

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

PAULO ROBERTO D'AURIA VIEIRA DE GODOY

**Efeitos do silenciamento de E2F1 e HEB, fatores  
de transcrição preditos *in silico*, em células de  
glioblastoma irradiadas com raios gama**

Ribeirão Preto

2013

PAULO ROBERTO D'AURIA VIEIRA DE GODOY

Efeitos do silenciamento de E2F1 e HEB, fatores de transcrição preditos  
*in silico*, em células de glioblastoma irradiadas com raios gama

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto, Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

*Godoy, Paulo Roberto D'Auria Vieira*

Efeitos do silenciamento de E2F1 e HEB, fatores de transcrição preditos *in silico*, em células de glioblastoma irradiadas com raios gama/ Ribeirão Preto, 2013

189f.:il; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de Concentração: Genética Orientadora Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi

1. glioblastoma. 2. siRNA. 3. raios gama. 4. neuroesferas. 5. expressão gênica. 6. fatores de transcrição

Nome: GODOY, Paulo Roberto D'Auria Vieira

Título: Efeitos do silenciamento de E2F1 e HEB, fatores de transcrição *preditos in silico*, em células de glioblastoma irradiadas com raios gama

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.  
Área de concentração: Genética

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Apoio e Suporte Financeiro**

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Proc. N° 2009/10925-6).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. (Proc. N° 483495/2007-7, 473684/2009-8, 143379/2008-9 e 201556/2011-1)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

## **AGRADECIMENTOS**

À **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela orientação e por ter me fornecido condições para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço às oportunidades oferecidas, carinho, amizade e paciência.

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** por todo o incentivo e apoio, pela amizade e convivência durante este período de trabalho.

Ao **Prof Dr Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof Dr Aguinaldo Luiz Simões** (ex-chefe) pela atenção e apoio prestados.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP pelo apoio em momentos cruciais para o desenvolvimento desta tese.

À **Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seu laboratório.

Ao **Prof. Dr Siamak Haghdoost**, por ter me aceitado e me orientado no período de estágio sanduíche, além da amizade e da ajuda na adaptação ao frio nórdico.

Ao pós-doutorando **Stephano Spanó Mello** e à mestre **Flávia S. Donaires** por sua imensa ajuda na orientação e na análise dos dados.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Luiz Augusto da Costa Júnior** e **Sueli Aparecida Neves**, por toda a assistência prestada, ensinamentos e amizade.

À secretaria do departamento de Genética, principalmente a **Sra Silvia Sant'anna Consiglieri** e **Sra Susie Adriana Nalon**, pela atenção e atendimentos prestados.

À instituição **FAPESP e CNPq** pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho seria possível.

Ao pessoal do Laboratório de biologia e genética de abelhas, Vera, Juliana, Aline e Michelle, pelo auxílio na utilização dos equipamentos e análise dos resultados.

Aos amigos de Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental: Danilo (Xitão), companheiro desde a iniciação científica, ajudou-me em todos os momentos, e principalmente no fechamento deste trabalho, além de sempre perder para mim no futebol; Giovana e Paulinha, sempre companheiras, me ajudaram quando precisei; Ana Paula, pela ajuda e por ter sofrido em conjunto nos experimentos de nossas teses; Ao Leo, Tiago, Andrés, William, Fernada C., Fernanda P., e Veronica, muito obrigado pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos ex-alunos deste laboratório, mas que de alguma forma ajudaram neste trabalho: Raquel, Gustavo, Danillo, Filipe, e Flávia. A última, para quem agradeço duas vezes, foi essencial neste trabalho, sempre presente em todas as etapas.

Aos amigos de longa data de Ribeirão: Xitão, Biscuit, Kaba, Baba, Trava, Xato, Michael, Miojo, Rosca, Joãozinho; amigos mais recentes: João Paulo, Luís, Patrícia, Tiago e Edu; e de Águas: Egídio, Porva, Tiagão e Júnior. Muito obrigado por proporcionar ótimos momentos em minha vida.

Aos meus pais, **Aparecido e Cecília** pelo carinho, disposição em ajudar e por proporcionar tantas oportunidades, fazendo com que eu chegasse até esse ponto. Aos meus irmãos: **Douglas, Monika e Netto**, pelos incentivos, discussões, amizade e churrascos, além dos sobrinhos Rafa, Júlia, Samuel e Ian e das cunhadas Francis e Carina.

À minha namorada **Mônica**, pela extrema paciência, ajuda, companheirismo e amor. Sempre me aturou mesmo quando estava de mau humor quando os experimentos não davam certo. Também agradeço à sua família: Bernardo, Romilda, Ivan e Fábio.

## **RESUMO**

GODOY, P. R. D. V. **Efeitos do silenciamento de E2F1 e HEB, fatores de transcrição preditos *in silico*, em células de glioblastoma irradiadas com raios gama.** 2013, 189 f, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O glioblastoma multiforme (GBM) é um dos tumores mais letais e a radioterapia permanece como um dos principais tratamentos. Novas estratégias são necessárias para coibir a resistência ao tratamento, como o silenciamento de fatores de transcrição (FTs). Nossa hipótese é a de que FTs associados a listas de genes diferencialmente expressos, os quais foram selecionados para linhagens de GBM irradiadas, ou comparando amostras de GBM à amostras de tecido cerebral, possam fornecer alvos moleculares que aumentariam a morte das células tumorais, quando silenciados. Foram analisadas a proliferação, morte e ciclo celular, além da formação e diferenciação de neuroesferas, utilizando, em quase todas as etapas, a citometria de fluxo. Os FTs HEB e E2F1, cujas funções principais estão relacionadas à neurogênese e proliferação celular, foram selecionados a partir das análises *in silico* de GBM irradiados ou não, ou de GBMs comparados a amostras de cérebro normal, respectivamente. Esses FTs encontram-se expressos em linhagens U87, astrócitos primários e neuroesferas provenientes das mesmas, analisadas por *Western blot*. O silenciamento de HEB e E2F1 na linhagem U87, de forma geral, reduziu a proliferação, induziu morte celular e diminuiu a porcentagem de células em G0/ G1, em pelo menos um dos tempos analisados (24, 48 e 72h) em relação ao grupo transfetado com a sequência *scrambled*. O silenciamento de HEB e E2F1 reduziu o número de neuroesferas quando comparadas às células transfetadas com a sequência *scrambled*. Possivelmente, a capacidade anti-proliferativa do silenciamento dos FTs HEB e E2F1 observada no cultivo em monocamada da U87, possam atuar na capacidade de formação de neuroesferas e, consequentemente, podem ter um papel na manutenção das células tronco do GBM. O silenciamento não alterou a radiorresistência da U87 cultivada em monocamada, com exceção dos efeitos do silenciamento de E2F1 em 24 h, em que houve radioproteção. A irradiação não reduziu o número de neuroesferas silenciadas para HEB em comparação ao grupo não irradiado, mas reduziu o número de células presentes nas neuroesferas, indicando uma possível atuação de HEB na resposta à irradiação em neuroesferas, fato este nunca antes descrito. O silenciamento de E2F1 não interferiu na resposta das neuroesferas à radiação. A expressão de CD133 avaliada oito dias após a dissociação das células silenciadas para E2F1 e HEB, cultivadas em meio de diferenciação, foram superiores ao do

grupo *scrambled*, indicando uma possível diminuição na diferenciação celular. O silenciamento dos dois FTs não atuou na seleção positiva de CD133+ após a irradiação, como observado no grupo das neuroesferas transfectadas com a sequência *scrambled* e irradiadas, comparado às não irradiadas. Assim, E2F1 e HEB mostraram-se alvos interessantes no sentido de reduzir a proliferação, tanto em células U87 cultivadas em monocamada quanto em neuroesferas.

