

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus Araraquara
Departamento de Análises Clínicas
Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular

Investigação do papel de HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*) na resistência de células de glioblastoma multiforme à radiação ionizante

Orientando: Rodolfo Bortolozo Serafim

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Valente

Araraquara

2014

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

RODOLFO BORTOLOZO SERAFIM

Investigação do papel de HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*) na resistência de células de glioblastoma multiforme à radiação ionizante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biologia Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa Dra Valeria Valente

**Araraquara, SP
2014**

SUMÁRIO

	Lista de siglas e abreviaturas	04
	Lista de figuras	06
	Lista de tabelas	08
	Resumo	09
	Abstract	10
1.	Introdução	11
2.	Objetivo Geral	20
3.	Objetivos Específicos	20
4.	Material e Métodos	21
4.1	Linhagens celulares	21
4.2	Tratamento com radiação ionizante	21
4.3	Extração de RNA e PCR em tempo real	22
4.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e western blot	23
4.5	Localização subcelular de HJURP	23
4.6	Quantificação de quebras na dupla fita de DNA	24
4.7	Transfecção de células com siRNAs	24
4.8	Ensaio de apoptose e morte celular	25
4.9	Imunoprecipitação de HJURP	25
4.10	Ensaio de senescência celular	26
5.	Resultados e Discussão	27
5.1	Avaliação do nível de RNA mensageiro de HJURP nos fibroblastos não tumorais HDPC e nas linhagens de GBM T98G, U87MG, U138, U251 e U343	27
5.2	Avaliação do nível de expressão da proteína HJURP nas células HDPC, T98G, U87MG, U138 e U343 antes e após tratamento com radiação ionizante	28
5.3	Avaliação da localização subcelular de HJURP nas células U87 e T98G	30
5.4	Quantificação da fragmentação de DNA após tratamento com radiação ionizante nas linhagens de GBM após o silenciamento de HJURP	31
5.5	Avaliação de apoptose e morte celular	36
5.6	Análise de senescência celular	37
5.7	Busca pelos parceiros de HJURP nas células T98G e U87MG através de imunoprecipitação	40
6.	Conclusão	43
7.	Referências Bibliográficas	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CDK4 - Cyclin-Dependent Kinase 4

CENP-A – Centromere Protein A

Chk1 - Checkpoint Kinase 1

Chk2 - Checkpoint Kinase 2

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEPC - diethylpyrocarbonate

DNA- ácido desoxirribonucleico

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

GBM – glioblastoma multiforme

Gy - gray

HDF – human dermal fibroblasts

HDPC – human dental pulp cells

HJURP - Holliday Junction Recognizing Protein

hMSH5 - mutS Homolog 5

HPRT - Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase

HUVEC - human umbilical vein endothelial cells

IDH1 - Isocitrate Dehydrogenase 1

kDa - kilodalton

KEL - Kell Blood Group

MDM2 - E3 Ubiquitin Protein Ligase

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NBS1 - Nibrin

NF1 - Neurofibromin 1

PBS - phosphate buffered saline

PCR - polymerase chain reaction

PDGFRA - Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog

QKI - KH Domain Containing

RNA – ácido ribonucleico

RPM – rotação por minuto

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

siCONTROL - small interfering RNA controle

siHJURP - small interfering RNA contra HJURP

siRNA – small interfering RNA

SPTA1 - Spectrin, Alpha, Erythrocytic 1

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TCHH - *Trichohyalin*

TP53 – Tumor Protein 53

WT – wild type

ZTR1 - Cytoplasmic Zinc Uptake Transporter

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos astrocitomas de acordo com a organização mundial da saúde.

Figura 2. Classificação molecular dos GBMs.

Figura 3. Mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga.

Figura 4. Nucleossomo centromérico contendo CENP-A.

Figura 5. Expressão relativa do mRNA de HJURP em fibroblastos normais (HDPC) e em linhagens de GBM.

Figura 6. Produção da proteína HJURP em fibroblastos normais (HDPC) e em linhagens de GBM.

Figura 7. Produção da proteína HJURP em linhagens de GBM após tratamento com radiação ionizante.

Figura 8. Nível de produção da proteína HJURP em linhagens de GBM após tratamento com radiação ionizante.

Figura 9. Localização subcelular de HJURP em células U87MG.

Figura 10. Localização subcelular de HJURP em células T98G.

Figura 11. Quantificação dos danos no DNA de células de GBM silenciadas ou não para HJURP e submetidas à radiação ionizante.

Figura 12. Quantificação das taxas de apoptose e morte celular de células de GBM silenciadas ou não para HJURP e submetidas à radiação ionizante.

Figura 13. A morfologia das células U87MG é afetada após o silenciamento de HJURP.

Figura 14. Células U87MG entram em senescência prematura após silenciamento de HJURP.

Figura 15. Imunoprecipitação de HJURP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficiência do silenciamento de HJURP nas diferentes células utilizadas

Tabela 2. Porcentagens de células das linhagens RO, U87MG e T98G com atividade de SA- β -Gal detectável após o silenciamento de HJURP.

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e letal, e na maioria dos casos leva o paciente à morte em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. O tratamento é realizado com remoção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia. Entretanto, devido à alta resistência das células tumorais, frequentemente o tumor cresce novamente poucas semanas após a cirurgia. Recentemente demonstramos que HJURP (*Holliday Junction–Recognizing Protein*), uma nova proteína envolvida em reparo de DNA, está altamente superexpressa em células de glioblastoma. Esta proteína está também superexpressa em outros tipos tumorais, como câncer de pulmão e mama, sendo que maiores níveis de expressão de HJURP correlacionam-se com piores prognósticos de sobrevida em ambos os casos, assim como observamos para os pacientes com GBM. Neste trabalho vimos que os níveis de mRNA de HJURP estão aumentados nas linhagens celulares de GBM T98G, U138MG, U251MG e U343MG, porém não na linhagem U87MG que expressa níveis similares ao de fibroblastos não tumorais. Por análises de *western blot*, observamos uma redução nos níveis de HJURP após tratamento das células com radiação ionizante, sendo a redução mais proeminente na linhagem U251MG. Vimos ainda que o reparo de quebras na dupla-fita de DNA, induzidas pela radiação ionizante, ocorre de modo similar nas células de GBM U138MG, U251MG e U343MG silenciadas ou não para HJURP. Vimos também que células com silenciamento de HJURP foram mais sensíveis à radiação, apresentando maiores taxas de apoptose e morte celular em relação às células não silenciadas. Além disso, observamos que o silenciamento de HJURP promove senescência precoce na linhagem de GBM U87MG, enquanto que este efeito não é observado na linhagem T98G e em células RO, que são fibroblastos não tumorais. Conjuntamente, estes dados sugerem que HJURP está de alguma forma associada com o controle da atividade de reparo de DNA e a manutenção da viabilidade das células de GBM.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and lethal type of primary brain tumor, and usually leads the patient to death in approximately 14 months after diagnosis. The treatment consists of surgical removal of the tumor, followed by radiotherapy and chemotherapy. However, due to the high resistance of tumor cells, frequently the tumor grows again a few weeks after surgery. We recently demonstrated that HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*), a novel protein involved in DNA repair, is highly overexpressed in glioblastoma cells. This protein is also overexpressed in other tumor types, such as lung and breast cancer, in which higher expression levels are correlated with a poorer survival prognosis, as we also observed for GBM patients. In this study we found that HJURP mRNA levels are increased in the GBM cell lines T98G, U138MG, U251MG e U343MG, while in U87MG cells HJURP levels are similar to that of non-tumoral fibroblasts. We have also observed that the repair of DNA double-stranded breaks, induced by ionizing radiation, occurs similarly in GBM cells U138MG, U251MG and U343MG when HJURP is silenced or not. We also saw that U87MG and T98G cells were more sensitive to radiation when HJURP is knocked down, presenting higher rates of apoptosis and cell death. Moreover, we observed that HJURP silencing promotes premature senescence in the U87MG cell line, whereas T98G cells and non-tumoral fibroblasts are not significantly affected. Altogether, these data suggests that HJURP is related with the control of DNA repair activity and is required for the maintenance of GBM cells viability.

1. INTRODUÇÃO

Gliomas malignos: aspectos gerais

As células da glia são células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios e estão, aproximadamente, em mesmo número que os neurônios. Entre as células da glia, duas podem ser destacadas: os oligodendrócitos, responsáveis pela formação e manutenção da bainha de mielina dos axônios, e os astrócitos, células em forma de estrela que preenchem espaços entre neurônios, regulam a concentração de diversas substâncias como íons e neurotransmissores, oferecem sustentação aos neurônios e promovem a comunicação entre neurônios e vasos sanguíneos, sendo importantes para a nutrição das células nervosas. Provenientes das células da glia, os gliomas malignos são os tumores cerebrais mais comuns e mortais, especialmente os glioblastomas multiformes (GBM), que geralmente levam a morte do paciente em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico (MEIR, VAN *et al.*, 2010). Um tumor, quando tem sua origem definida a partir de astrócitos, é classificado como um astrocitoma. O GBM é o astrocitoma de grau mais avançado ou grau IV, ou seja, muito agressivo. É o tumor cerebral de maior incidência na população e de maior letalidade. Possui baixa capacidade de metástase, porém grande capacidade de infiltração pelo tecido cerebral (MEIR, VAN *et al.*, 2010).

O diagnóstico é feito quando pacientes têm convulsões e há aumento de pressão intracraniana, promovendo dores de cabeça, náuseas, vômitos, distúrbios visuais, disfunções cognitivas e sonolência (BEHIN *et al.*, 2003). Um aumento muito pequeno do volume tumoral irá desencadear um aumento na pressão intracraniana, explicando o agravamento da situação clínica que pode culminar em coma e morte. Quando há suspeita de tumor cerebral, o melhor método confirmatório é por imagem de ressonância magnética e amostras histológicas são necessárias para análise do tipo de tumor (BEHIN *et al.*, 2003). Os fatores mais indicados para o prognóstico são idade, estado geral do paciente e principalmente a classificação histológica, onde

gliomas de baixo grau apresentam células mais diferenciadas e menores índices mitóticos, e tumores de alto grau, como os GBMs, são altamente anaplásicos e proliferativos e, apresentam ainda, angiogênese e áreas de necrose (BEHIN *et al.*, 2003).

A radioterapia tem se mostrado uma abordagem importante para o tratamento destas lesões, pois avanços técnicos como, por exemplo, focar o feixe e adaptá-lo aos contornos irregulares dos tumores cerebrais permitem minimizar a dose para as estruturas vizinhas e modular a intensidade desses feixes (MEIR, VAN *et al.*, 2010). O agente alquilante temozolamida, que é usualmente administrado por via oral e apresenta um perfil toxicológico favorável, vem sendo utilizado juntamente com a radioterapia. Novas técnicas cirúrgicas, como a neuroendoscopia e a ressecção guiada por fluorescência, têm também se tornado importantes para o tratamento dos gliomas (MEIR, VAN *et al.*, 2010). Além das técnicas apresentadas, buscam-se medicamentos que bloqueiem uma ou mais das vias de proliferação alteradas como, por exemplo, o bevacizumab, um anticorpo que age contra o fator de crescimento endotelial vascular que já é utilizado na terapêutica e possui ação anti-angiogênica. Entretanto, os tratamentos utilizados atualmente ainda são paliativos, mesmo combinando cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia (BEHIN *et al.*, 2003). Sua ineficácia deve-se à elevada resistência das células tumorais e o grande problema é a recidiva e o rápido crescimento da nova massa tumoral, que pode voltar ao tamanho inicial em até 30 dias (MEIR, VAN *et al.*, 2010).

