

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA SINALIZAÇÃO E REPARO DE DANOS AO DNA A NÍVEL DE CÉLULA ÚNICA UTILIZANDO REPÓRTERES FLUORESCENTES

Pedro Henrique Santos

Prof. Dr. Nicolas C Hoch

Instituto de Química/USP

pedro.h.santos@usp.br

Objetivos

Muitos dos quimioterápicos em uso clínico hoje, como doxorubicina, etoposídeo, topotecano, mitomicina, cisplatina, temozolomida e ciclofosfamida, além da radiação ionizante, são agentes causadores de danos ao DNA. No entanto, sua eficácia é limitada pelo surgimento de resistência, normalmente porque conseguem eliminar uma vasta maioria das células, mas uma pequena proporção de células com comportamentos excepcionais sobrevive e repopula o tumor¹.

Neste projeto de bolsa de iniciação científica vamos estabelecer dois ensaios utilizando repórteres fluorescentes já estabelecidos e previamente empregados na literatura: Um repórter de atividade de ATR, que utiliza um fragmento da ciclina F fusionado a GFP, de forma que o repórter é degradado em resposta a ativação de ATR²; e um sistema de vetores plasmidiais em que quebras de fita-dupla são reparadas por NHEJ ou HR, de forma a re-estabelecer a expressão de GFP^{3,4}.

Este projeto é parte integrante de uma rede colaborativa de 15 laboratórios de pesquisa de São Paulo e do Rio Grande do Sul, financiada em conjunto pela FAPESP e FAPERGS, que busca estabelecer uma coleção de linhagens celulares expressando diferentes marcadores fluorescentes para determinar, em células únicas, diferenças na ativação de vias de sinalização celular como senescência,

autofagia, ciclo celular, apoptose, reparo de DNA, interferon, estresse de retículo e MAP quinases em resposta a diferentes estímulos.

Métodos e Procedimentos

Os plasmídeos para expressão dos repórteres foram adquiridos da Addgene® ou enviados ao nosso laboratório pelos autores dos estudos citados. *E. coli* resistentes a choque térmico foram geradas mediante tratamento com MgCl₂. Os vetores foram expandidos nas bactérias, purificados e sua identidade checada por digestão ou sequenciamento, conforme necessidade. A concentração de plasmídeos foi medida em espectrofotômetro.

Resultados

Os vetores recebidos foram expandidos em bactérias, extraídos e digeridos com as enzimas de restrição para confirmação de sua natureza.

Após a confirmação da identidade dos vetores os experimentos seguiram com nova expansão e extração por Midi prep, para obtenção de quantidade suficiente para o andamento do projeto, e estocagem.

Conclusões

Todos os vetores tiveram suas naturezas confirmadas e se mostraram minimamente parecidos com o esperado. Eles também foram expandidos e estocados e agora estão prontos para os testes in vitro.

Devido à pandemia mundial de Sars-Cov-2 a pesquisa presencial foi suspensa de março de 2020 até maio de 2021, o que retardou os trabalhos.

Na próxima etapa os objetivos deste projeto é a transfecção dos vetores de HR e NHEJ em células RPE e do repórter da via ATR em células HEK e verificação de que eles funcionam como o esperado.

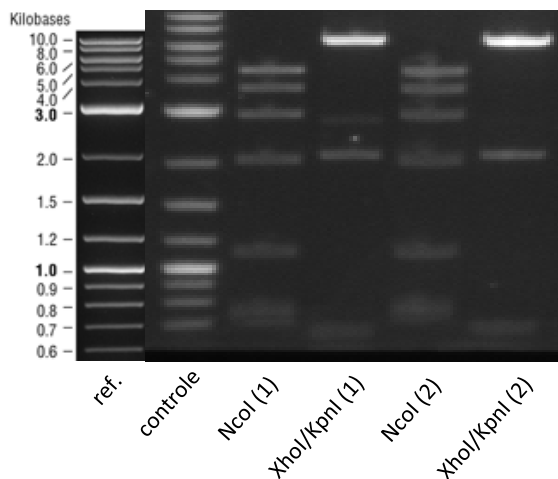


Figura 1: Ensaio de eletroforese com o vetor HR na presença de NcoI e na presença de XhoI e KpnI.

Referências Bibliográficas

- 1 JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature08467>>. Acessado em: 3 de setembro de 2021.
- 2 D'ANGIOLELLA, Vincenzo; DONATO, Valerio; FORRESTER, Frances M.; et al. Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 1023–1034, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.043>>. Acessado em: 3 de setembro de 2021.
- 3 SELUANOV, Andrei; MAO, Zhiyong; GORBUNOVA, Vera. Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells. *Journal of Visualized Experiments*, n. 43, p. 3–9, 2010. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3791/2002>>. Acessado em: 3 de setembro de 2021.

4 SELUANOV, Andrei; MITTELMAN, David; PEREIRA-SMITH, Olivia M.; et al. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 20, p. 7624–7629, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0400726101>>. Acessado em: 3 de setembro de 2021.