**Palavras-chave:** glioblastoma, siRNA, radiações gamma, neuroesferas, fatores de transcrição, HEB e E2F1

## **ABSTRACT**

GODOY, P. R. D. V. **Effects of E2F1 and HEB (transcription factors predicted by *in silico* analysis) silencing in glioblastoma cells irradiated with gamma-rays.** 2013, 189 f, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most lethal tumors, and radiation therapy remains one of the main treatments. New strategies are needed to suppress typical GBM treatment resistance and transcription factors (TFs) silencing seems to be a promising strategy. Our hypothesis is that TFs associated with lists of differentially expressed genes which were selected for irradiated compared to sham-irradiated GBM cell lines, or GBM samples compared to brain tissue samples, could provide molecular targets that are supposed to increase tumor cell death when they are silenced. We analyzed proliferation, cell death and cell cycle progression, besides the formation and differentiation of neurospheres, using several analyses by flow cytometry. The TFs HEB and E2F1, whose primary functions are related to neurogenesis and cell proliferation, were selected from *in silico* analysis of GBM irradiated or sham-irradiated GBMs and GBM samples compared with normal brain samples, respectively. These TFs were found expressed in U87 GBM cell line, and primary astrocytes, as well as in neurospheres derivated from both, as analyzed by Western blot. Silencing of E2F1 and HEB in U87 cells, reduced proliferation, induced cell death and decreased the percentage of cells at G0/G1 (24, 48 or 72h) compared to the scrambled sequence transfected group. HEB and E2F1 silencing reduced the number of neurospheres when compared to cells transfected with scrambled sequence. Possibly, the anti-proliferative ability of silencing of HEB and E2F1 TFs observed in monolayer culture of U87, may act in neurospheres forming capacity and therefore may play a role in the maintenance of GBM stem cells. In our experiments, gene silencing did not alter the radio-resistance of U87 grown in monolayer. Irradiation did not reduce the number of neurospheres silenced for HEB compared to non-irradiated group, but reduced the number of cells present in neurospheres, indicating a possible role of HEB in response to ionizing irradiation in neurospheres, a fact that was not described yet. The silencing of E2F1 in neurospheres did not

affect the response to irradiation. The expression of CD133, as assessed at eight days after the dissociation of cells silenced for E2F1 and HEB (cultured in differentiation culture media), was superior compared with the scrambled group, indicating a possible decrease in cell differentiation. The silencing of both TFs did not influence the positive selection of CD133 after irradiation, as observed in the group of neurospheres transfected with scrambled sequence, and irradiated compared to non-irradiated. Thus, E2F1 and HEB proved to be interesting targets for decreasing proliferation in both U87 cells grown as monolayer or neurospheres.

**Keywords:** glioblastoma, siRNA, gamma radiation, neurospheres, transcription factors, E2F1, HEB.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Diagrama de Venn ilustrando os FTs obtidos na análise de cada linhagem separadamente, ou em cada possível intersecção. Os FTs foram preditos a partir dos genes diferencialmente expressos (resultados da análise dos perfis de expressão gênica por microarranjo) selecionadas para quatro linhagens de GBM, comparando células irradiadas e não irradiadas, coletadas nos tempos de 30 min. e 6 h após a irradiação. Para a predição foi utilizada a ferramenta FatiGO+ v3.2 ..... 51
- Figura 2** Níveis de expressão de HEB obtido pelo método de qPCR (A). Este FT foi associado aos genes regulados em células U87, 30 min. após a irradiação. A caixa representa o intervalo interquartil e a linha tracejada na caixa representa o valor da mediana. B) Expressão proteica por Western blot utilizando anticorpos para HEB (Santa Cruz) e ACTB (Cell Signaling) como controle endógeno, obtidos para células não-irradiadas (Co) e irradiadas com 8 Gy. C) Análise densitométrica das bandas de Western Blot, utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0, os valores representam a expressão de HEB relativamente à ACTB..... 52
- Figura 3:** Expressão de HEB nas linhagens U87MG (U87) e suas respectivas neuroesferas (U87 N) (A) e na linhagem astrocítica ACBRI 371 e suas respectivas neuroesferas (AN) (B). Expressão relativa calculada para análise densitométrica das bandas de Western blot para HEB relativamente à ACTB (C). Foram utilizados os dados de 3 experimentos independentes. O colchete indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as amostras U87 N e ACBRI N. Foram utilizados anticorpos para HEB (Santa Cruz) e ACTB (Cell Signaling), como controle endógeno, na proporção de 1:1000. .... 54
- Figura 4:** Expressão da proteína HEB visualizada por imunocitoquímica nas linhagens U87 (A-C) e ACBRI 371 (D-F). As imagens foram capturadas em filtro DAPI (A e D), que torna possível a observação dos núcleos e FITC (B e E), evidenciando a marcação da proteína HEB. As imagens capturadas nos dois filtros são visualizadas em C e F. .... 55
- Figura 5:** Expressão de E2F1 nas linhagens U87MG (U87) e suas respectivas neuroesferas (U87 N) (A) e na linhagem astrocítica ACBRI 371 e suas respectivas neuroesferas (AN) (B). Expressão relativa calculada para análise densitométrica das bandas de Western blot para E2F1 relativamente à ACTB (C). Foram utilizados os dados de 3 experimentos independentes. O colchete indica diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre as amostras U87 N e U87 N. Foram utilizados anticorpos para E2F1 (Cell Signaling) e ACTB (Cell Signaling), como controle endógeno, na proporção de 1:1000. .... 57
- Figura 6:** A) Expressão de HEB em células da linhagem U87MG transfectada com a sequência de RNA Scrambled (SCR), HEB siRNA (HEB), comparados ao controle (Co) nas concentrações de 25 e 50 nM, 72 h após a inibição. Expressão relativa obtida por densitometria das bandas de Western blot nas concentrações de siRNA de 25 (B) e 50 nM (C), 72 h após a inibição. Foi utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0..... 58
- Figura 7:** Análise da expressão de E2F1 em células da linhagem U87MG transfectada com a sequência de RNA Scrambled RNA (SCR), E2F1 siRNA (E2F1), comparadas ao controle (Co) nas concentrações de 25 (A) e 50 nM (B), 48 e 72 h após a inibição. Expressão relativa obtida por densitometria das bandas de Western blot nas concentrações de siRNA de 25 e 50 nM, 72 h após a inibição (C). Foi utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0..... 60