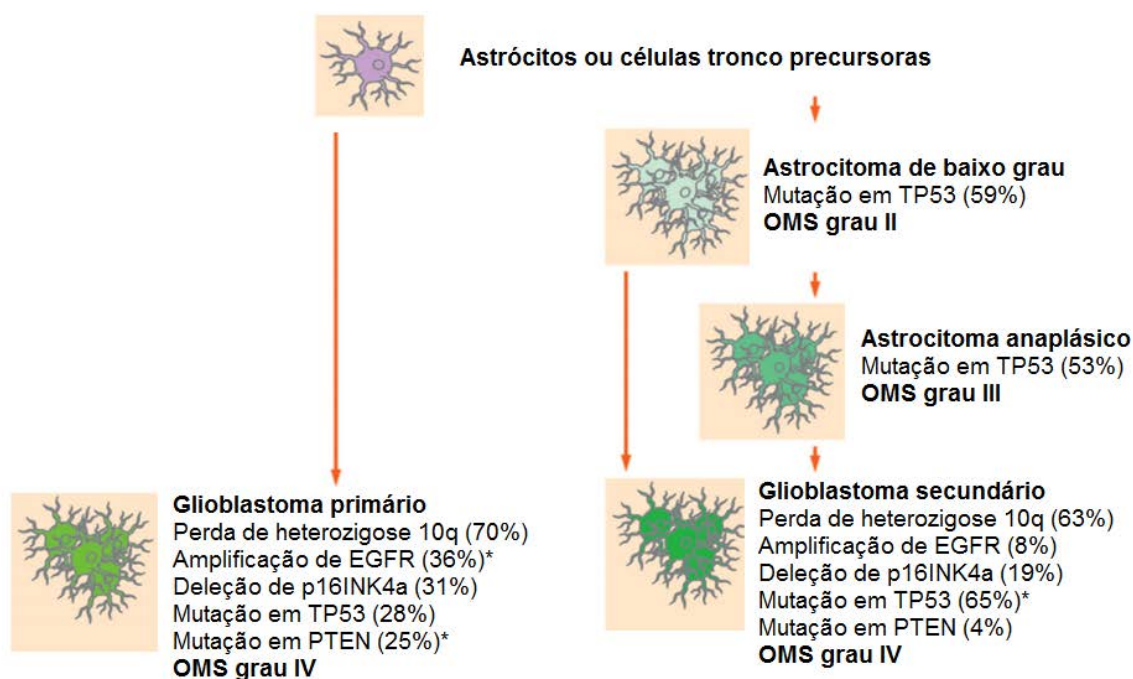
Classificação molecular dos glioblastomas multiformes

A caracterização dos perfis moleculares dos tumores vem sendo utilizada para aprimorar o diagnóstico e estimar o prognóstico dos pacientes (JANSEN *et al.*, 2010). O glioblastoma pode desenvolver-se ao longo de duas situações clínicas distintas, caracterizando este tumor como primário ou secundário (figura 1). O GBM primário apresenta-se já na sua primeira manifestação clínica como um tumor de alto grau,

enquanto o GBM secundário desenvolve-se ao longo de 5 a 10 anos a partir de um astrocitoma de menor grau (MAHER *et al.*, 2006). Análises moleculares revelaram que a amplificação do gene para o receptor fator de crescimento epidermal (EGFR) é predominante em GBMs primários enquanto que a perda de TP53 é uma característica genética de astrocitomas de menor grau e GBMs secundários, demonstrando que estes tumores apresentam diferenças genéticas que refletem na biologia das células tumorais (MAHER *et al.*, 2006). Apesar de cursos distintos, os GBMs primário e secundário chegam a características comuns como invasão do tecido adjacente, resistência à terapia e apresentam também alterações genéticas comuns como a perda de PTEN e CDKN2A e superexpressão de CDK4 e MDM2. Novas classes de GBM estão sendo identificadas e foi demonstrado que sua patogênese molecular é bastante heterogênea (TCGA, 2008). Atualmente, os glioblastomas são divididos em quatro subtipos moleculares distintos (figura 2) que respondem de maneira diferente aos tratamentos, o que revela que o refinamento da classificação genética do tumor pode permitir um tratamento mais direcionado e eficaz da patologia (MEIR, VAN *et al.*, 2010). Com as recentes análises moleculares em larga escala quatro subtipos de GBM foram definidos, são eles: proneural, neural, clássico e mesenquimal. Estes subtipos diferem no padrão global de expressão gênica e apresentam alterações genéticas características. O subtipo clássico é caracterizado pela superexpressão de EGFR e ausência de mutações em TP53. O grupo de pacientes que apresenta este tipo de tumor sobrevive por períodos maiores em resposta ao tratamento. O subtipo proneural apresenta mutação em TP53 em 54% dos casos, frequentemente apresenta também mutação em IDH1, superexpressão de PDGFRA (VERHAAK *et al.*, 2010), e possui grande semelhança molecular a GBMs secundários (MEIR, VAN *et al.*, 2010). A hipermetilação de diversas ilhas CpG está presente em grande parte dos tumores proneurais, o que resulta em padrões de expressão gênica distintos para os GBM proneurais hipermetilados e não hipermetilados (NOUSHMEHR *et al.*, 2010). O subtipo

proneural atinge pessoas mais jovens quando comparado aos outros subtipos e não responde bem ao tratamento. O subtipo mesenquimal geralmente apresenta mutações em NF1, PTEN e TP53 e os pacientes são mais responsivos ao tratamento. Já o subtipo neural possui um padrão de expressão mais próximo do tecido normal e os pacientes acometidos geralmente são mais idosos (VERHAAK *et al.*, 2010).

Figura 1. Classificação dos astrocitomas de acordo com a organização mundial da saúde.

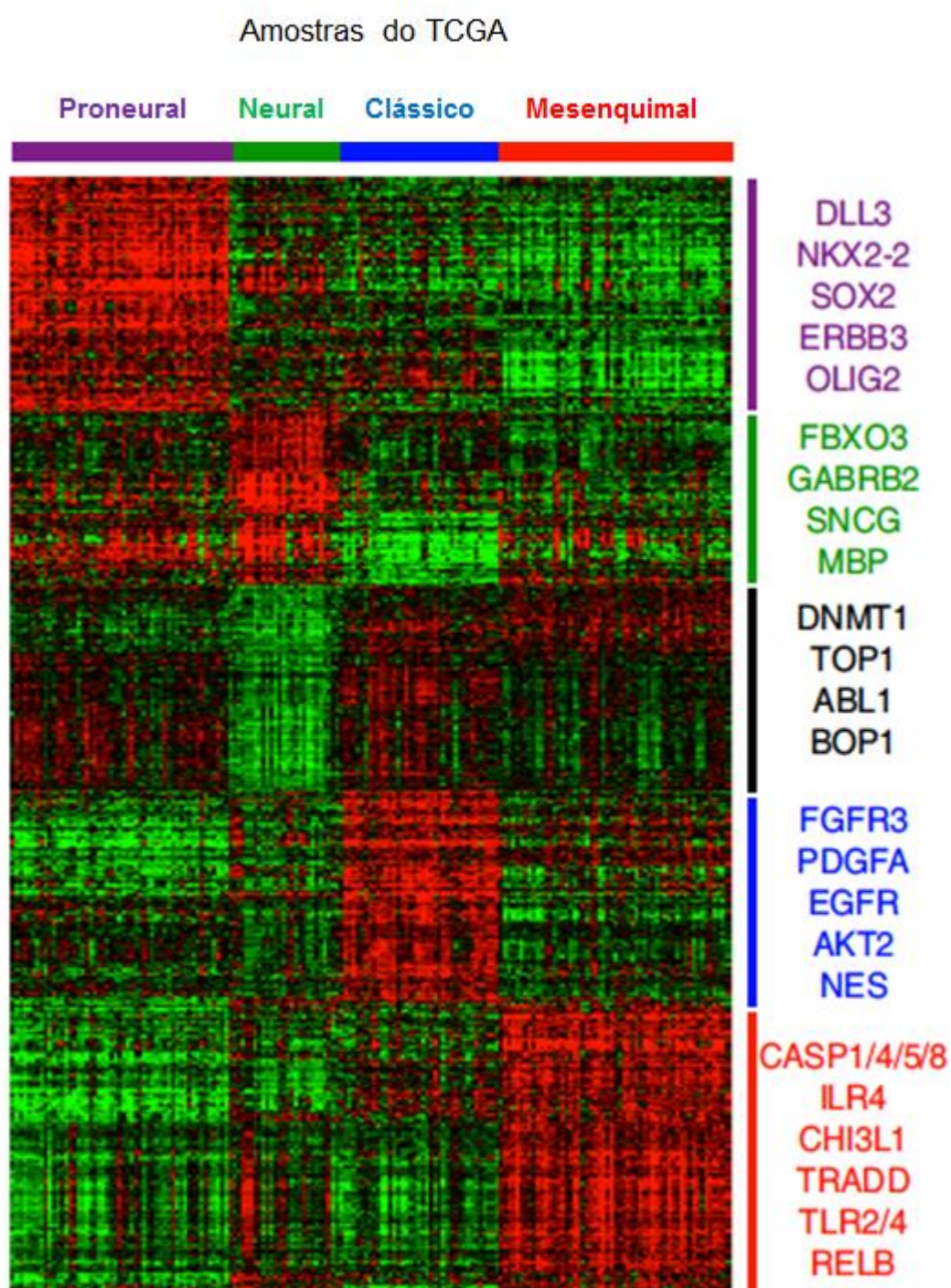


Ohgaki H and Kleihues P, 2007 The American Journal of Pathology **170** (5): 1445-51.

Muitos esforços estão sendo feitos para se entender as bases moleculares do surgimento e progressão dos astrocitomas, sendo o GBM o primeiro tipo tumoral a ser sistematicamente estudado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA). Em busca de novas alterações moleculares que possam ajudar a entender o comportamento agressivo e resistente dos GBM e auxiliar na busca de novas drogas, análises de sequenciamento em larga escala de mais de 500 amostras tumorais identificaram novos genes mutados que nunca tinham sido descritos, como ZTR1, SPTA1, TCHH, KEL e QKI (TCGA, 2013). Portanto, conhecendo-se melhor as

alterações genéticas dos diferentes subtipos de GBM, é possível a busca por terapias personalizadas que promovam tratamento mais eficiente e melhores prognósticos para os pacientes (JANSEN *et al.*, 2010).

Figura 2. Classificação molecular dos GBMs.



Verhaak, RGW et al. 2010, *Cancer Cell* 17, 98-110.

