard analysis of overall survival data. The hazard ratio of global mRNA levels of *ENTPD5* is shown in **a**. **b-e** indicates the hazard ratios of splicing events

4 DISCUSSÃO GERAL

A primeira descrição de um gene equivalente ao hoje conhecido *ENTPD5* foi feita em 1994 por Velasco e colaboradores a partir do homólogo de hamster sírio (*Mesocricetus auratus*). A partir disso, a NTPDase5 tem ganhado crescente interesse de pesquisadores. Inicialmente descrita como um potencial oncogene (VELASCO; AVILA; NOTARIO, 1999), estudos posteriores demonstraram papéis pró-tumorais da proteína selvagem (FANG et al., 2010; SHEN et al., 2011; VOGIATZI et al., 2016), além de mais recentes descobertas sobre seu envolvimento na regulação hepática (WEI et al., 2018) e dos níveis de ácido úrico (WANG et al., 2018).

Uma das características mais importantes dos genes eucarióticos é a presença de íntrons. Essas regiões gênicas são importantes para diversos aspectos regulatórios e de diversidade proteômicas dos genomas desses organismos. Estima-se que até 90% dos genes humanos realizam *splicing* alternativo para produzir isoformas proteicas (WATSON, 2014), tornando evidente a necessidade de caracterizar as variantes transcricionais a fim de melhor compreender o funcionamento e regulação dos processos celulares.

Combinando as bases de dados do TCGA e de transcritos do NCBI e Ensembl, nesse trabalho apresentamos a primeira descrição de *splicing* alternativo de *ENTPD5*. A partir disso, pudemos identificar a provável origem de proteínas humanas semelhantes em tamanho à oncoproteína mt-PCPH de hamster que foram detectadas em tecidos humanos como variantes de *splicing*. A homologia de sequência com a mt-PCPH nos primeiros 214 de 236 ou 239 códons permite sugerir que essas variantes codificam proteínas putativas truncadas cataliticamente inativas devido à ausência de resíduos de cisteína conservados, domínios ACR e CR conservados e do putativo bolso de ligação ao substrato previsto a partir da estrutura de cristal NTPDase2 de rato (BASU; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2004; MACCARTHY; NOTARIO, 2013). Diferente do que é conhecido em hamster, no entanto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que essas variantes não são oncogênicas em humanas porque o evento de *splicing* responsável pela truncagem – salto do éxon 11 - não afeta ou afeta positivamente o risco de mortalidade de pacientes com câncer.

Outro achado que merece destaque foi a identificação de transcritos de *ENTPD5* contendo cinco terminadores diferentes, dois dos quais respondem por mais de 99% das leituras em cânceres humanos. Dentre outras características, esses dois terminadores diferem pela presença do sítio conservado de nucleotidase ACR5 no éxon terminador 17, e pela presença de um sítio alvo de ligação do miR-215-3p no éxon terminador 19. O uso desse último está correlacionado negativamente com os níveis de mRNA de *ENTPD5* e sugerem uma regulação negativa. De fato, o miR-215, que tem um sítio alvo na sequência do éxon 19, se correlaciona negativamente com a porcentagem de uso do éxon 19 e por consequência está positivamente correlacionado com os níveis globais de *ENTPD5*. Esse antagonismo entre éxon contendo ACR5 e éxon regulador negativo da expressão gênica foi encontrado no parálogo NTPDase3, o que sugere que essa característica possa ser compartilhada na família de NTPDases (CRAWFORD et al., 2007). Outra diferença potencial entre os éxons terminadores 17 e 19 é que o éxon 19, mas não o 17, é parcialmente complementar à região transcrita do gene *COQ6* na fita oposta. Essa característica pode contribuir para a formação de estruturas de RNA de fita dupla e gerar pequenos RNAs.