<b>Figura 8:</b> Curvas de proliferação celular baseadas no número de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB siRNA ou E2F1 siRNA e grupo controle, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy e colhidas 24, 48 e 72 h após a irradiação. Foi utilizado o kit Guava Via Count para determinação da concentração/ viabilidade celular e a leitura feita no citômetro Easycyte Mini System (Merck Millipore). O tempo zero é considerado o momento da irradiação, portanto o valor da duplicação também é zero. ....	61
<b>Figura 9:</b> Curvas de proliferação celular baseadas na taxa de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1 siRNA e grupo controle. Foi utilizado o kit Guava Via Count para determinação do número de células viáveis por meio da análise por citometria (citômetro Easycyte Mini System - Merck Millipore).....	62
<b>Figura 10:</b> Curvas de proliferação celular baseadas na taxa de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB (A) ou E2F1 siRNA (B) colhidas no tempos de 24, 48 e 72 h após a irradiação com 4 Gy. Foi utilizado o <i>kit Guava Via Count</i> para determinação do número de células viáveis e leitura no citômetro <i>Easycyte Mini System</i> (Merck Millipore) .....	63
<b>Figura 11:</b> Curvas de sobrevivência baseadas na porcentagem de células viáveis irradiadas em relação às não irradiadas. Foram utilizados os grupos não transfectados (controle) e transfectados com E2F1, HEB e SCR; irradiados (IR) ou não (NI), analisados nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento. ....	63
<b>Figura 12:</b> Viabilidade de células U87 não transfectadas (Co) ou transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas 24, 48 e 72 h após a irradiação. Foi utilizado o <i>kit Guava Via Count</i> para determinação da viabilidade celular e leitura no citômetro <i>Easycyte Mini System</i> (Merck Millipore) .....	65
<b>Figura 13:</b> Frequências de apoptose e necrose em células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) após a irradiação. ....	65
<b>Figura 14:</b> Distribuição das células em diferentes fases do ciclo celular: U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) após a irradiação. Foi utilizado o <i>kit Guava Cell Cycle reagent</i> e a leitura foi feita no citômetro <i>Easycyte Mini System</i> .....	67
<b>Figura 15:</b> Neuroesferas formadas 6 dias após semeadura de células em meio específico para o seu crescimento em placas de 96 poços. Fotografias obtidas pelo sistema de captura acoplado ao microscópio invertido Nikon TS100 em aumento de 100x. Foram consideradas as neuroesferas com mais de 60 µm de diâmetro. A barra de escala corresponde a 200 µm. ....	68
<b>Figura 16:</b> Correlação linear entre o número de células semeadas/ número de neuroesferas. As esferas foram contabilizadas 6 dias após a radiação. As neuroesferas foram formadas a partir de células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, e irradiadas 48 h após o processo de transfeção. As células foram semeadas em triplicatas e em quantidades gradativas de 10-500 por poço em placas de 96 poços. ....	69
<b>Figura 17:</b> (A) Número de neuroesferas formadas a partir de 500 células de U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência <i>scrambled</i> (SCR), HEB ou E2F1	

siRNA, irradiadas 48 h após a transfecção, e colhidas 6 dias após a irradiação. As linhas contínuas representam diferenças significativas entre grupos irradiados (IR) e não irradiados (NI), enquanto que a linha tracejada indica a diferença entre os grupos silenciados com o controle *Scrambled* (B) Porcentagem do número de neuroesferas formadas nos grupos celulares irradiados (IR) em relação às neuroesferas formadas nos grupos celulares não irradiados (NI). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre as amostras são indicadas pelos colchetes ..... 71

**Figura 18:** Número de células presentes em cada neuroesfera, que foram contabilizadas após semeadura de 500 células de U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas 48 h após a transfecção, e colhidas 7 dias após a irradiação. Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas por um colchete, analisadas pelo teste-t ..... 72

**Figura 19:** Porcentagem de células marcadas positivamente para CD133 8 dias após a dissociação das neuroesferas formadas a partir das células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas 48 h após a transfecção e analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados dois experimentos independentes. O grupo NE, considerado como controle positivo, consistiu em neuroesferas cultivadas em meio específico para as mesma. Todas as outras células foram semeadas em meio de diferenciação. Os colchetes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) obtidas pelo teste-t ..... 72

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR. Os iniciadores do gene <i>B2M</i> também foram utilizados na PCR convencional para a confirmação da integridade do cDNA produzido por RT-PCR.....	37
<b>Tabela 2</b> Fatores de transcrição associados a genes significativamente expressos (SAM, FDR ≤ 5 %), predito pelo FATIGOplus v3.2., para as linhagens U343, U87, T98 e U251 (30 min. e 6 h após a irradiação). Foram utilizadas listas de genes com padrão de repressão (↓) e indução (↑) em células irradiadas comparadas às células não irradiadas. O índice de Enriquecimento (IE) calculado para cada TF corresponde ao incremento no número de genes (%) significativamente modulados (SAM) que se apresentaram associados a um determinado FT (Lista 1) dividido pelo número total de genes (%) presentes nos microarranjos, os quais são alvos do mesmo FT (Lista 2). A distância gênica de 10 kb foi escolhida para a análise.....	48
<b>Tabela 3:</b> Dados da análise de regressão linear (equação da reta e coeficientes de regressão R <sup>2</sup> ) a partir do número inicial de células semeadas (x) em relação ao número observado de neuroesferas (y) nos diferentes tratamentos, bem como os resultados de eficiência de clonagem para cada tratamento. ....	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