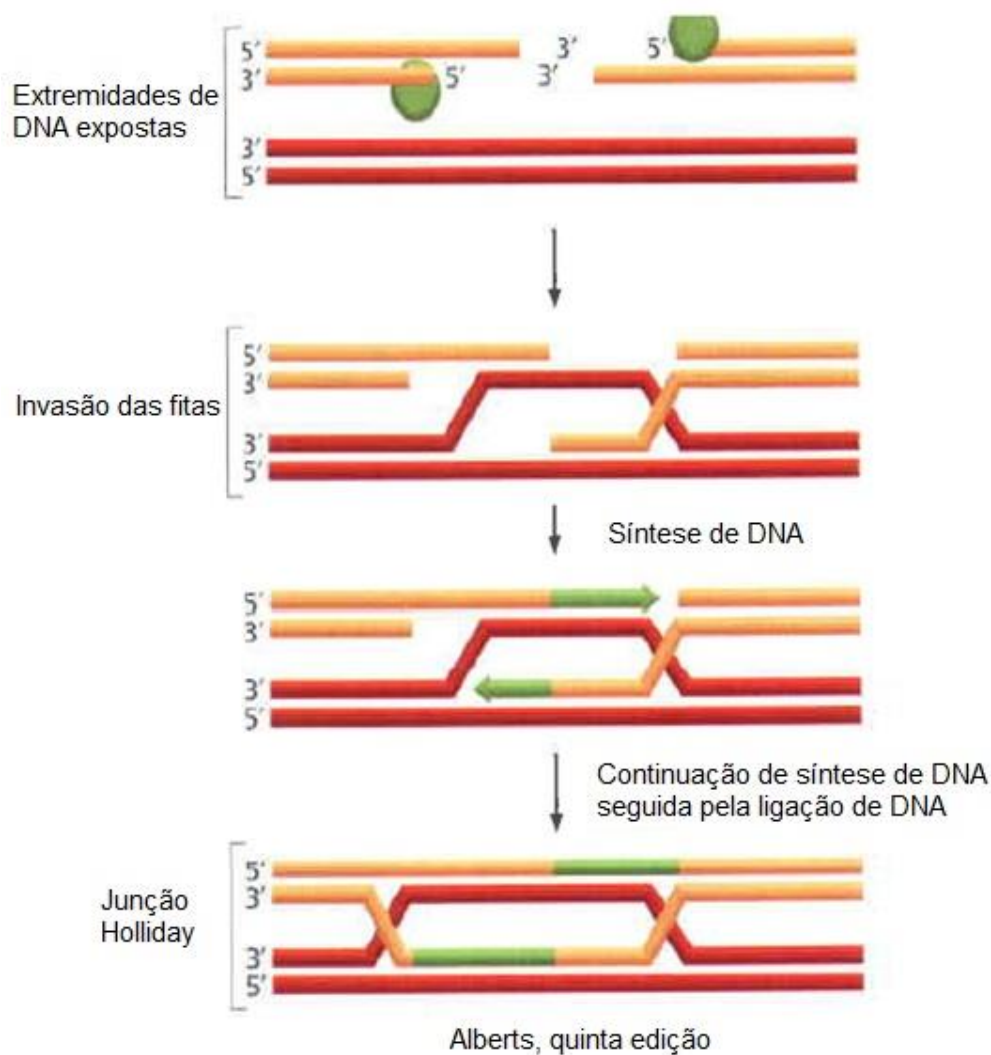
A proteína HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*) e o câncer

Uma alteração molecular recentemente detectada em glioblastomas é a superexpressão da proteína HJURP (*Holliday junction–recognizing protein*) (VALENTE *et al.*, 2009). Esta proteína está também superexpressa em outros tipos de tumores, como pulmão e mama (KATO *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2010). Através de experimentos de *microarray* com amostras de tumor de pulmão verificou-se que a quantidade da proteína HJURP estava aumentada em 139 de 252 amostras e que os pacientes com altos níveis de HJURP têm um tempo de sobrevida menor do que os pacientes que expressam baixos níveis de HJURP. Além disso, observou-se que a supressão de HJURP induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007). Outro trabalho demonstrou que o nível de expressão de HJURP está também aumentado em mais de 50% das linhagens de câncer de mama e que quanto maior o nível de expressão, menor o tempo de duplicação da célula, resultando em maior velocidade de proliferação (HU *et al.*, 2010). Foi visto também que, quando HJURP está superexpressa nos tumores de mama, os pacientes têm maior chance de recidiva e menor expectativa de vida (HU *et al.*, 2010).

Buscando-se entender as funções de HJURP na célula tumoral, foram realizados experimentos de imuno-precipitação que revelaram que HJURP interage com hMSH5 e NBS1, que são proteínas relacionadas ao reparo de quebras de fita dupla no DNA através do mecanismo de recombinação homóloga (figura 3). Estes dados demonstram que HJURP possui uma função importante no reparo de DNA após a exposição aos agentes genotóxicos (KATO *et al.*, 2007). Outro papel já identificado para HJURP é o recrutamento de CENP-A no nucleossomo dos centrômeros de cromossomos recém-replicados (FOLTZ *et al.*, 2009) (figura 4). Além disso, foi também demonstrado que HJURP é capaz de provocar a formação de novos centrômeros pelo recrutamento de CENP-A. Quando HJURP é recrutada artificialmente para regiões não centroméricas através de inserções no genoma de sequências do operon Lac e

expressão de HJURP fusionada com LacI, observa-se a formação de cinetócoros funcionais ectópicos (BARNHART *et al.*, 2011).

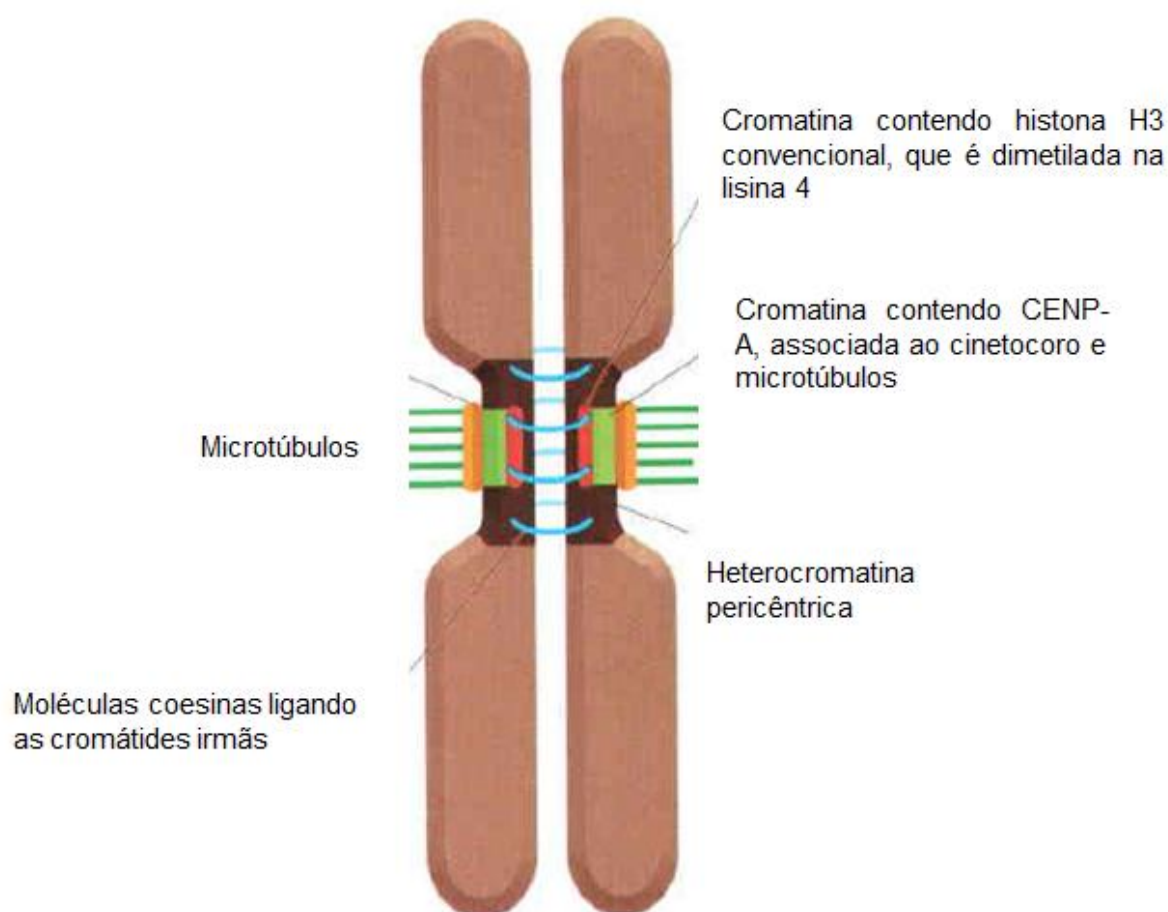
Figura 3. Mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga.



Foi observado ainda que a estabilidade de HJURP é regulada pela via de sinalização da quinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (KATO *et al.*, 2007). A quinase ATM é necessária para gerar os sinais intracelulares produzidos em resposta a diversos tipos de lesões no DNA, pois se associa com o local do dano e fosforila outras proteínas, ativando as maquinarias de reparo e proteínas quinases, como Chk1 e Chk2, que levam a interrupção do ciclo celular (ALBERTS, 2010). A sinalização de ATM pode estar envolvida com a resistência da célula à radiação, pois observa-se que

as células onde ATM está diminuída são mais sensíveis à radiação ionizante e outros eventos genotóxicos, apresentando elevados níveis de aberrações e defeitos no reparo de DNA (ROY *et al.*, 2006). Além disso, células provenientes de tumores de pulmão expostas a agentes que lesam o DNA como radiação e hidroxirúria, que causam quebras de fita dupla, apresentaram aumento de HJURP após o tratamento. Já em células deficientes em ATM também testadas, HJURP não foi detectada antes ou depois da exposição à radiação (KATO *et al.*, 2007). Em conjunto, esses resultados indicam que a variação dos níveis de HJURP depende da presença da sinalização de ATM e pode participar da resposta de reparo de quebras de fita-dupla no DNA.

Figura 4. Nucleossomo centromérico contendo CENP-A.



Alberts, quinta edição

Dados de nosso laboratório mostraram que o silenciamento de HJURP afeta a estabilidade de células tumorais de diferentes maneiras. A linhagem de glioblastoma multiforme T98G apresenta uma parada no ciclo celular em G2/M quando HJURP é silenciada. Já a linhagem U87MG não mostra alteração no ciclo celular e apresenta características morfológicas típicas de células senescentes quando HJURP é silenciada. Já as células RO, que são fibroblastos não tumorais, não são significativamente afetadas após o silenciamento (VALENTE *et al.*, 2013). Já foi demonstrado também que HJURP é essencial para manutenção da viabilidade de células tumorais em cultura e que os seus níveis de expressão são controlados, entre outros fatores, pela indução de danos ao DNA (Kato *et al.*, 2007; VALENTE *et al.*, 2013). Estes dados sugerem que esta proteína possa estar associada com a estabilidade cromossômica de células tumorais pela manutenção de centrômeros funcionais e também pela atividade de reparo. Portanto, neste trabalho investigamos a potencial relação de HJURP com a atividade de reparo de quebras na dupla-fita de DNA utilizando o modelo de células de GBM em cultura.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta proposta é investigar se há correlação entre os níveis de expressão de HJURP e a resistência de células de GBM à radiação ionizante. Além disso, pretendemos identificar as proteínas com as quais HJURP interage fisicamente nas linhagens celulares de GBM T98G e U87MG, que respondem de modo distinto ao silenciamento de HJURP.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o nível de RNA mensageiro e da proteína HJURP nas células HDPC, que são fibroblastos não tumorais, e nas células T98G, U87MG, U138, U251 e U343.
- Avaliar a localização subcelular e a expressão de HJURP nas células RO, T98G, U87MG, U138, U251 e U343 após tratamento com radiação ionizante.
- Quantificar a fragmentação de DNA, após tratamento com radiação ionizante, em três linhagens celulares de astrocitoma que apresentem diferentes níveis de HJURP, com e sem o silenciamento desta proteína.
- Avaliar o nível de apoptose e viabilidade celular, após tratamento com radiação ionizante, nas três linhagens selecionadas com e sem o silenciamento da proteína HJURP.
- Identificar os parceiros de HJURP nas células T98G e U87MG através de imunoprecipitação seguida de espectrometria de massa para sequenciamento das proteínas obtidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

As células HDPC (*Human Dental Pulp Cels*) são provenientes de uma cultura primária de fibroblastos não imortalizados isolados de polpa dentária de uma criança de 5 anos. Estas células foram isoladas no laboratório dos professores Carlos Alberto de Souza Costa e Josimeri Hebling da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araraquara, que gentilmente cederam alíquotas para realização de nossos estudos. As células RO são também provenientes de cultura primária de fibroblastos não imortalizados, porém isolados de pele de prepúcio de um rapaz de 23 anos de idade. Estas células foram isoladas no laboratório da professora Enilza Maria Espreafico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, que gentilmente as cedeu para realização de nossos ensaios. As linhagens de GBM U87MG (HTB-14™) e T98G (CRL-1690™) foram obtidas da coleção da ATCC. As linhagens de U138MG e U251MG foram obtidas no laboratório da professora Elza Tiemi Sakamoto Hojo da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP; e as células U343 foram cedidas pelo professor Carlos Gilberto Carlotti Junior da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Todas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), em estufa a 37°C e 5% de CO₂, até confluência de aproximadamente 80%. Após atingir confluência adequada, as células eram descoladas da garrafa de cultura através do uso de tripsina e transferidas para microplacas adequadas para cada ensaio.