Outros eventos de *splicing* dos quais não é possível sugerir tantas implicações são os aceptores alternativos do éxon 6 e o salto dos éxons 13 e 14. Os aceptores alternativos do éxon 6 produziram proteínas putativas truncadas de 78 ou 91 aminoácidos. Transcritos contendo essas sequências alternativas, no entanto, foram detectados em frequência muito baixa das leituras de RNA-seq e é difícil prever se são de fato infrequentes ou estão sujeitos a mecanismos como o de degradação de mRNA mediada por variações de sequência sem sentido (*nonsense-mediated decay*, NMD). O salto dos éxons 13 e 14, por sua vez, também foram detectados numa fração das leituras. As proteínas preditas produzidas por transcritos contendo esses eventos contém uma região deletada que permanece em fase de leitura mas leva à perda de resíduos de cisteína conservados (KNOWLES, 2011; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Apesar de esses eventos não afetarem os domínios funcionais conhecidos, é de se esperar que alterações na estrutura terciária ocorram devido à mudança na sequência primária e perda de resíduos de cisteína que potencialmente formariam ligações dissulfeto.

Desregulações na expressão de NTPDase5 foram encontradas em muitos tipos tumorais, porém as associações com malignidade e pior prognóstico se dão tanto com níveis mais altos ou mais baixos de expressão, dependendo do câncer (BLÁNQUEZ et al., 2002, 2004; VILLAR et al., 2007; XUE et al., 2015; ZADRAN et al., 2012). Nesse trabalho encontramos uma associação entre os níveis globais de *ENTPD5* ajustados para variáveis clínicas e um melhor prognóstico para adenocarcinomas de cólon e carcinomas de célula clara renal, e um pior prognóstico para glioma de baixo grau (II e III) e sarcoma. Essa associação em tumores de cólon já havia sido descrita (MIKULA et al., 2011), mas surpreendentemente, quando se avalia o impacto dos níveis globais de *ENTPD5* usando os éxons terminadores como covariáveis, se encontra que o uso alternativo do éxon 17 é um fator de proteção mas os níveis de mRNA de *ENTPD5* deixam de contribuir para o HR. Isso significa que para pacientes com maior porcentagem de uso do éxon 17, o nível de expressão de mRNA não dá um risco adicional. É possível que o nível de expressão de mRNA contribua para o risco de mortalidade quando avaliado isoladamente porque está correlacionado positivamente com uso do éxon 17. O mesmo padrão foi observado para carcinoma de célula clara renal. Além disso, também encontramos que os gliomas de baixo grau seguem o mesmo padrão dos glioblastomas - que são gliomas de grau IV – nos quais a expressão de *ENTPD5* é um fator de risco (ZADRAN et al., 2012). Nós também encontramos que para adenocarcinomas de pulmão e pâncreas o uso do éxon 17 é um fator de risco – e do 19, proteção. O uso alternativo de aceptores no éxon 6 parece afetar o risco de mortalidade dos pacientes tanto como fator de risco e proteção. Por outro lado, o salto de éxons não impactou a sobrevida da maior parte dos pacientes ou então foi um fator de proteção. Dessa forma nesse trabalho fomos capazes de encontrar padrões de impacto que parecem ser específicos para tipos tumorais e corroboram com achados anteriores na caracterização do papel dual da *ENTPD5* no câncer.

A *ENTPD5* tem recebido grande atenção dos pesquisadores do câncer nos últimos anos com a descoberta de seus impactos no estresse do retículo endoplasmático (SHEN et al., 2011), no metabolismo (FANG et al., 2010), na invasão (WIRTHSCHAFT et al., 2019) e metástases (VOGIATZI et al., 2016). Sua drogabilidade também foi recentemente avaliada e considerada promissora para inibidores de pequenas moléculas (DURST; RATIA; LAVIE, 2019). Além disso, a