GBM: Glioblastoma multiforme  
WHO: World Health Organization  
TP53: Tumor protein p53  
RB: Retinoblastoma protein  
RTK: Receptor tirosine kinase  
*IDH*: Isocitrate dehydrogenase  
*NF1*: Neurofibromin 1  
*ERBB2*: neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog  
NFKBIA: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha  
ATM: Ataxia telangiectasia mutated  
H2AX: H2A histone family, member X  
CHK2: Checkpoint kinase 2  
RPA: Replication Protein A  
BRCA1: Breast cancer 1, early onset  
MYC: V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)  
AP-1: activator protein 1  
E2F1: E2F transcription factor 1  
E2F4: E2F transcription factor 4, p107/p130-binding  
EGF: fator de crescimento epidermal  
bFGF: fator de crescimento básico de fibroblastos  
RI: Radiação ionizante  
DSBs: *double-strand breaks*  
SSBs: *single-strand breaks*  
HRR: *homologous recombinational repair*,  
NHEJ: *non homologous end-joining*,  
NER: *nucleotide excision repair*  
*mismatch repair*, MMR  
FT: Fator de transcrição  
shRNA: *short hairpin RNA*  
siRNA: *small interfering RNA*  
RNAi: RNA interferente  
RISC: RNA Induced Silencing Complex  
mRNA: RNA mensageiro  
CTC: Células tronco de câncer  
CD133: Prominin 1  
SAM: Significance Analysis of Microarrays  
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase  
IE: Índice de Enriquecimento:  
REST: Relative Expression Software  
qRT-PCR: quantitative real time polymorphism chain reaction

## Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1. Incidência, caracterização e tratamento padrão de Glioblastoma (GBM) .....	20
1.2. Mecanismos de indução de danos no DNA pelas radiações ionizantes (RI) ..	21
1.3. Novas abordagens no tratamento do glioblastoma.....	24
1.3.1. Maquinaria da transcrição como possível alvo terapêutico .....	24
1.3.1.1. Princípios da inibição molecular por siRNA .....	25
1.3.2 Células-tronco de câncer (CTC) e resistência ao tratamento.....	27
1.4. O emprego dos microarranjos de DNA e ferramentas de bioinformática na busca de novos alvos terapêuticos.....	29
2. OBJETIVOS .....	32
2.1. Objetivos específicos .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Cultivo celular e irradiação.....	34
3.2. Cultivo de neuroesferas, modificado a partir de vários protocolos (Singh et al., 2003; Rappa et al., 2008; Ajeawung e Deepak Kamnasaran, 2010) .....	35
3.3. Análise bioinformática para seleção de fatores de transcrição associados a genes diferencialmente expressos em experimentos de microarranjos .....	35
3.4. Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR.....	36
3.5. Western blot.....	38
3.5.1. Extração de proteínas .....	38
3.5.2. Eletroforese de proteínas .....	39
3.5.3. Transferência eletroforética.....	39
3.5.4. Imunodetecção e visualização das proteínas.....	40
3.6. Imunocitoquímica.....	40

3.7. Ensaio de inibição da expressão gênica por siRNA .....	41
3.8. Ensaios de proliferação e viabilidade celular.....	42
3.9. Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo .....	43
3.10. Ensaio de limite de diluição e determinação do número de células por neuroesfera.....	44
3.11. Ensaio de Imunofluorescência para a detecção de CD133 .....	44
3.12. Análise estatística .....	45
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. Predição de FTs a partir de dados de expressão gênica por microarranjos obtidos em linhagens de GBM irradiadas .....	47
4.2 Expressão de HEB avaliada por qPCR em tempo real, Western blot e Imunocitoquímica.....	51
4.3. Análise de Expressão de E2F1 por Western blot .....	55
4.4. Expressão da proteína HEB após o silenciamento por siRNA.....	58
4.5. Expressão da proteína E2F1 após o silenciamento por siRNA .....	59
4.6. Proliferação celular .....	59
4.7. Análise de viabilidade e morte celular.....	64
4.8. Análise da cinética do ciclo celular .....	66
4.9. Ensaio de limite de diluição na formação de neuroesferas .....	68
4.10. Avaliação do número de células presentes nas neuroesferas.....	71
4.11. Avaliação das células marcadas com o anticorpo CD133 por imunofluorescência .....	73
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1. Predição de FTs a partir de dados de expressão gênica por microarranjos obtidos em linhagens de GBM irradiadas .....	75
5.2. Expressão de HEB e efeitos do silenciamento desse gene .....	79
5.3. Expressão de E2F1 e efeitos do silenciamento desse gene.....	81
5.4. Formação de neuroesferas e diferenciação.....	87

6. CONCLUSÕES .....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
ANEXO 1: Publicações .....	118
ANEXO 2: Capítulo de livro: Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines.....	119
ANEXO 3: Capítulo de livro ( <i>in press</i> ): In silico Analysis of Transcription Factors Associated to Differentially Expressed Genes in Irradiated Glioblastoma Cell Lines.....	144
ANEXO 4: Artigo submetido: Transcript profiles of gamma-irradiated glioblastoma cell lines that are mutant or wild-type for TP53.....	162

# **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Incidência, caracterização e tratamento padrão de Glioblastoma (GBM)

Os tumores cerebrais primários, com exceção dos meningiomas, constituem aproximadamente 2% de todos os tumores primários (Reifenberger e Collins, 2004), sendo que a incidência desses no mundo é de aproximadamente 7 a cada 100.000 indivíduos por ano (Furnari *et al.*, 2007); a mortalidade mundial anual é de cerca de 128.000 pessoas (Parkin *et al.*, 2001), sendo a quarta causa de morte relacionada ao câncer em pessoas de faixa etária entre 40-60 anos (Rainov *et al.*, 1997). Os tumores em geral são classificados na escala WHO de I a IV, de acordo com o seu grau de malignidade, alterações histológicas e alterações genéticas. Nos tumores de classe IV está incluído o glioblastoma (GBM) (Louis *et al.*, 2007). Este pode se desenvolver *de novo* (GBM primário), ou pela progressão de um astrocitoma anaplásico (GBM secundário). Tais subtipos são tumores distintos, afetam pacientes de diferentes idades e se desenvolvem pelo acúmulo de diferentes alterações genéticas (Kleihues e Ohgaki, 2000).

Nas últimas décadas, estudos citogenéticos e moleculares identificaram um grande número de anormalidades cromossômicas e alterações genéticas em gliomas malignos, particularmente em GBM (Chen *et al.*, 2012). Foi descrito que o GBM geralmente apresenta combinações das seguintes alterações genéticas: perda de heterozigozidade do 10q, amplificação de EGFR, mutações em *TP53*, deleção de *p16<sup>INK4a</sup>* e mutações em *PTEN* (Ohgaki, 2005).

Novos estudos genômicos integrativos evidenciaram de forma abrangente o complexo panorama genômico do GBM, revelando um conjunto de vias de sinalização comumente ativados nesse tipo de tumor, envolvendo *TP53*, *RB* e *RTK* (receptor de tirosina quinase) (Parsons *et al.*, 2008). A maioria dos GBM apresenta alterações genéticas em todas essas três vias, o que estimula a proliferação e

aumenta a sobrevivência celular além da evasão dos *checkpoints* do ciclo celular, senescência e apoptose. Esta abordagem também identificou alterações nunca antes descritas nos genes *IDH1/2*, *NF1*, *ERBB2*, e *NFKBIA* (Chen *et al.*, 2012).