4.2 Tratamento com radiação ionizante

As células foram tratadas com radiação ionizante com taxa de exposição de dose de 14 Gy, e em seguida, foram realizadas análises de nível de expressão, de

localização subcelular de HJURP e assim como a quantificação da fragmentação do DNA após a exposição.

4.3 Extração de RNA e PCR em tempo real

A extração de RNA das células em cultura foi realizada utilizando o kit RNeasy RNA Extraction (Qiagen). Todo o meio da placa de seis poços foi retirado e adicionado 350 µL da solução de lise. Após lise, 350 µL de etanol 70% diluído em água DEPC (água tratada com DEPC, dietilpirocarbonato, e autoclavada) foi adicionado para precipitação das proteínas. Em seguida, foi transferido todo o volume para a coluna e centrifugada por 30 segundos e 12000 RPM. Após centrifugação, foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem. Então, o tampão foi descartado e adicionado 500 µL do tampão de lavagem com álcool e a coluna centrifugada novamente por 30 segundos e 12000 RPM. Logo após, foi adicionado novamente 500 µL do tampão de lavagem com álcool e a coluna centrifugada por 120 segundo e 12000 RPM. O sobrenadante foi descartado e a coluna centrifugada novamente por 60 segundos e 12000 RPM. Por fim, o RNA foi eluído com 50 µL de água DEPC. Uma alíquota foi analisada em espectrofotômetro a 260-280 nm para determinação da concentração.

Para a transcrição reversa de RNA foi utilizado o kit "High Capacity cDNA Archive" (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Para PCR em tempo real foi utilizado o sistema baseado no fluorocromo SYBR, através do kit "SYBR Master Mix" (Applied Biosystems) de acordo com as condições padrões recomendadas pelo fabricante. Após verificação da eficiência de amplificação dos primers para HJURP e HPRT, que ficou em torno de 95%, a estimativa de expressão relativa nas diferentes situações experimentais foi calculada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando-se as células HDPC como referência. O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. Este gene foi escolhido por

representar o melhor controle de expressão constitutiva para o modelo em estudo (VALENTE *et al.*, 2009).

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blot*

A quantificação da proteína HJURP nas linhagens tratadas e não tratadas com radiação ionizante foi realizada por *western blot*. Inicialmente as amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com tampão PBST (PBS 1X, 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente na presença de anticorpos anti-HJURP (ABCAM, ab100800) diluídos adequadamente, e posteriormente os anticorpos secundários. Por fim, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes e exposta a filme autorradiográfico.

4.5 Localização subcelular de HJURP através de imunomarcação e aquisição de imagens por microscopia confocal

Foi realizado o plaqueamento de 10^4 células/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 15 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,25% por 30 minutos. Logo após foi realizado o bloqueio, utilizando-se uma solução de BSA 2%. Após o bloqueio, o anticorpo primário anti-HJURP (ABCAM, ab175577) foi colocado em contato com as células (1:200) por uma hora. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X e incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:300), também por 1 hora. Após a incubação foi realizada novas lavagens com PBS 1X e incubação com DAPI (0,05

µg/mL) por 10 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, as imagens foram adquiridas através de microscopia confocal (Leica SP5).

4.6 Quantificação de quebras na dupla-fita de DNA

A variante histona H2AX substitui a histona H2A convencional em alguns nucleossomos e pode ser rapidamente fosforilada na serina 139 no carboxi-terminal em resposta ao dano de DNA (WATTERS *et al*, 2009). Utilizando anticorpo que detecta histona H2AX fosforilada, podemos quantificar o nível de quebras de DNA após o tratamento com radiação ionizante. Para isso, foram plaqueadas 50.000 células por poço na placa de 24 poços. Em seguida, foi realizado tratamento com radiação ionizante na dose de 14 Gy e após 15 minutos, 3 e 6 horas, foi feita fixação *overnight* em 900 µL de metanol 80%. No dia seguinte, as células foram permeabilizadas com tween 0,1% e bloqueadas com solução de soro fetal bovino 10%. Após bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-γH2AX (ABCAM, ab26350) e em seguida com anticorpo secundário conjugado com Alexafluor 488. Por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto).

4.7 Transfecção de células com siRNAs

O princípio desta metodologia envolve a introdução de oligonucleotídeos de RNA dupla fita curtos em células eucarióticas utilizando vesículas lipídicas artificiais, os lipossomos, que se fundem com a membrana celular entregando o seu conteúdo no citoplasma. Para conduzir experimento de silenciamento, foi utilizada uma microplaca de 12 poços e 20000 células foram plaqueadas por poço. Foi adicionado 1,25 µL dos oligonucleotídeos (solução a 10 µM), dirigidos para o RNA de interesse ou controle de sequência aleatória, em 250 µL de meio Opti-MEM (LifeTechnologies) e a mistura homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 2,5 µL de lipofectamina (RNAiMAX Invitrogen) em cada poço e a mistura homogeneizada novamente e deixada em

repouso por 20 minutos. Após o repouso, 1 mL da suspensão celular com 2×10^4 células/mL foi gotejada lentamente nos poços sobre o meio contendo os complexos de lipossomos com siRNA já formados. A microplaca é tampada, homogeneizada e incubada por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, 700 µL do meio foi trocado e a placa incubada novamente por 48 horas.

4.8 Ensaio de apoptose e morte celular

A avaliação da viabilidade de células irradiadas e/ou silenciadas foi realizada pelo uso do reagente anexina V (Life Technologies) e o corante iodeto de propídio (Life Technologies). A Anexina V se liga especificamente à fosfatidilserina externalizada na bicamada lipídica da membrana de células em apoptose, enquanto que o corante de iodeto de propídio marca apenas células que já perderam completamente o controle de permeabilidade da membrana, portanto células inviáveis. Para isso, as células foram transfectadas e dois dias após, foram irradiadas na dose de 14 Gy. Dois dias após irradiação, foram tripsinizadas, lavadas em PBS 1X (tampão fosfato salina) e incubadas em tampão de ligação de anexina e anexina V por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado iodeto de propídio (1 µg/mL) e as células imediatamente analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto).

4.9 Imunoprecipitação de HJURP

Extratos celulares das diferentes linhagens foram incubados a 4°C por uma hora com 100 µL de contas de proteína G-agarose em volume final de 2 mL do tampão de imunoprecipitação (0.5% NP40, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl) na presença de inibidor de protease. Logo após, foi realizada centrifugação por 5 minutos e 1000 RPM a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi incubado a 4°C com o anticorpo

policlonal anti-HJURP (ABCAM, ab100800) ou com IgG de coelho, por 2 horas. As contas foram coletadas por centrifugação por 2 minutos a 5000 RPM e lavadas seis vezes com o tampão de imunoprecipitação. As contas lavadas foram ressuspendidas em 50 μ L do tampão de amostra Laemmli e fervidas por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). Após eletroforese, o gel foi corado com Imperial Protein Stain (ThermoScientific). As proteínas encontradas serão identificadas por espectrometria de massas com a colaboração do Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.10 Ensaio de senescência celular

Foi realizado o plaqueamento de 1mL da suspensão de células em placas de 12 poços utilizando uma concentração celular de 25.000 células/mL. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, foi realizada lavagem com PBS 1X e incubação com solução de X-gal. Após 18 horas as imagens das células foram capturadas em microscópio de contraste de fase (OLYMPUS CKX41) e as marcações analisadas visualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos níveis de mRNA e da proteína HJURP nos fibroblastos não tumorais HDPC e nas linhagens de GBM T98G, U87MG, U138, U251 e U343

Todas as linhagens de GBM testadas, com exceção da U87MG, apresentam expressão significativamente maior do mRNA de HJURP quando comparadas com os fibroblastos normais. A linhagem U87MG mostrou aproximadamente os mesmos níveis de expressão das células HDPC. As células tumorais T98G, U138MG, U251MG e U343MG apresentaram níveis de HJURP entre 3 e 8 vezes o nível das células HDPC, sendo que as células T98G são as que mostram o maior valor de superexpressão (figura 5). Em relação aos níveis proteicos, todas as linhagens de GBM superexpressam HJURP em relação às células HDPC. A linhagem T98G apresentou os maiores níveis de expressão da proteína (figura 6).

Figura 5. Expressão relativa do mRNA de HJURP em fibroblastos normais (HDPC) e em linhagens de GBM. O nível de mRNA de HJURP foi avaliado através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as células HDPC como referência. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

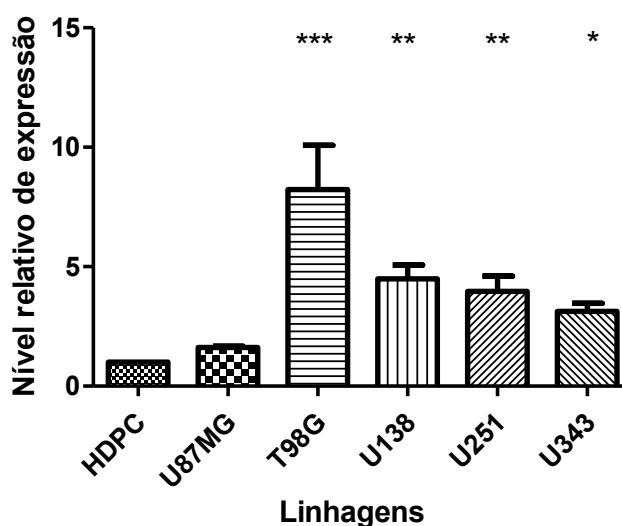
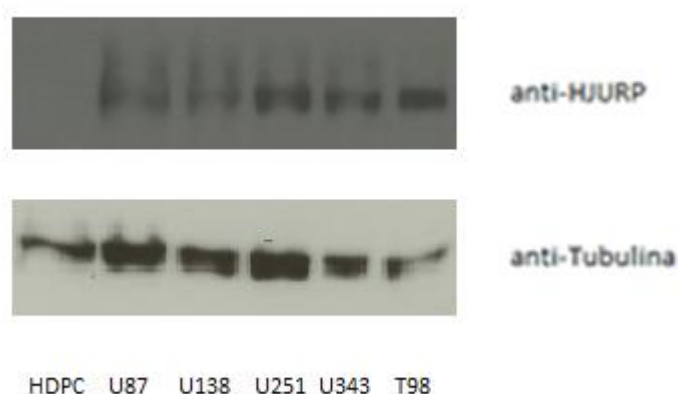


Figura 6. Expressão da proteína HJURP nas linhagens de GBM e nos fibroblastos normais (HDPC). As proteínas de cada amostra foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então sondada com os anticorpos anti-HJURP e anti-tubulina.