expressão de NTPDase5 também tem sido proposta como marcador de prognóstico e para diferenciar tipos histológicos (FRIDLEY et al., 2018; XUE et al., 2015). Esse estudo contribui para a literatura elucidando uma incerteza de duas décadas sobre a hipótese do proto-oncogene humano de *ENTPD5* e também alertando os pesquisadores sobre a importância de levar em consideração as variantes de *splicing* de *ENTPD5* em estudos posteriores sobre suas funções e adequação como um alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M. et al. miRCancerdb: a database for correlation analysis between microRNA and gene expression in cancer. **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 103, 7 fev. 2018.
- ANNA, A.; MONIKA, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. **Journal of Applied Genetics**, v. 59, n. 3, p. 253–268, ago. 2018.
- BASU, S.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; KIRLEY, T. L. Conserved lysine 79 is important for activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3). **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 1, p. 51–58, dez. 2004.
- BAYLEY, J.-P.; DEVILEE, P. The Warburg effect in 2012. **Current Opinion in Oncology**, v. 24, n. 1, p. 62–67, 2012.
- BECKENKAMP, A. et al. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 92, n. 2, p. 95–104, abr. 2014.
- BLÁNQUEZ, M. J. et al. Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia: PCPH EXPRESSION IN LARYNGEAL CARCINOGENESIS. **Molecular Carcinogenesis**, v. 35, n. 4, p. 186–195, dez. 2002.
- BLÁNQUEZ, M. J. et al. Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in human breast cancers. **International journal of oncology**, v. 25, n. 4, p. 821–830, 2004.
- BONNAL, S. C.; LÓPEZ-OREJA, I.; VALCÁRCEL, J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer — implications for care. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 8, p. 457–474, ago. 2020.
- CARROLL, M.; BORDEN, K. L. B. The Oncogene eIF4E: Using Biochemical Insights to Target Cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 5, p. 227–238, maio 2013.
- CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, 1 maio 2012.
- CHADWICK, B. P.; FRISCHAUF, A.-M. The CD39-like Gene Family: Identification of Three New Human Members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), Their Murine Homologues, and a Member of the Gene Family from *Drosophila melanogaster*. **Genomics**, v. 50, n. 3, p. 357–367, jun. 1998.
- CHEN, Y.; WANG, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D127–D131, 8 jan. 2020.

CHERRY, S.; LYNCH, K. W. Alternative splicing and cancer: insights, opportunities, and challenges from an expanding view of the transcriptome. **Genes & Development**, v. 34, n. 15–16, p. 1005–1016, 1 ago. 2020.

CHIPMAN, L. B.; PASQUINELLI, A. E. MiRNA Targeting – Growing Beyond the Seed. **Trends in genetics : TIG**, v. 35, n. 3, p. 215–222, mar. 2019.

CRAWFORD, P. A. et al. Characterization of an alternative splice variant of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): A possible modulator of nucleotidase activity and purinergic signaling. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 457, n. 1, p. 7–15, 1 jan. 2007.

CURRY, N. L. et al. Pten-Null Tumors Cohabiting the Same Lung Display Differential AKT Activation and Sensitivity to Dietary Restriction. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 8, p. 908–921, 1 ago. 2013.

DENG, M. et al. Firebrowser: an R client to the Broad Institute's Firehose Pipeline. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2017, 6 jan. 2017.

DURST, M. A.; RATIA, K.; LAVIE, A. Identifying small molecule probes of ENTPD5 through high throughput screening. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0210305, 26 jun. 2019.

DVINGE, H. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. **FEBS Letters**, v. 592, n. 17, p. 2987–3006, 2018.

FANG, M. et al. The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 711–724, 2010.

FRIDLEY, B. L. et al. Transcriptomic Characterization of Endometrioid, Clear Cell, and High-Grade Serous Epithelial Ovarian Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 27, n. 9, p. 1101–1109, set. 2018.

FU, X.-D.; ARES, M. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 10, p. 689–701, out. 2014.

GAO, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, p. p11, 2 abr. 2013.

GWAK, H. et al. Resveratrol triggers ER stress-mediated apoptosis by disrupting N-linked glycosylation of proteins in ovarian cancer cells. v. 371, n. 2, p. 347–353, 2016.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HUA, H. et al. Targeting mTOR for cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, 5 jul. 2019.