O tratamento do GBM demanda uma conduta agressiva para os pacientes, incluindo a cirurgia, quimioterapia adjuvante (temozolomida), e radioterapia (Stupp *et al.*, 2005). Entretanto, os pacientes portadores de GBM apresentam um péssimo prognóstico e uma média de sobrevida de 14,6 meses a partir do diagnóstico (Ohka *et al.*, 2012). Embora a radioterapia prolongue significativamente as taxas de sobrevida dos pacientes com GBM, a radiorresistência é uma característica típica desse tipo de tumor (Stupp *et al.*, 2007).

## **1.2. Mecanismos de indução de danos no DNA pelas radiações ionizantes (RI)**

O princípio da radioterapia reside no facto de que as radiações induzem lesões no DNA de forma direta e indireta (Hall, 2000). O efeito direto é causado quando ocorre a interação físico-química das RI com o DNA produzindo uma variedade de lesões primárias, tais como quebras de fita simples (*single-strand breaks*, SSBs), quebras de fita dupla (*double-strand breaks*, DSBs), ligações DNA-DNA e DNA-proteína, além de alterações nas bases do DNA (Natarajan *et al.*, 1993; Kruszewski *et al.*, 1998; Chaubey *et al.*, 2001). Por outro lado, o efeito indireto da RI envolve a radiólise, principalmente da molécula de água, e a subsequente reação do DNA com os radicais livres formados alterando bases e açúcares, gerando sítios apurínicos ou apirimidínicos, quebras de fita e *cross-links* entre DNA-proteína (Dizdaroglu *et al.*, 2002).

O reparo por recombinação homóloga (*homologous recombinational repair*, HRR) e pela ligação de extremidades não homólogas (*non homologous end-joining*, NHEJ) são os responsáveis pelo reparo de quebras (Pastink *et al.*, 2001; Bartek e Lukas, 2007), que, se persistentes, podem levar à morte celular. A letalidade geralmente ocorre graças à produção de alterações cromossômicas grosseiras,

como fragmentos dicêntricos e acêntricos, que levam a grandes perdas de material genético, na tentativa da divisão celular (Prise *et al.*, 2005). O reparo de SSBs e DSBs desempenha um papel crítico na sobrevivência e proliferação do tumor (Belli *et al.*, 2002). Já o reparo por excisão de base (*base excision repair*, BER) é considerado o sistema de reparo mais importante na remoção das bases alteradas (Bohr, 2002), embora outros tipos de reparo possam ocorrer, como o reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER), o reparo por pareamento incorreto (*mismatch repair*, MMR), além de HRR e NHEJ (Slupphaug *et al.*, 2003).

As RI também atuam nos *checkpoints* em G1/S, intra-S e G2/M, poucas horas após a exposição (Kuerbitz *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1995; Bartek *et al.*, 2004; Sakamoto-Hojo *et al.*, 2005). A ativação desses *checkpoints* atrasa transitoriamente a progressão no ciclo de células danificadas pela radiação. O bloqueio em G2 facilita o reparo coordenado dos danos no DNA por vias como BER, NHEJ e HRR, promovendo a sobrevivência das células e a sua progressão pelo ciclo celular (Murray e McEwan, 2007). O gene *TP53* apresenta uma importante função no controle do checkpoint G1/S. Quando o status do gene *TP53* é selvagem as células sofrem um bloqueio no ciclo na fase G1, enquanto que as células portadoras do gene *TP53* mutado sofrem um bloqueio nas fases S e G2 (Eastman, 2004).

Em resposta às RIs, ocorre ativação da *TP53*, a qual é capaz de regular genes alvos envolvidos no bloqueio do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA, ou de mudanças no metabolismo (Toledo e Wahl, 2006; Vousden e Lane, 2007). O gene *TP53* atua como um repressor tumoral principalmente ligando-se a genes alvos, regulando sua expressão (Zhao e Piwnica Worms, 2001). Muitos alvos da *TP53* foram descritos (el-Deiry, 1998; Laptenco e Prives, 2006; Horn e Vousden, 2007; Sbisa *et al.*, 2007), enquanto outros foram computacionalmente preditos pela análise de seus sítios de ligação (Hoh *et al.*, 2002; Smeenk *et al.*, 2008; Veprintsev e Fersht, 2008).

Entre inúmeras alterações cromossômicas e gênicas, foi relatado que os GBMs primários apresentam mutações no *TP53* em 31% dos casos (Ohgaki, 2005). O status do *TP53* também influencia os perfis transcricionais de linhagens de GBM, tanto em células não tratadas (Godoy *et al.*, 2011, Anexo 2), quanto células irradiadas (Otomo *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2013b, Anexo 4) . Os dados

relacionados ao prognóstico de pacientes com GBM apresentando mutações no gene TP53 são contraditórios. Enquanto alguns estudos não apresentaram nenhuma relação entre o status do *TP53* e a evolução dos pacientes com GBM (Newcomb *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2001; Batchelor *et al.*, 2004), vários trabalhos mostraram que o gene *TP53* mutado é um fator prognóstico favorável (Smith *et al.*, 2001; Ohgaki, 2005; Milinkovic *et al.*, 2012).

Além da TP53, a proteína ATM é um componente central da sinalização em resposta às DSBs induzidas pela RI, sendo essencial na ativação de diversas respostas moleculares que envolvem regulação transcrecional, bloqueio no ciclo celular e modulação do reparo de DNA (Li *et al.*, 2001; Iliakis *et al.*, 2003). Após a indução por RI, a proteína ATM é ativada e fosforila muitas proteínas alvo, inclusive TP53, H2AX, CHK2, RPA e BRCA1 (Iliakis *et al.*, 2003; Shiloh, 2003; Riballo *et al.*, 2004). Em linhagens primárias de GBM, a expressão de ATM promove a radiorresistência das mesmas (Tribius *et al.*, 2001).

Uma das consequências da irradiação é a indução de morte celular. Baixas doses de RI resultam em uma diminuição na capacidade clonogênica em alguns tipos celulares, o que pode causar a indução de apoptose, enquanto que altas doses tendem a causar necrose (Lennon *et al.*, 1991; DeNardo *et al.*, 2002), embora em outros casos essa resposta seja bloqueada. Por exemplo, alguns tumores sólidos mostram resistência à apoptose após exposição a RI (Furnari *et al.*, 2007; Suzuki e Boothman, 2008). A apoptose é em geral induzida em tumores derivados de células hematopoiéticas, linfóides e germinativas. A indução de apoptose, em contraste a necrose, não leva à lise celular e nem tampouco à resposta inflamatória durante a terapia anticâncer. Quando a reação inflamatória intensa é contida, várias complicações são evitadas, como o edema encefálico (Lin *et al.*, 2008).