5.2 Avaliação do nível de expressão da proteína HJURP nas células HDPC, T98G, U87MG, U138 e U343 antes e após tratamento com radiação ionizante

Para investigar se a proteína HJURP estaria associada com a elevada resistência do glioblastoma multiforme à radiação, sua expressão foi analisada em diferentes linhagens celulares de GBM após o tratamento com radiação ionizante. Para isso, as linhagens U87MG, U251MG e T98G foram cultivadas, irradiadas e o nível de expressão de HJURP analisado por *western blot*. Como pode ser observado nas figuras 7 e 8, ocorre uma diminuição dos níveis de HJURP após o tratamento com radiação ionizante na dose de 14 Gy nas três linhagens avaliadas. A redução mais notável nos níveis da proteína HJURP é observada na linhagem U251, enquanto que o menor nível de redução é observado em células T98G.

Curiosamente, estes dados sugerem que nestas células o estímulo genotóxico está associado com uma redução nos níveis da proteína HJURP, contrariamente ao relatado por Kato e colaboradores (2007) para células de câncer pulmão A549.

Entretanto, dados recentes da literatura demonstraram que para células HDF (*human dermal fibroblasts*) e HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), o tratamento com doxorrubicina levou a uma diminuição nos níveis de expressão de HJURP em 4, 24, 48 e 96 horas após o estímulo genotóxico (Heo *et al.*, 2013). Sabe-se também que ocorre aumento de HJURP em células em proliferação e diminuição no processo natural de senescência celular ou na senescência prematura associada ao tratamento com o agente genotóxico doxorrubicina (Heo *et al.*, 2013). Dessa forma, o tratamento com outros agentes genotóxicos, como a radiação ionizante, que interrompe o ciclo celular (Ma *et al.*, 2013), poderia também causar diminuição nos níveis de HJURP. Conjuntamente, estes dados indicam que a redução de HJURP que observamos nas células de GBM pode decorrer de parada no ciclo celular.

Figura 7. Expressão da proteína HJURP em linhagens de GBM após tratamento com radiação ionizante. As proteínas de cada amostra foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então sondada com os anticorpos anti-HJURP e anti-tubulina.

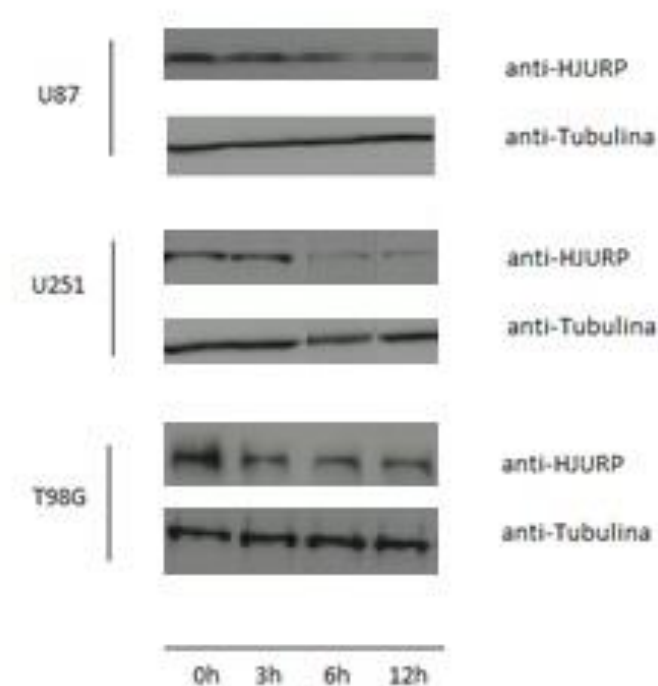
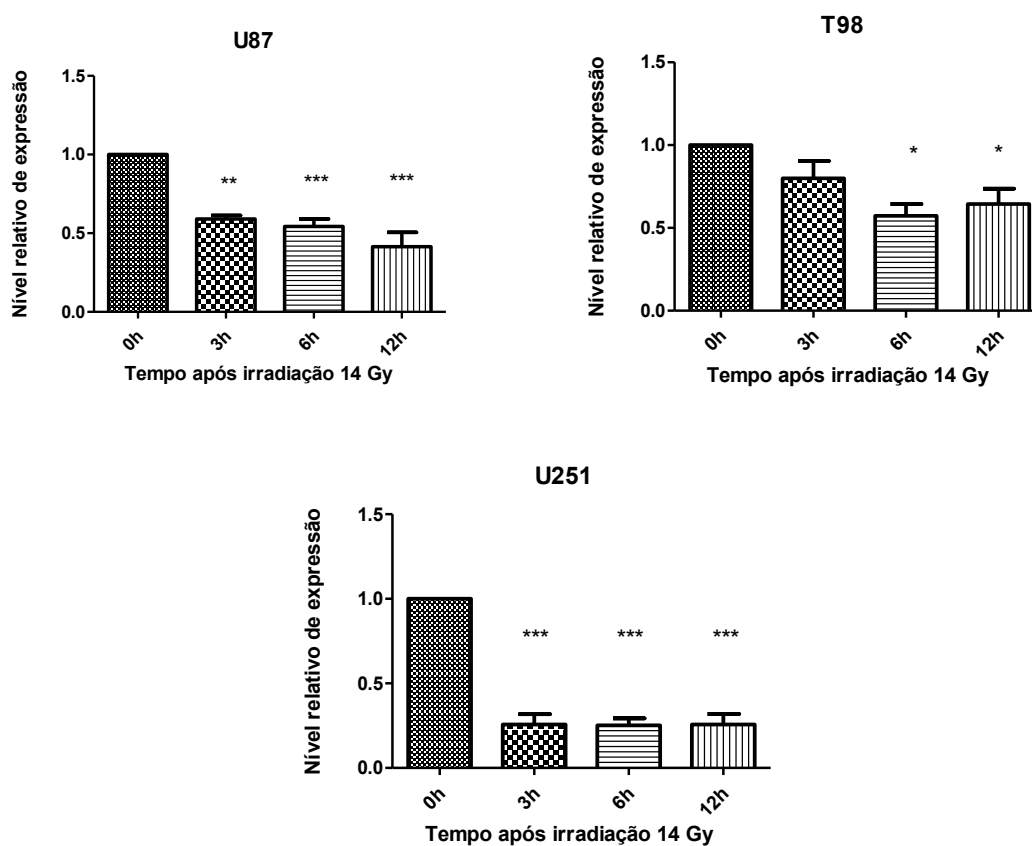


Figura 8. Nível de expressão da proteína HJURP em linhagens de GBM após tratamento com radiação ionizante. Os níveis da proteína HJURP foram estimados através de densitometria das bandas da figura 3 com utilização do programa ImageJ (versão 1.38). O sinal da α -tubulina foi utilizado como normalizador.



5.3 Localização subcelular de HJURP nas linhagens tumorais T98G e U87MG

Analizamos o padrão de localização subcelular de HJURP nas células U87MG e T98G cultivadas em condições padrão e após exposição à radiação ionizante. Para isso, as células foram expostas à dose de 14 Gy de radiação e após 3 horas foi realizada a imunomarcação. Foi observada localização citoplasmática de HJURP em células não irradiadas, enquanto que, após o tratamento com radiação ionizante, HJURP foi detectada no núcleo das células (figuras 9 e 10). Estes dados revelam que HJURP é recrutada para o núcleo de maneira regulada durante a resposta à presença de danos no DNA.

Além disso, observamos uma clara redução do sinal de HJURP após o tratamento com radiação ionizante (figura 9), o que corrobora os dados que obtivemos

no experimento de *western blot* (figura 8). Como já mencionamos este resultado foi surpreendente, pois sendo HJURP uma proteína envolvida no reparo de quebras de dupla-fita de DNA esperávamos um aumento nos seus níveis de expressão em resposta ao dano. Entretanto, considerando a função de HJURP no empacotamento da cromatina centromérica (FOLTZ *et al.*, 2009), seria esperada uma maior quantidade da proteína em células com maior atividade de proliferação. Desse modo, a redução dos níveis de HJURP observada nas células submetidas à radiação pode ser resultado de uma parada no ciclo celular, que normalmente ocorre em células com danos no DNA.

5.4 Quantificação da fragmentação de DNA após tratamento com radiação ionizante nas linhagens de GBM com e sem o silenciamento de HJURP

Para avaliar o papel de HJURP no processo de reparo de DNA após o tratamento com radiação ionizante, foram realizados ensaios de silenciamento combinados com exposição à radiação na dose de 14 Gy. As condições de silenciamento foram padronizadas anteriormente e as eficiências de silenciamento para cada linhagem estão mostradas na tabela 1. O dano causado no DNA foi quantificado através da detecção da histona H2AX fosforilada. Para avaliar a velocidade de reparo de DNA nas diferentes linhagens, silenciando ou não HJURP, o ensaio foi realizado logo após a exposição à radiação, 3 e 6 horas após o tratamento. Como pode ser observado na figura 11, não há diferenças estatisticamente significantes na velocidade de reparo de DNA entre células U138, U251 e U343 silenciadas e não silenciadas.

Figura 9. Localização subcelular de HJURP em células U87MG. As células sem tratamento (U87-ST e T98-ST) ou submetidas à dose de 14 Gy de radiação ionizante (U87-IR e T98-IR) foram fixadas 3 horas após a exposição. Foi então realizada a imunomarcação com anticorpo anti-HJURP (verde) e coloração com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (Leica SP5), com aumento de 1800 vezes.