IZUMI, M. et al. Substrate Recognition of Glycoprotein Folding Sensor UGGT Analyzed by Site-Specifically ¹⁵N-Labeled Glycopeptide and Small Glycopeptide Library Prepared by Parallel Native Chemical Ligation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 33, p. 11421–11426, 23 ago. 2017.

KHORASANI, M. et al. Analysis of Differential Expression of microRNAs and Their Target Genes in Prostate Cancer: A Bioinformatics Study on Microarray Gene Expression Data. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 8, n. 2, jul. 2019.

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21–45, mar. 2011.

KRIŠTIĆ, J.; LAUC, G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. In: LAUC, G.; WUHRER, M. (Eds.). . **High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1503p. 1–12.

LEE, Y.; RIO, D. C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 291–323, 2 jun. 2015.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar. 2016.

LIU, J. et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 400- 416.e11, abr. 2018.

LIU, T. et al. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 6, p. 2070–2080, dez. 2005.

MACCARTHY, C. M.; NOTARIO, V. The ENTPD5/mt-PCPH oncoprotein is a catalytically inactive member of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 4, p. 1244–1252, 2013.

MIKULA, M. et al. Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. **Functional & Integrative Genomics**, v. 11, n. 2, p. 215–224, jun. 2011.

MULERO, J. J. et al. CD39-L4 Is a Secreted Human Apyrase, Specific for the Hydrolysis of Nucleoside Diphosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20064–20067, 16 jul. 1999.

MULERO, J. J. et al. Biochemical Characterization of CD39L4. **Biochemistry**, v. 39, n. 42, p. 12924–12928, out. 2000.

MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 251–259, mar. 2005.

OKAWA, H. et al. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 79–88, jan. 2006.

- O'KEEFFE, M. G. et al. Distribution of NTPDase5 and NTPDase6 and the regulation of P2Y receptor signalling in the rat cochlea. **Purinergic Signalling**, v. 6, n. 2, p. 249–261, 2010.
- O'KEEFFE, M. G. et al. Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 133, n. 4, p. 425–436, abr. 2010.
- PAEZ, J. et al. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. **International Journal of Oncology**, 1 dez. 2001.
- PERILLI, L. et al. Circulating miR-182 is a biomarker of colorectal adenocarcinoma progression. **Oncotarget**, v. 5, n. 16, p. 6611–6619, 30 ago. 2014.
- PIZZINI, S. et al. Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 589, 2013.
- RAHMAN, M. A. et al. Hallmarks of Splicing Defects in Cancer: Clinical Applications in the Era of Personalized Medicine. **Cancers**, v. 12, n. 6, 28 maio 2020.
- RECIO, J. A. et al. cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse PcpH proto-oncogene. v. 26, n. 2, p. 130–6, 26 out. 1999.
- RECIO, J. A. et al. Both normal and transforming PCPH proteins have guanosine diphosphatase activity but only the oncoprotein cooperates with ras in activating extracellular signal-regulated kinase ERK1. **Cancer Research**, v. 60, n. 6, p. 1720–1728, 2000.
- RECIO, J. A. et al. Partial depletion of intracellular ATP mediates the stress-survival function of the PCPH oncoprotein. **Cancer Research**, v. 62, n. 9, p. 2690–2694, 2002.
- RECIO, J. A.; ZAMBRANO, N.; NOTARIO, V. The Human PCPH Proto-oncogene: cDNA Identification, Primary Structure, Chromosomal Mapping, and Expression in Normal and Tumor Cells. v. 62, n. 1, p. 8, 28 maio 2000.
- REGADERA, J. et al. PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. **International Journal of Oncology**, 1 mar. 2006.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409, 30 maio 2006.
- RODRIGUES, A. S.; PEREIRA, S. L.; RAMALHO-SANTOS, J. Stem metabolism: Insights from oncometabolism and vice versa. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 7, p. 165760, jul. 2020.
- ROUZAUT, A; RECIO, J. A; NOTARIO, V. Expression of the protein product of the PCPH proto-oncogene in human tumor cell lines. **Radiation research**, v. 155, n. 1 Pt 2, p. 181–187, 2001.