Além dos processos de necrose e apoptose, outros tipos de morte celular podem ocorrer em decorrência do tratamento anticâncer: senescência induzida (morte clonogênica) e catástrofe mitótica. A contribuição da senescência para a radioterapia em tumores humanos ainda não é bem elucidada (Suzuki e Boothman, 2008). As células senescentes com danos no DNA, originadas a partir de telômeros disfuncionais, pela exposição a agentes anticâncer, podem perder permanentemente sua função proliferativa, levando a uma morte celular alternativa, apresentando uma

função importante na supressão tumoral. A catástrofe mitótica, por sua vez, é uma morte celular resultante de uma mitose anormal que leva à formação de células grandes com múltiplos micronúcleos e cromatina descondensada (Roninson *et al.*, 2001).

### **1.3. Novas abordagens no tratamento do glioblastoma**

Os atuais estudos em escala genômica bem como a caracterização molecular do GBM permitiram a identificação de potenciais novos alvos terapêuticos em face ao desenvolvimento de novas moléculas e anticorpos monoclonais, incentivando o início de ensaios clínicos (Sathornsumetee *et al.*, 2007; Ohka *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2012; Polivka *et al.*, 2012). As novas terapias são direcionadas contra algumas características do GBM, como as vias metabólicas e de sinalização alteradas, formação de vasos sanguíneos tumorais e microambiente tumoral, sendo estas consideradas e examinadas em triagens clínicas. Novas abordagens envolvendo imunoterapia e vacinas também estão em processo de triagem clínica. No entanto, existe uma grande diversidade e heterogeneidade molecular associada com as vias de sinalização aberrantes no GBM, culminando com a relativa falta de sucesso dessas novas abordagens (Polivka *et al.*, 2012), o que requer estudos em maior profundidade e a busca de novos alvos moleculares.

#### **1.3.1. Maquinaria da transcrição como possível alvo terapêutico**

Considerando-se que a maioria dos protocolos de tratamento ainda é ineficaz, novas abordagens são necessárias para o tratamento do GBM. A maquinaria da transcrição, assim como os seus elementos reguladores também são alvos razoáveis para a aplicação de terapias moleculares. O processo de transcrição depende da interação espacial e temporal coordenada entre a maquinaria transcricional envolvendo RNA polimerase II, fatores de transcrição (FT) e

componentes reguladores transpcionais (elementos promotores, acentuadores (*enhancers*), silenciadores e regiões controladoras de *locus*) (Maston *et al.*, 2006; Thomas e Chiang, 2006). O baixo nível de transcrição dirigido pelos fatores de transcrição (FTs) genéricos associados ao núcleo da enzima RNA polimerase é conhecido como transcrição basal (Hampsey, 1998). No entanto, existem FTs dependentes de condições específicas, que se ligam ao DNA e são capazes de regular positiva ou negativamente o processo de transcrição, dependendo de seus locais de ligação, de suas interações proteicas e de outras influências ambientais (Gaston e Jayaraman, 2003).

A análise pós-genômica das principais famílias de FTs, tanto em células normais quanto em células cancerosas, tem desencadeado discussões sobre a função dos mesmos. Os mecanismos pelos quais os FTs atuam no câncer exibem menor plasticidade de funções em relação às células normais (Battaglia *et al.*, 2010). A evolução de um transcriptoma restrito às células malignas pode ser visto claramente na superfamília de receptores nucleares, como também nas vias envolvendo MYC e AP-1 (Thorne *et al.*, 2009). A rigidez na transcrição desregulada reflete a desregulação simultânea dos *loci* alvo, de tal forma que os sinais de proliferação e sobrevivência são reforçados e sinais antimitóticos são limitados ou perdidos. Proteínas co-repressoras contribuem significativamente para a ruptura desses processos (Battaglia *et al.*, 2010). Portanto, os mecanismos envolvidos na compreensão da regulação gênica e da rede transpcionais pode levar a um melhor entendimento sobre as funções cruciais dos FTs, fornecendo informações para explorar as possibilidades de sua aplicação como alvos moleculares na terapia anticâncer. Novas técnicas para inibição dos FTs têm sido utilizadas, com o emprego de shRNA (*short hairpin RNA*), siRNA (*small interfering RNA*), ribozimas, nucleotídeos anti-senso e pequenas moléculas inibidoras (Mees *et al.*, 2009).

#### **1.3.1.1. Princípios da inibição molecular por siRNA**

A RNA interferente (RNAi) consiste em uma via regulatória endógena que pode levar ao silenciamento de genes. Esta via é conservada evolutivamente, primeiramente descrita em plantas (Hamilton e Baulcombe, 1999) e organismos inferiores (Fire *et al.*, 1998) e, posteriormente, em células de mamíferos (Zamore *et al.*, 2000). De forma semelhante, essa via pode ser induzida ao introduzir, em células de mamíferos, sequências sintéticas de siRNA ou shRNA que, subsequentemente, são processados em siRNAs pela maquinaria celular (Leung e Whittaker, 2005). As siRNAs são, inicialmente, uma molécula de RNA de dupla fita (*double-stranded RNA*, dsRNA), a qual é processada pela endonuclease *Dicer* em sequências curtas e ativas de ~21-25 nucleotídeos (Jinek e Doudna, 2009). Estas sequências, conhecidas como siRNA são acopladas ao complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*, RISC) no qual as fitas são separadas, sendo que uma delas, a fita guia, acoplada à proteína Argonauta liga-se ao mRNA alvo, baseado na homologia das sequências entre o mRNA e a siRNA, clivando-o (Zamore *et al.*, 2000).

Teoricamente, a siRNA pode ser desenhada para a inibição de qualquer gene de interesse baseado apenas na sequência do mRNA. Devido à capacidade de reciclagem do siRNA resultando em vários ciclos de clivagem de mRNA, a partir de uma única molécula de siRNA guia, a técnica de interferência de RNA (RNAi) pode alcançar grande eficiência no silenciamento. A maior barreira para a técnica de RNAi é a dificuldade na entrega das moléculas efetoras, como as siRNA, *in vivo*. Uma estratégia eficiente para a transfecção com siRNA deve superar problemas como baixa estabilidade e biodistribuição inespecífica além de evitar o estímulo de uma resposta imune (Gavrilov e Saltzman, 2012). A estabilidade do silenciamento depende basicamente da estabilidade da proteína a ser silenciada e de alguns fatores, tais como taxa de divisão celular e taxa de degradação do siRNA. Assim, o período de inibição máxima pode variar consideravelmente (Hoffmann *et al.*, 2013).

O RNAi como ferramenta de estudo de genes relacionados a doenças tem sido amplamente utilizado em células de mamíferos (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2005). Além disso, outras abordagens que incluem a aplicação de RNAi estão em evidência, como no estudo do câncer e de doenças infecciosas e respiratórias (Leung e Whittaker, 2005).