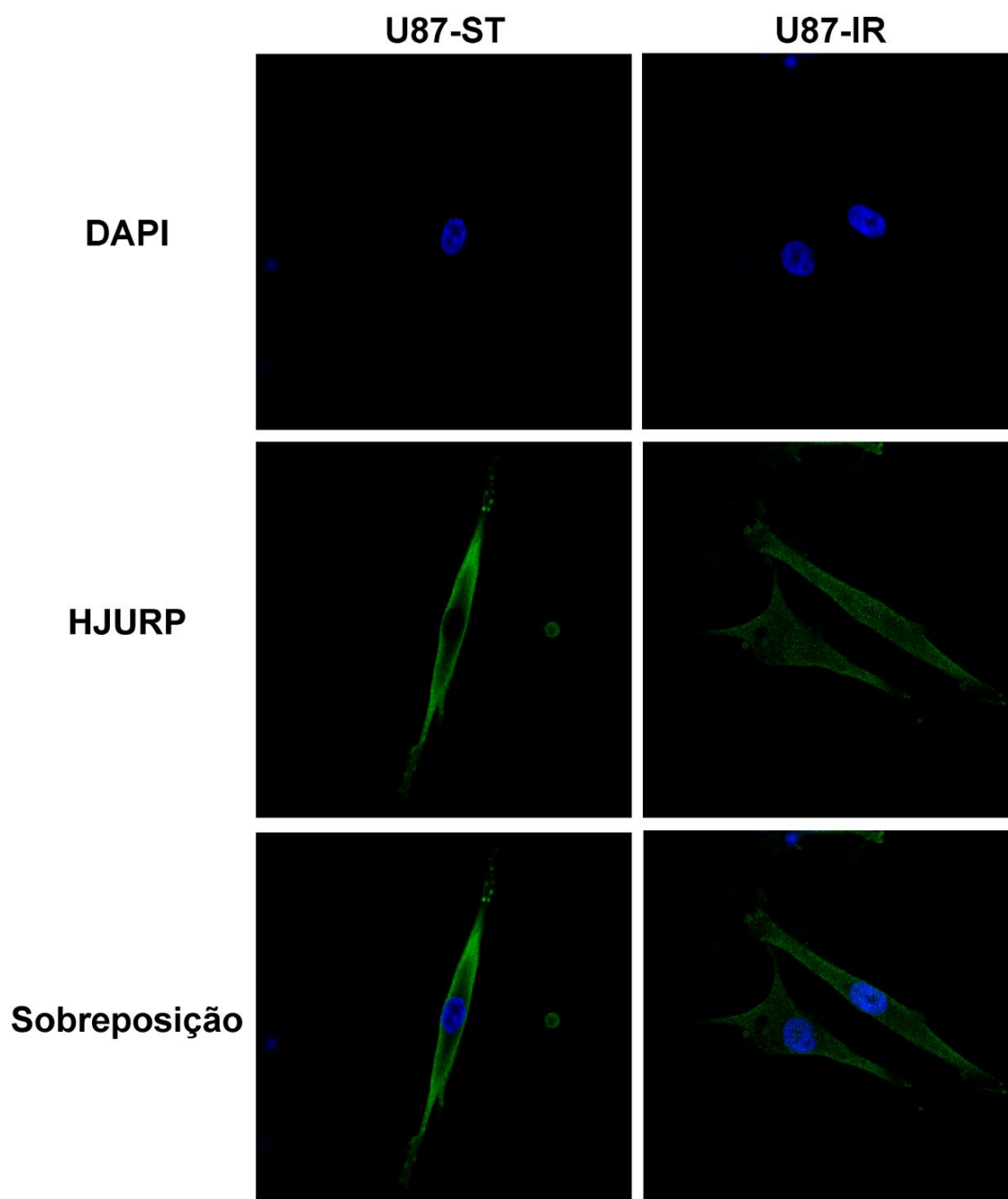


Figura 10. Localização subcelular de HJURP em células T98G. As células sem tratamento (U87-ST e T98-ST) ou submetidas à dose de 14 Gy de radiação ionizante (U87-IR e T98-IR) foram fixadas 3 horas após a exposição. Foi então realizada a imunomarcação com anticorpo anti-HJURP (verde) e coloração com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (Leica SP5), com aumento de 950 vezes.

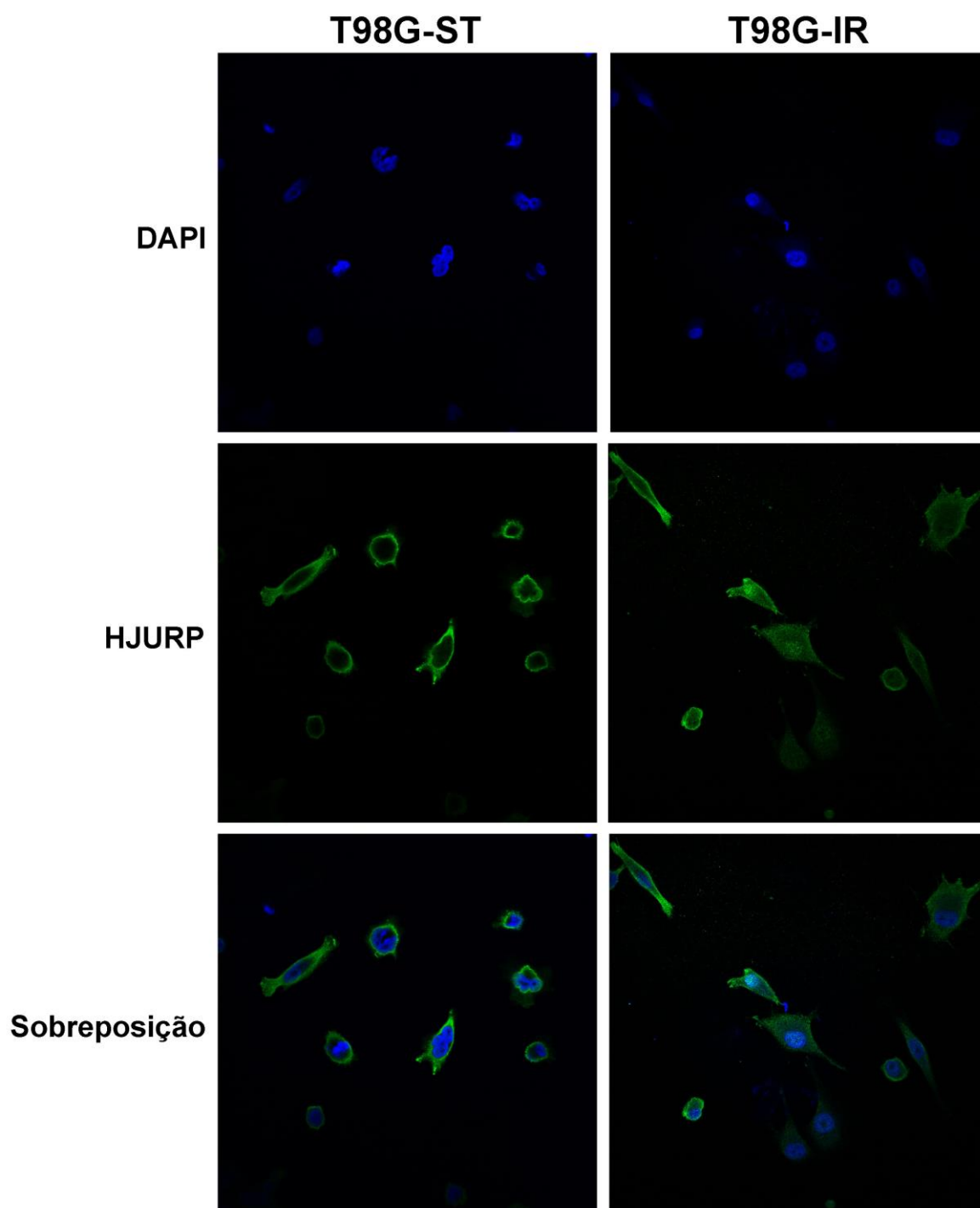


Figura 11. Quantificação dos danos no DNA de células de GBM silenciadas ou não para HJURP e submetidas à radiação ionizante. NT – Célula não transfectada, C – Células transfectadas com siRNA controle e HJ – Células transfectadas com siRNA contra o mRNA de HJURP. IR – Células tratadas com radiação ionizante. A quantidade de dano foi estimada através de citometria de fluxo para detecção da histona H2AX fosforilada 15 minutos, 3 e 6 horas após tratamento. Os níveis de significância estatística foram calculados em relação às células controle não transfectadas e não irradiadas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

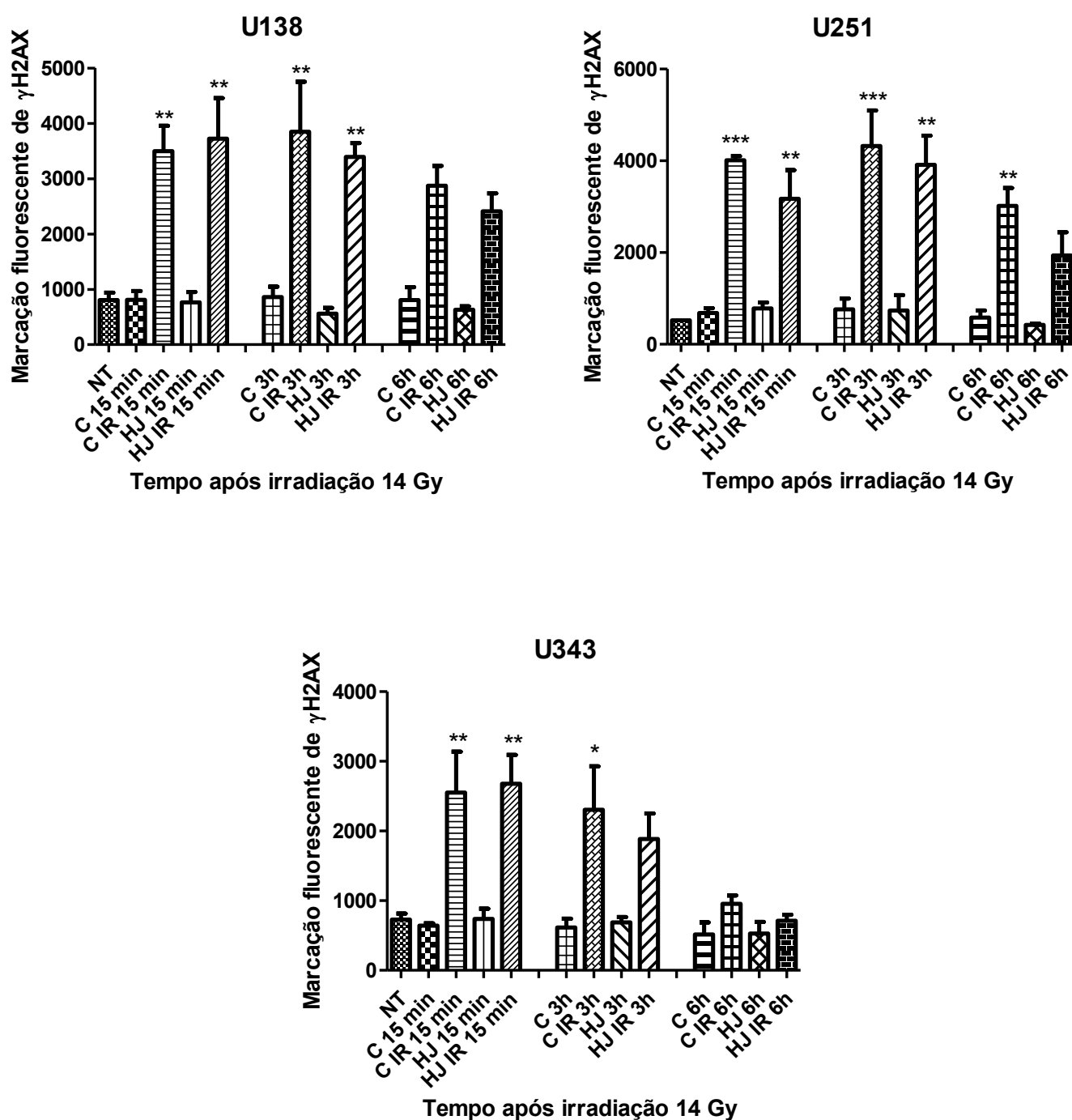


Tabela 1. Eficiência do silenciamento de HJURP nas diferentes células utilizadas.

Célula	Eficiência de silenciamento
RO	81%
U87	81%
T98	87%
U138	66%
U251	71%
U343	98%

Este resultado foi surpreendente, pois HJURP é descrita como uma proteína atuante na via de reparo por recombinação homóloga (Kato *et al*, 2007) e esperávamos que sua redução prejudicasse no processo de reparo. Porém não foi observada uma menor atividade de reparo de DNA após o silenciamento de HJURP. Uma hipótese é que devido ao fato de HJURP regular proliferação celular, o silenciamento da proteína cause diminuição das taxas proliferativas e aumento de células em G1, fase na qual HJURP não atuaria. Existem dois mecanismos de reparo capazes de corrigir quebras no DNA, a via que atua através da junção de extremidades não homólogas e a via de recombinação homóloga. Em G1 a via preferencial é a junção de extremidades não homólogas devido ao difícil acesso ao cromossomo homólogo. Neste caso, quando a quebra é detectada, proteínas da via interagem com as extremidades do DNA e recrutam DNA ligases que promovem a ligação das fitas (Hoeijmakers *et al*, 2001). Este mecanismo não depende de molde e possui maior propensão a erros (Khanna & Jackson, 2001; Van Gent *et al.*, 2001). Se a célula

estiver na fase S ou G2, a via de reparo preferencialmente ativada é a recombinação homóloga, onde a cromátide irmã é utilizada como molde para reparo (Zhou & Paull, 2013). É possível que o silenciamento de HJURP cause diminuição nas taxas proliferativas e aumento do número de células em G1 onde o reparo é feito preferencialmente por junção de extremidades não homólogas, o qual não envolve HJURP.