- RYAN, M. et al. TCGASpliceSeq a compendium of alternative mRNA splicing in cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1018-1022, 4 jan. 2016.
- SHEN, Z. et al. ENTPD5, an Endoplasmic Reticulum UDPase, Alleviates ER Stress Induced by Protein Overloading in AKT-Activated Cancer Cells. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 76, n. 0, p. 217–223, 1 jan. 2011.
- SOLANAS, M. et al. Deregulated expression of the *PCPH* proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: PCPH Expression in Mammary Tumors. **Molecular Carcinogenesis**, v. 33, n. 4, p. 219–227, abr. 2002.
- TANG, X. et al. MicroRNA-215-3p Suppresses the Growth, Migration, and Invasion of Colorectal Cancer by Targeting FOXM1: **Technology in Cancer Research & Treatment**, 13 out. 2019.
- TIRADO, O. M. et al. The PCPH oncoprotein antagonizes the proapoptotic role of the mammalian target of rapamycin in the response of normal fibroblasts to ionizing radiation. **Cancer Research**, v. 63, n. 19, p. 6290–6298, 2003.
- TOMCZAK, K.; CZERWIŃSKA, P.; WIZNEROWICZ, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. **Contemporary Oncology**, v. 19, n. 1A, p. A68–A77, 2015.
- TROMBETTA, E. S.; HELENIUS, A. Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: Identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. **EMBO Journal**, v. 18, n. 12, p. 3282–3292, 1999.
- VELASCO, J. A. et al. *cph*, a novel oncogene which cooperates with H-ras in the transformation of NIH3T3 fibroblasts. **Oncogene**, v. 9, n. 7, p. 2065–2069, jul. 1994.
- VELASCO, J. A.; AVILA, M. A.; NOTARIO, V. The product of the *cph* oncogene is a truncated, nucleotide-binding protein that enhances cellular survival to stress. **Oncogene**, v. 18, n. 3, p. 689–701, jan. 1999.
- VILLAR, J. et al. PCPH/ENTPD5 Expression Enhances the Invasiveness of Human Prostate Cancer Cells by a Protein Kinase C δ -Dependent Mechanism. **Cancer Research**, v. 67, n. 22, p. 10859–10868, 15 nov. 2007.
- VILLAR, J. et al. PCPH/ENTPD5 Expression Confers to Prostate Cancer Cells Resistance against Cisplatin-Induced Apoptosis through Protein Kinase C - Mediated Bcl-2 Stabilization. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 102–110, 1 jan. 2009.
- VOGIATZI, F. et al. Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 52, p. E8433–E8442, 27 dez. 2016.
- WALSH, J. et al. Identification and quantification of the basal and inducible Nrf2-dependent proteomes in mouse liver: Biochemical, pharmacological and toxicological implications. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 171–187, ago. 2014.

WANG, C. et al. 4EBP1/eIF4E and p70S6K/RPS6 axes play critical and distinct roles in hepatocarcinogenesis driven by AKT and N-Ras proto-oncogenes in mice. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 200–213, jan. 2015.

WANG, W. et al. Heritability and Genome-Wide Association Analyses of Serum Uric Acid in Middle and Old-Aged Chinese Twins. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 75, 6 mar. 2018.

WATSON, J. D. (ED.). **Molecular biology of the gene**. Seventh edition ed. Boston: Pearson, 2014.

WEI, J. et al. ER-associated ubiquitin ligase HRD1 programs liver metabolism by targeting multiple metabolic enzymes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3659, dez. 2018.

WIRTHSCHAFT, P. et al. RhoA regulates translation of the Nogo-A decoy SPARC in white matter-invading glioblastomas. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 2, p. 275–293, ago. 2019.