### **1.3.2 Células-tronco de câncer (CTC) e resistência ao tratamento**

Algumas células tumorais apresentam potencial para a proliferação continuada, apesar da frequência de fenótipos diferenciados presentes na maioria delas. A etiologia desses tumores sugere a existência de uma população de células que retêm a capacidade de auto-renovação enquanto ainda apresentam a capacidade de gerar células que se diferenciam. Isto leva à hipótese de que a existência de células-tronco de câncer (CTC) nos tumores é responsável pela tumorigênese (Eyler e Rich, 2008), assim como pela manutenção da massa tumoral. A identificação de uma subpopulação de células de tumor cerebral com grande potencial tumorigênico confere suporte à hipótese da existência de CTCs em tumores sólidos (Bao *et al.*, 2006). As CTCs também foram identificadas em linhagens estabelecidas de células tumorais (Fang *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Mitsutake *et al.*, 2007; Rappa *et al.*, 2008).

Foi demonstrado um aumento na expressão de marcadores de superfície celular associados com o fenótipo de células tronco e de oncogenes em linhagens celulares de GBM, carcinoma mamário e melanoma, cultivadas como esferas, em relação às células aderentes. Além disso, as células formadoras de esferas apresentaram um aumento na tumorigênese e no padrão de quimio-sensibilidade, indicando que as células cultivadas como esferas representam uma importante ferramenta no estudo das CTCs (Rappa *et al.*, 2008). As células de GBM que formam esferas são denominadas de neuroesferas.

Em tumores cerebrais, as CTCs representam 1-25% da massa de células tumorais e são caracterizadas pela expressão de CD133, uma proteína considerado como um marcador de célula tronco (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004). As CTCs têm sido isoladas com sucesso graças à seleção celular por esse marcador, sendo que células CD133+ estão presentes em vários tipos de tumores do sistema nervoso, próstata e tumores colorretais. Singh *et al.*, (2003) isolaram a população

CD133+ de gliomas, evidenciando suas propriedades características de CTCs descritas *in vitro*; tais pesquisadores também induziram a formação de tumores *in vivo*, a partir das células CD133+.

A CD133 (Prominina-1) é uma glicoproteína transmembrana e um homólogo humano do PROM1, originalmente isolada de camundongo, seletivamente localizada na superfície apical das células-tronco neuroepiteliais de murinos (Weigmann *et al.*, 1997) e células tronco fetais de fígado, medula óssea e cordão umbilical de humanos (Yin *et al.*, 1997)

Postula-se que a longevidade das células-tronco cancerosas e a sua capacidade de resistência a terapias auxilia na regeneração do tumor, o que proporciona uma explicação plausível para a recorrência de GBM (Liu *et al.*, 2009).

Além disso, as células-tronco CD133+ têm uma maior expressão de BCRP1 e MGMT (genes de resistência a drogas) assim como a presença de proteínas anti-apoptóticas e inibidoras de apoptose, o que explica a resistência destas células à quimioterapia (Liu *et al.*, 2006).

Existem evidências de que as CTCs também atuam na radiorresistência dos tumores. Bao *et al.*, (2006) avaliaram vários parâmetros relacionados à radiorresistência das CTCs de GBM, sendo demonstrado que em células de GBM primárias e modelos xenográficos, foi observado um enriquecimento do número de CTCs CD133+ após a irradiação, além de um aumento na capacidade proliferativa destas relativamente às células não CTC. Segundo Bao *et al.* (2006), tal enriquecimento parece ter sido consequência da apoptose seletiva de células CD133-, ao invés da indução de CD133+ em células que anteriormente seriam CD133-. As células sobreviventes após a irradiação apresentaram capacidade de diferenciação múltipla e de formação de tumores secundários. Resultados de sobrevivência clonogênica indicaram que as células CD133+ foram mais radiorresistentes do que as CD133-. Recentemente, uma estratégia alternativa envolve o tratamento específico para as CTCs presentes no GBM. Contudo, quase todos os inibidores de pequenas moléculas concebidas para atingir essas células não demonstraram eficiência semelhante à terapia convencional (Natsume *et al.*, 2011).

Apesar do recente avanço no estudo das CTCs e sua resistência à quimio- e radioterapia, os resultados são ainda incipientes e muito pouco tem sido aplicado à prática clínica, sendo que ainda, os pacientes com câncer recorrente metastático têm sido tratados pelo método convencional intensivo. Portanto, parece plausível que a combinação de quimio- e radioterapia com agentes sensibilizadores possa oferecer expectativas mais promissoras no tratamento racional de tumores sólidos. Além disso, a proposta de uma terapia anti-CTC deve levar em consideração que esta deva alvejar preferencialmente, entre as CTCs, somente as moléculas e vias que não são cruciais para as células-tronco normais, o que constitui um grande desafio científico.

#### ***1.4. O emprego dos microarranjos de DNA e ferramentas de bioinformática na busca de novos alvos terapêuticos***

A técnica de microarranjos de DNA é uma ferramenta importante no estudo da maquinaria transcrecional (Kel *et al.*, 2006) e quantifica a expressão simultânea de milhares de genes para identificar alterações nos perfis de expressão transcrecional em diferentes condições biológicas, permitindo a comparação de vários tipos celulares sob diversos tipos de tratamentos (Turenne *et al.*, 2001; Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003; Fachin *et al.*, 2007; Fachin *et al.*, 2009; Carminati *et al.*, 2010).

Embora a quantidade de alvos fornecida por essa metodologia seja muito grande, as ferramentas de análise bioinformática podem reduzir grandes listas de genes a um pequeno número de FTs que regulam esses genes, fornecendo potenciais alvos mais significativos para a inibição molecular. Recentemente, o conhecimento sobre a regulação da expressão gênica também pode ser utilizado no contexto dos testes de enriquecimento funcional; nesse sentido, diferentes bases de dados que contêm informações sobre os locais de ligação dos FTs no DNA e outras regiões reguladoras estão disponíveis, permitindo buscar regiões promotoras dos genes e detectar a presença de sequências alvos (Al-Shahrour *et al.*, 2007). Essa

informação permite determinar se um conjunto de genes pré-selecionados está sob controle de um determinado FT.