Outra possibilidade é que o silenciamento de HJURP promova a indução de outras proteínas de reparo como compensação. Poderiam ser proteínas da via de recombinação homóloga ou junção de extremidades não homólogas, ambas responsáveis pelo reparo de quebras de dupla fita de DNA, que são causadas pela radiação ionizante.

5.5 Avaliação de apoptose e morte celular

Para avaliar a influência de HJURP na resposta celular à radiação ionizante, foram realizados ensaios de silenciamento combinados com exposição à radiação na dose de 14 Gy, e dois dias após tratamento, as células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. Foi observado aumento semelhante da taxa de células apoptóticas e mortas em células U87MG silenciadas com siHJURP ou irradiada. As células que foram silenciadas e irradiadas tiveram índices de apoptose e morte ainda maior (figura 12). Para células T98G, a quantidade de células em apoptose não foi alterada com a irradiação, porém aumentou em células silenciadas ou silenciadas e irradiadas. Em relação à taxa de morte, apresentaram aumento semelhante na quantidade de células mortas após silenciamento ou tratamento com radiação. O tratamento combinado com o silenciamento aumentou ainda mais esta taxa. Estes dados sugerem, que a ocorrência de reparo de DNA mais rápida nas células que possuem HJURP silenciado (figura 11), talvez não seja precisa, levando a célula à morte posteriormente.

5.6 Análise de senescência celular

Outro aspecto relevante da função de HJURP já descrito na literatura é o seu envolvimento no controle da senescência em células HDF e HUVEC (Heo *et al.*, 2013). Dados prévios de nosso grupo indicavam que HJURP também poderia atuar no controle da senescência em células de GBM. Observamos em experimentos anteriores que as células U87MG apresentam alterações morfológicas notáveis que aparecem gradualmente a partir do segundo dia de silenciamento de HJURP. Estas células, que são geralmente alongadas e crescem frouxamente ligadas como uma rede dispersa, se tornam achatadas, e apresentam mais contatos quando os níveis de HJURP são diminuídos (figura 13). Estas alterações morfológicas indicavam fortemente a ocorrência de senescência prematura.

Portanto, este aspecto, apesar de não previsto inicialmente, foi incluído nos objetivos deste projeto. Neste estudo foi avaliado o impacto do silenciamento de HJURP na senescência das células RO, T98G e U87MG através de detecção da atividade de β -galactosidase. De fato, o ensaio de β -gal que realizamos mostrou senescência massiva das células U87MG no quinto dia após o silenciamento de HJURP, quando foi observado um considerável aumento no número de células senescentes (figura 14 e tabela 2). A linhagem celular de GBM T98G e os fibroblastos não tumorais não mostraram atividade detectável de β -galactosidase, o que indica que estas células não entram em senescência prematura (tabela 2 e figura 14).

Figura 12. Quantificação das taxas de apoptose e morte celular de células de GBM silenciadas ou não para HJURP e submetidas à radiação ionizante. siC: células transfectadas com siRNA controle; siHJ: células transfectadas com siRNA contra o mRNA de HJURP; IR: células tratadas com radiação ionizante. A quantidade de células mortas ou apoptóticas foi estimada através de citometria de fluxo para detecção de iodeto de propídio e anexina V, respectivamente, 48 horas após irradiação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

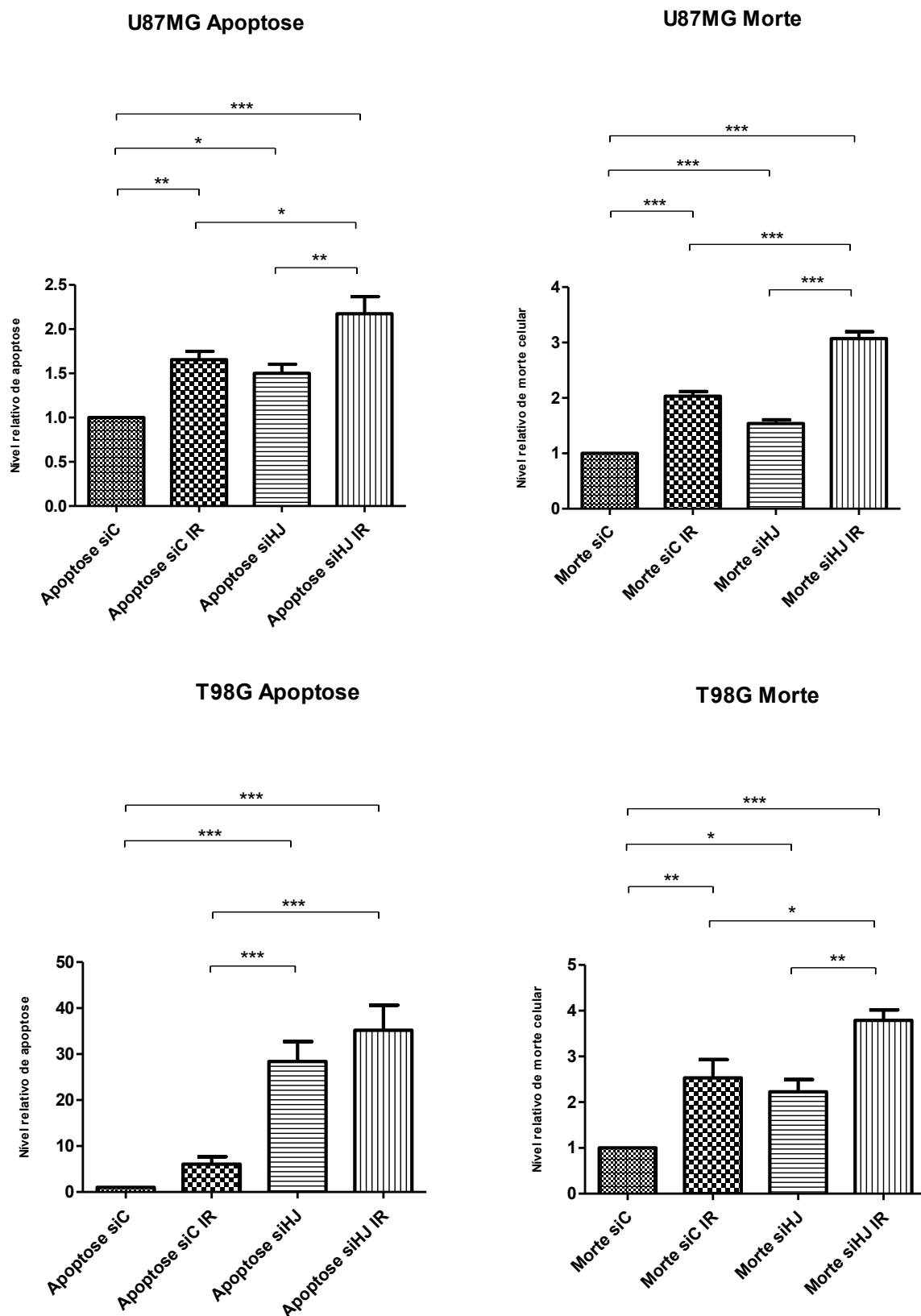
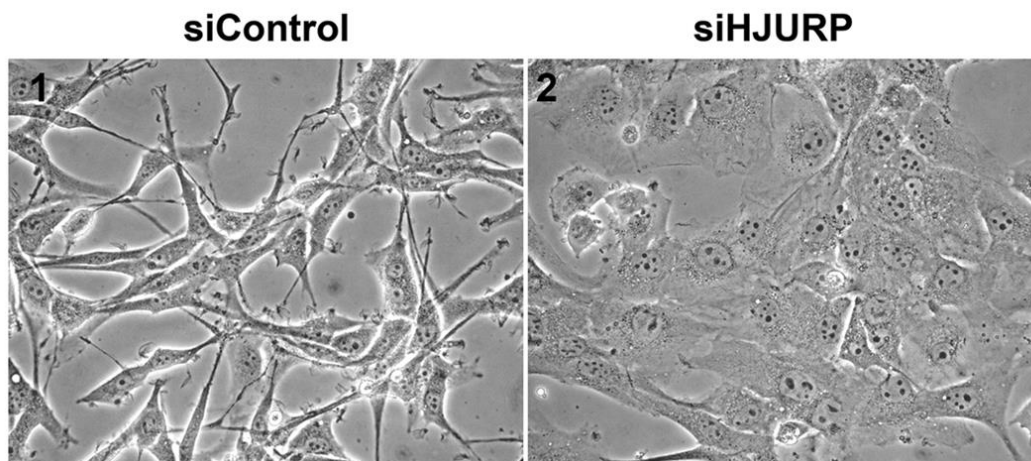


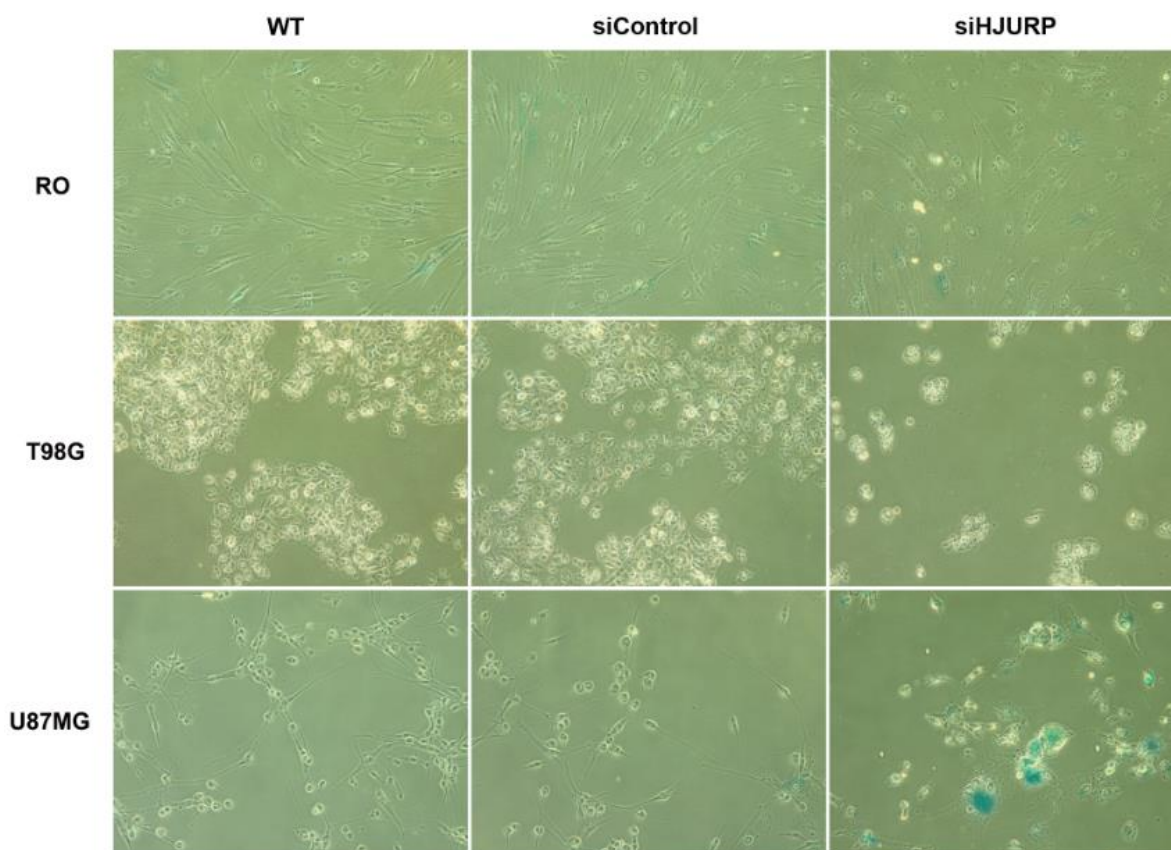
Figura 13. A morfologia das células U87MG é afetada após o silenciamento de HJURP. As imagens das células U87MG no terceiro dia após a transfecção com siRNA controle (1) ou siRNA contra o mRNA de HJURP (2) foram capturadas em microscópio de contraste de fase (Leica MC OS).