XUE, Y. et al. ENTPD5 induces apoptosis in lung cancer cells via regulating caspase 3 expression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

ZADRAN, S. et al. ENTPD5-mediated modulation of ATP results in altered metabolism and decreased survival in gliomablastoma multiforme. **Tumor Biology**, v. 33, n. 6, p. 2411–2421, dez. 2012.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 19, p. 6882–6887, 13 maio 2008.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1–2, p. 44–56, jan. 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 1 set. 2012.



Rafael Paschoal de Campos

Bolsista de Mestrado do CNPq


Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4517666094727808>

ID Lattes: 4517666094727808

Última atualização do currículo em 30/06/2020


Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Já participou de projetos envolvendo a biologia celular e molecular de gliomas, células musculares lisas vasculares e a glândula tireoide em situações normais e patológicas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Rafael Paschoal de Campos
Nome em citações bibliográficas	DE CAMPOS, R.P.;CAMPOS, RP;DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL;DE CAMPOS, R. P.
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/4517666094727808

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador:  Guido Lenz. Coorientador: Márcia Rosângela Wink. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2013 - 2018	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Investigação do papel da NTPDase5 em gliomas. Orientador: Márcia Rosângela Wink.

Formação Complementar

2016 - 2016	VIII Curso de Verão de Pesquisa em Oncologia. (Carga horária: 90h). Instituto Nacional de Câncer, INCA, Brasil.
--------------------	--

Atuação Profissional

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional 2015 - 2018	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20
Vínculo institucional 2014 - 2015	Vínculo: Aluno de Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Aluno de Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 12
Vínculo institucional 2013 - 2014	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional

2017 - 2017

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário do Serviço de Patologia Clínica, Carga horária: 30

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - 2018

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário do NBLI, Carga horária: 20

Projetos de pesquisa

2014 - Atual	Estabilidade dos genes de referência em fibroblastos, melanomas e queratinócitos Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Rafael Paschoal de Campos - Integrante / Márcia Rosângela Wink - Coordenador / Jéssica Gonçalves Azevedo - Integrante.
2014 - Atual	Caracterização da sinalização purinérgica em células musculares lisas vasculares isoladas (CMLVs) da aorta de ratos Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Rafael Paschoal de Campos - Integrante / Márcia Rosângela Wink - Coordenador / Ana Paula Santin Bertoni - Integrante.
2014 - Atual	Caracterização das enzimas do sistema purinérgico em células isoladas de tecido normal e anormal de tireoide humana Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Rafael Paschoal de Campos - Integrante / BERTONI, A.P.S. - Integrante / WINK, M.R. - Coordenador.
2013 - Atual	Influência da superexpressão do proto-oncogene PCPH/Ecto-NTDPase5 em linhagens de gliomas e em astrócitos Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Rafael Paschoal de Campos - Integrante / Márcia Rosângela Wink - Coordenador / Paula Andreghetto Bracco - Integrante.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Citologia e Biologia Celular.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Italiano	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2018	Mérito Acadêmico - Melhor aluno de Biomedicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Conselho Regional de Biomedicina da 5ª Região.
2017	Destaque na Categoria Pesquisa - III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSA, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
2014	Destaque na Categoria Pesquisa - Biologia Celular da III Semana Acadêmica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; BRACCO, PAULA ANDREGHETTO ; **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; LUTZ, BRUNA SCHWENGBER ; ASSIS-BRASIL, BEATRIZ MARIA ; MEYER, ERIKA LAURINI DE SOUZA ; SAFFI, JENIFER ; BRAGANHOL, ELIZANDRA ; FURLANETTO, TANIA WEBER ; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA . Activity of ecto-5'-nucleotidase (NT5E/CD73) is increased in papillary thyroid carcinoma and its expression is associated with metastatic lymph nodes. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY JCR*, v. 479, p. 54-60, 2019.
2. BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; TSAO, MARISA ; BRAGANHOL, ELIZANDRA ; FURLANETTO, TANIA WEBER ; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA . Extracellular ATP is Differentially Metabolized on Papillary Thyroid Carcinoma Cells Surface in Comparison to Normal Cells. *CANCER MICROENVIRONMENT JCR*, v. 11, p. 61-70, 2018.
3. **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; SCHULTZ, IAGO CARVALHO ; DE ANDRADE MELLO, PAOLA ; DAVIES, SAMUEL ; GASPARIN, MANUELA SANGALLI ; BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; BUFFON, ANDRÉIA ; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA . Cervical cancer stem like cells: Systematic review and identification of reference genes for gene expression. *CELL BIOLOGY INTERNATIONAL JCR*, v. 42, p. 139-152, 2017.
4. ★ NAASANI, LILIANA I. SOUS ; RODRIGUES, CRISTIANO ; **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; BECKENKAMP, LIZIANE RAQUEL ; ISER, ISABELE C. ; BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; WINK, MÁRCIA R. . Extracellular Nucleotide Hydrolysis in Dermal and Limbal Mesenchymal Stem Cells: a Source of Adenosine Production. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY JCR*, v. 118, p. 2430-2442, 2017.
5. ★ ISER, I.C. ; **DE CAMPOS, R.P.** ; BERTONI, A.P.S. ; WINK, M.R. . Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in C6 glioma cell line treated with conditioned medium from adipose-derived stem cell. *Biomedicine & Pharmacotherapy JCR*, v. 75, p. 75-82, 2015.

Citações: [WEB OF SCIENCE](#) 8 | [SCOPUS](#) 6

Capítulos de livros publicados

1. BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; Iser, Isabele Cristiana ; **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; Wink, Márcia Rosângela . Normalization in Human Glioma Tissue. *Methods in Molecular Biology*. 1ed.: Springer New York, 2020, v. , p. 175-190.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; BECKENKAMP, LIZIANE RAQUEL ; LENZ, G. ; Wink, MR . Análise da expressão de ENTPD5 e genes correlacionados em gliomas. In: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre. Anais da 38ª Semana Científica do HCPA. Porto Alegre: Clinical and Biomedical Research, 2018. v. 38. p. 59-59.
2. ASSIS-BRASIL, B. ; BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; **DE CAMPOS, R.P.** ; LUTZ, B ; MEYER, E ; SAFFI, J ; BRAGANHOL, E ; WINK, MÁRCIA R. ; FURLANETTO, TW . Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is overexpressed in papillary thyroid cancer. In: 29th European Congress of Pathology, 2017, Amsterdã, Holanda. 29th European Congress of Pathology, 2017.
3. **DE CAMPOS, R.P.** ; BERTONI, APS ; FURLANETTO, TW ; Wink, MR . Perfil de hidrólise extracelular de nucleotídeos em células tireoidianas normais e tumorais. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA. Porto Alegre: Clinical & Biomedical Research, 2016. v. 36. p. 57-57.
4. **DE CAMPOS, R.P.** ; ISER, I.C. ; BERTONI, APS ; Wink, MR . Análise da expressão de genes candidatos a normalizadores em linhagem de glioma C6 tratada com meio condicionado de células-tronco mesenquimais. In: XXII Mostra UNISINOS de Iniciação Científica e Tecnológica, 2015, São Leopoldo, RS. Anais da XXII Mostra UNISINOS de Iniciação Científica e Tecnológica, 2015.
5. ★ **DE CAMPOS, R.P.** ; NEIS, A. S. K. T. ; BERTONI, APS ; Wink, MR . Análise de Genes Normalizadores em Células Musculares Lisas Vasculares. In: 34ª Semana Científica do HCPA, 2014, Porto Alegre. Clinical and Biomedical Research, 2014. v. 34. p. 24.