Estes resultados estão presentes em um artigo elaborado pelo grupo que foi publicado na revista PlosONE (VALENTE, V *et al.*, 2013). Neste trabalho vimos ainda que no quinto dia após a redução de HJURP o nível de apoptose das células U87MG aumentou significativamente, culminando num aumento brusco no índice de morte celular efetiva no sétimo dia após a transfecção. Interessantemente, a viabilidade de fibroblastos não tumorais não foi significativamente afetada pela silenciamento de HJURP. Estes resultados suportam a hipótese de que HJURP pode ter uma função importante na progressão e/ou na manutenção de gliomas de alto grau e, eventualmente, pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de novas terapias para pacientes com gliomas.

Figura 14. Células U87MG entram em senescência prematura após silenciamento de HJURP.

Células U87MG, T98G e RO sem transfecção (WT) ou transfectadas com siControl ou siHJURP foram processadas para o ensaio de β -galactosidase no quinto dia após a transfecção. As imagens foram capturadas em microscópio de contraste de fase (OLYMPUS CKX41).



5.7 Busca pelos parceiros de HJURP nas células T98G e U87MG através de imunoprecipitação

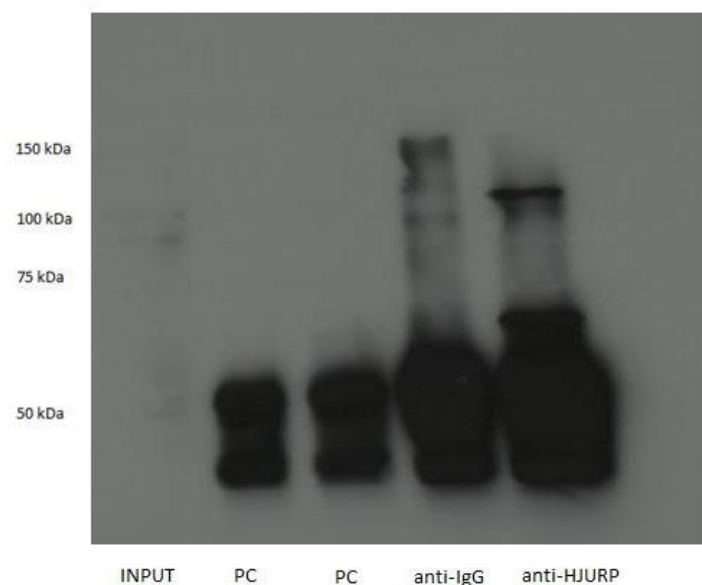
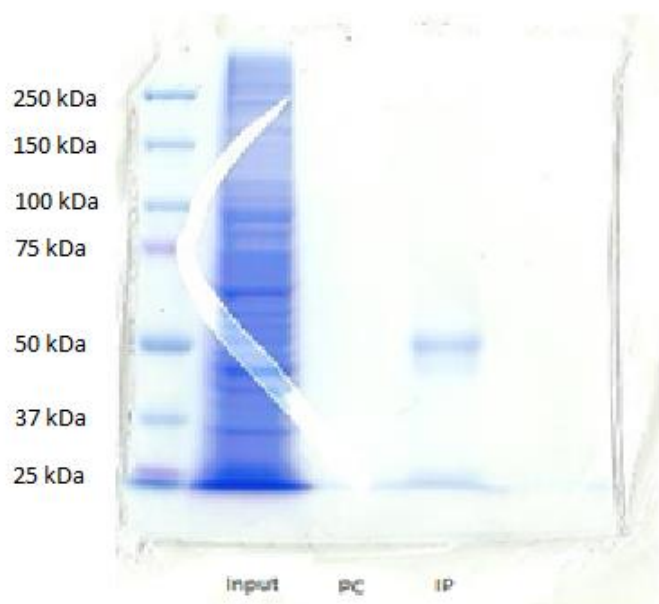
Em relação à imunoprecipitação, para identificação de proteínas que interagem fisicamente com HJURP, não conseguimos obter proteínas precipitadas, nem mesmo a HJURP. Alteramos de diversas formas nosso protocolo, mas não obtivemos sucesso. Como pode ser observado na figura 15, foi utilizada quantidade adequada de proteínas inicial no experimento (*input*) e não ocorreu ligação inespecífica das proteínas do lisado com as *beads*, visto que não são observadas proteínas após o pré-clareamento. A única banda detectada após a imunoprecipitação está em torno dos 50 kDa, não podendo ser HJURP que possui peso molecular de 84 kDa. Provavelmente, a banda

observada é o anticorpo anti-HJURP que foi utilizado na imunoprecipitação e têm massa molecular compatível. Para checar a presença de HJURP no imunoprecipitado foi realizado western blot utilizando-se anticorpo anti-HJURP (figura 15). Foi identificado apenas uma banda de aproximadamente 120 kDa, que não pode corresponder a HJURP que possui cerca de 84 kDa. Possivelmente, esta banda é um agregado do anticorpo que foi utilizado na imunoprecipitação, em outros experimentos esta banda não foi detectada.

Tabela 2. Porcentagens de células das linhagens RO, U87MG e T98G com atividade de SA- β -Gal detectável após o silenciamento de HJURP.

	DIA 2	DIA 3	DIA 5
RO selvagem	1,09%	1,94%	1,98%
RO siControle	0,93%	2,84%	2,25%
RO siHJURP	0,48%	2,50%	2,13%
T98G selvagem	0%	0%	0%
T98G siControle	0%	0%	0%
T98G siHJURP	0%	0%	0%
U87MG selvagem	0,14%	0,30%	0,56%
U87MG siControle	0,22%	0,20%	1,12%
U87MG siHJURP	0,16%	5,36%	41,57%

Figura 15. Imunoprecipitação de HJURP. O lisado total está mostrado como Input, o pré-clareamento como PC, e a imunoprecipitação como IP. As proteínas presentes no gel foram detectadas pelo corante *Imperial Protein Stain*. Para checagem da presença de HJURP no imunoprecipitado, uma alíquota foi separada por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então sondada com os anticorpos anti-HJURP.



6. CONCLUSÕES

Neste trabalho vimos que os níveis de mRNA de HJURP estão aumentados nas linhagens celulares de GBM T98G, U138MG, U251MG e U343MG, porém não na linhagem U87MG que expressa níveis similares ao de fibroblastos não tumorais. Já a proteína HJURP é detectada em maiores níveis em todas as linhagens tumorais avaliadas, revelando que um mecanismo de controle pós-transcricional provavelmente atue na regulação da expressão de HJURP. Curiosamente, a expressão de HJURP foi reduzida após tratamento com radiação ionizante na dose de 14 Gy. Visto que HJURP participa da formação dos nucleossomos centroméricos, este fato está possivelmente relacionado com uma redução de proliferação para reparo do dano causado no DNA.

Nossos dados mostraram ainda que ocorre o deslocamento de HJURP para o núcleo após exposição à radiação ionizante, o que indica que a função desta proteína no reparo de DNA é regulada pelo controle de sua localização subcelular. Avaliamos também a função de reparo de células irradiadas após silenciamento de HJURP. Surpreendentemente, vimos que a atividade de reparo das células silenciadas é similar à de células não silenciadas. Este dado sugere que outros mecanismos de reparo estejam atuando ou compensando a falta de HJURP. De qualquer modo, serão necessárias novas análises envolvendo sincronização de ciclo celular e avaliação do dano de DNA especificamente na fase S, onde o processo de reparo através de recombinação homóloga é predominante, para finalmente concluirmos se HJURP participa efetivamente do reparo de quebras de dupla fita de DNA. Embora, o reparo tenha ocorrido mais rapidamente nas células silenciadas para HJURP, as taxas de morte celular e apoptose foram maiores após exposição à radiação ionizante, o que revela uma maior sensibilidade destas células. Isto indica que, na ausência de HJURP, o reparo pode estar ocorrendo de forma incorreta ou que outros processos como a manutenção da estabilidade cromossômica possam estar comprometidos.

Observamos também que o silenciamento de HJURP promove senescência celular na linhagem U87MG, enquanto que nas linhagens T98G e RO este fenômeno não é observado. No entanto, dados de outro trabalho do grupo revelaram que ambas as linhagens tumorais, mas não as células RO, apresentaram aumento das taxas de apoptose após o silenciamento, o que mostra que HJURP é necessária para manutenção da viabilidade, especificamente em células tumorais.

Com relação a busca pelos parceiros de HJURP nas células T98G e U87MG, infelizmente não conseguimos imunoprecipitar HJURP apesar de várias tentativas em diferentes condições. Isto indica que provavelmente o anticorpo anti-HJURP que utilizamos não detecta a HJURP na forma nativa e complexada com outras proteínas. Este fato nos impele a fazer futuras tentativas através de ensaios de *pull down*.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010.

BARNHART, M. C.; KUICH, P. H. J. L.; STELLFOX, M. E. *et al.* HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. **The Journal of cell biology**, v. 194, n. 2, p. 229-243, 18 jul 2011.

BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A. F.; DELATTRE, J.-Y. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-31, 25 jan 2003.

FOLTZ, D. R.; JANSEN, L. E. T.; BAILEY, A. O. *et al.* Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 472-84, 1 maio 2009.

HEO, JI.; CHO, J. H.; KIM, J. R. HJURP Regulates Cellular Senescence in Human Fibroblasts and Endothelial Cells Via a p53-Dependent Pathway. **The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences**, 4 jan 2013.

HU, Z.; HUANG, G.; SADANANDAM, A. *et al.* The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 12, n. 2, p. R18, jan 2010.

JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-26, jul 2010.

KATO, T.; SATO, N.; HAYAMA, S. *et al.* Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. **Cancer research**, v. 67, n. 18, p. 8544-53, 15 set 2007.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.

MA, H.; RAO, L.; WANG, H. L.; *et al.* Transcriptome analysis of glioma cells for the dynamic response to c-irradiation and dual regulation of apoptosis genes: a new insight into radiotherapy for glioblastomas. **Cell Death and Disease**, 31 out 2013.

MAHER, E. A; BRENNAN, C.; WEN, P. Y. *et al.* Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11502-13, 1 dez 2006.

MEIR, E. G. VAN.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, 2010.

NOUSHMEHR, H.; WEISENBERGER, D. J.; DIESFES, K. *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. **Cancer Cell**, v. 17, n. 5, p. 510-522, 18 mai 2010.

ROY, K.; WANG, L.; MAKRIGIORGOS, G. M.; PRICE, B. D. Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 344, n. 3, p. 821-6, 9 jun 2006.

THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, 23 out 2008.

THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, v. 155, p. 472-477, 10 out 2013.

VALENTE, V.; TEIXEIRA, S. A; NEDER, L. *et al.* Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC molecular biology**, v. 10, p. 17, jan 2009.

VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S. *et al.* Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PLOS One**, 25 abr 2013.

VERHAAK, R. G. W.; HOADLEY, K. A; PURDOM, E. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 19 jan 2010.

WATTERS, G. P.; SMART, D. J.; HARVEY, J. S. *et al.* H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. **Mutation Research**, p. 50-58, 21 jul 2009.