Artigos aceitos para publicação

1. BECKENKAMP, L. R. ; DA FONTOURA, D. M. S. ; KORB, V. G. ; **DE CAMPOS, R. P.** ; ONZI, G. R. ; ISER, I. C. ; BERTONI, A. P. S. ; SÉVIGNY, J. ; LENZ, G. ; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA . Immortalization of Mesenchymal Stromal Cells by TERT Affects Adenosine Metabolism and Impairs their Immunosuppressive Capacity. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2020.
2. BERTONI, ANA PAULA SANTIN ; **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; TAMAJUSUKU, ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI ; STEFANI, GIUSEPPE POTRICK ; BRAGANHOL, ELIZANDRA ; BATTASTINI, ANA MARIA OLIVEIRA ; WINK, MÁRCIA ROSÂNGELA . Biochemical analysis of ectonucleotidases on primary rat vascular smooth muscle cells and in silico investigation of their role in vascular diseases. *LIFE SCIENCES JCR*, 2020.

Apresentações de Trabalho

1. **DE CAMPOS, RAFAEL PASCHOAL** ; BECKENKAMP, LIZIANE RAQUEL ; ISER, I.C. ; PREZZI, F. ; ONZI, G. R. ; LENZ, G. ; WINK, MÁRCIA R. . Evaluation of NTPDase5 secretion in gliomas. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. **CAMPOS, RP** ; SCHULTZ, IAGO CARVALHO ; DE ANDRADE MELLO, PAOLA ; DAVIES, SAMUEL ; GASPARIN, MANUELA SANGALLI ; BERTONI, APS ; BUFFON, ANDRÉIA ; WINK, MÁRCIA R. . Identification of Reference Genes for Gene Expression Studies in Cervical Cancer Stem-like Cells. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. **DE CAMPOS, R.P.** ; BERTONI, APS ; FURLANETTO, TW ; Wink, MR . Desregulação do metabolismo de nucleotídeos em linhagens de carcinoma papilífero de tireoide. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. ★ **DE CAMPOS, R.P.**; ISER, I.C. ; BERTONI, APS ; Wink, MR . Análise da expressão de genes candidatos a normalizadores em linhagem de glioma C6 tratada com meio condicionado de células-tronco mesenquimais. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. ★ **DE CAMPOS, R.P.**; Bracco, PA ; BERTONI, APS ; Wink, MR . Superexpressão do proto-oncogene PCPH/Ecto-NTPDase5 em linhagens de gliomas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 38ª Semana Científica do HCPA. Análise da expressão de ENTPD5 e genes correlacionados em gliomas. 2018. (Outra).
2. 3º Simpósio de Imuno-oncologia do Hospital do Câncer Mãe de Deus. 2018. (Simpósio).
3. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Evaluation of NTPDase5 secretion in gliomas. 2018. (Outra).
4. III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA. Identification of Reference Genes for Gene Expression Studies in Cervical Cancer Stem-like Cells. 2017. (Outra).
5. 36ª Semana Científica do HCPA. Perfil de hidrólise extracelular de nucleotídeos em células tireoidianas normais e tumorais. 2016. (Outra).
6. II Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA. Desregulação do metabolismo de nucleotídeos em linhagens de carcinoma papilífero de tireoide. 2016. (Outra).
7. I Curso de Toxicidade Genética: Causas, Consequências e Ensaio Pré-clínicos. 2015. (Outra).
8. III Jornada do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2015. (Outra).
9. I Simpósio de Genética, Psiquiatria e Saúde Mental da LIPSAM. 2015. (Simpósio).
10. X Jornada do Programa de Pós-graduação em Patologia. 2015. (Outra).
11. XXII Mostra UNISINOS de Iniciação Científica e Tecnológica. Análise da expressão de genes candidatos a normalizadores em linhagem de glioma C6 tratada com meio condicionado de células-tronco mesenquimais. 2015. (Outra).
12. 34ª Semana Científica do HCPA. Análise de Genes Normalizadores em Células Musculares Lisas Vasculares. 2014. (Outra).
13. III Semana Acadêmica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Superexpressão do proto-oncogene PCPH/Ecto-NTPDase5 em linhagens de gliomas. 2014. (Outra).
14. II Semana Acadêmica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2013. (Outra).