A ferramenta *online* FatiGOplus (Al-Shahrour *et al.*, 2005) é capaz de associar FTs que são comuns a um conjunto de genes utilizados como parâmetros. Essa ferramenta tem sido utilizada em alguns trabalhos de nosso grupo de pesquisa. Vários FTs foram preditos a partir de listas de genes que foram modulados em células GBM tratadas com inibidor de DNA-PK e tratadas com cisplatina (Carminati *et al.*, 2013). Em outro trabalho, essa técnica de predição foi aplicada a um conjunto de dados obtidos a partir de repositórios públicos de experimentos de microarranjos, envolvendo várias amostras de GBM e de amostras de cérebro; nesse trabalho, a indução de dois FTs preditos, E2F1 e E2F4, foram validados em várias linhagens celulares de GBM por PCR em tempo real (Donaires *et al.*, 2013). Finalmente, também foi realizada a predição de FTs a partir de listas de genes diferencialmente expressos (microarranjos) em linhagens GBM, fornecendo vários alvos para silenciamento (Godoy *et al.*, 2013a, Anexo 2).

Assim, a hipótese do presente trabalho se baseia na proposta de que os FTs associados a listas de genes diferencialmente expressos, os quais foram selecionados para linhagens de GBM irradiadas, ou comparadas a amostras de tecido cerebral, possam fornecer alvos moleculares que supostamente aumentariam a morte das células tumorais, quando silenciados. Além disso, baseado no fato de que os FTs possuem um papel regulatório crucial em vários processos biológicos, torna-se plausível a suposição de que o silenciamento de FTs importantes na resposta à irradiação possa alterar a formação de neuroesferas, assim como sua resposta às radiações ionizantes.

# **OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

Selecionar fatores de transcrição preditos por análises *in silico* a partir de dados de microarranjos (GBM irradiadas vs GBM não irradiadas; GBM vs amostras de cérebro normais) para posterior avaliação do efeito de seu silenciamento na radioresistência, por meio da realização de vários ensaios: análise de proliferação, morte e ciclo celular, além de ensaios de formação e diferenciação de neuroesferas.

### 2.1. *Objetivos específicos*

- 1) Identificar FTs alvo a partir da predição *in silico* utilizando como base de dados os genes diferencialmente expressos após a irradiação (8 Gy) de linhagens de GBM (T98G, U343MG-a, U251 e U87MG).
- 2) Confirmar a expressão de alguns FTs por imunocitoquímica (U87MG e ACBRI 371), qPCR em tempo real (U87MG) e Western blot nas linhagens U87MG, ACBRI 371 e em suas respectivas neuroesferas.
- 3) Validar a expressão protéica de E2F1 (FT predito por meio de análise *in silico* realizada anteriormente para um conjunto de dados obtidos a partir de repositórios públicos de experimentos de microarranjos envolvendo várias amostras de GBM comparadas a amostras de tecido cerebral de epiléticos) em linhagens U87MG e ACBRI 371, bem como em suas respectivas neuroesferas.
- 4) Verificar se a inibição dos fatores de transcrição *HEB* e *E2F1* altera a capacidade proliferativa, cinética do ciclo celular e morte celular em experimentos com a linhagem U87MG.
- 5) Avaliar se o silenciamento de *HEB* e *E2F1* altera a formação de neuroesferas e também a porcentagem de células CD133 positivas nas células da linhagem U87MG, irradiadas ou não.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo celular e irradiação

No presente trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares de glioblastoma multiforme, U87MG (*The European Collection of Cell Cultures/ Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) e linhagem primária de astrócitos cerebrais, ACBRI 371 (Cell Systems Corporation, Kirkland, WA, EUA). Essas células foram utilizadas para os experimentos de validação dos FTs, inibição por siRNA e formação de neuroesferas. As linhagens de GBM T98G, U251MG, U343MG-a e U87 MG foram utilizadas nos experimentos de microarranjos realizados previamente, cujo resultado serviu de base para a predição dos FTS deste trabalho (Godoy *et al.*, 2013a, Anexo 2). As linhagens T98G e U251 apresentam mutações nos genes *TP53*, *p16*, *p14ARF* e *PTEN*, enquanto que U343 e U87 apresentam mutações para os três genes analisados, mas é selvagem para *TP53* (*Ishii et al.*, 1999).

As células previamente mantidas congeladas em nitrogênio líquido foram cultivadas em monocamada, em meio DMEM + HAM-F10 (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal (Cutilab, Campinas, Brasil) a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C até atingirem o estado de semiconfluência quando foram subcultivadas e preparadas para os experimentos.

As culturas foram submetidas ao protocolo de irradiação (radiação-γ, fonte <sup>60</sup>Co, taxa de dose de 0,5 Gy/min, aparelho Gammatron S-80, Siemens, 1,25MeV, do HC-FMRP/USP) com a dose de 4 Gy, sendo analisadas em tempos variáveis de acordo com os protocolos de cada ensaio, descritos a seguir. Nos experimentos de microarranjos a partir das células GBM irradiadas, foi utilizada a mesma fonte, mas com a taxa de dose de 2 Gy/min.

### **3.2. Cultivo de neuroesferas, modificado a partir de vários protocolos (Singh et al., 2003; Rappa et al., 2008; Ajeawung e Deepak Kamnasaran, 2010)**

Para a cultura de neuroesferas foram utilizadas células provenientes das linhagens U87MG e ACBRI 371. Inicialmente cultivadas em monocamada, como descrito anteriormente, essas células foram individualizadas e semeadas em meio de cultivo de neuroesferas. A soltura das células foi realizada com o auxílio de solução proteolítica e colagenolítica de accutase (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) visto que a tripsina pode clivar a proteína CD133 e consequentemente afetar a formação de neuroesferas. Esta enzima também foi utilizada no momento de dissociação das neuroesferas.

O meio de formação de neuroesferas consiste em DMEM/F12 (Invitrogen), 20 ng/mL de fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF, PeproTech EC Ltd., Londres, Reino Unido), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF, Peprotech), 10 ng/mL de fator de inibição de leucemia (Merk Millipore) e 20 µL/mL de suplemento B27 (1:50, Life Technologies Corporation). As culturas foram mantidas em estufa (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C por tempo variado, de acordo com o experimento, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias.

As neuroesferas derivadas da linhagem ACBRI 371 foram utilizadas nos experimentos de Western blot, enquanto que as derivadas da U87 foram utilizadas em Western blot e no ensaio de limite de diluição.

### **3.3. Análise bioinformática para seleção de fatores de transcrição associados a genes diferencialmente expressos em experimentos de microarranjos**

A análise dos FTs relacionados aos genes diferencialmente expressos (SAM) foi realizado pela ferramenta online FatiGOplus (Al-Shahrour et al., 2005), utilizando-se os dados obtidos previamente em experimentos de microarranjos de DNA em linhagens de GBM irradiadas (Godoy et al., 2013b, Anexo 4). Este programa utiliza

a base de dados de FTs TRANSFAC (Wingender *et al.*, 2000) e CisRed (Robertson *et al.*, 2006), incluindo seus respectivos sítios de ligação e genes regulados. O FatiGOplus busca por enriquecimentos significativos comparando a porcentagem de genes da lista de genes (fornecidos pelo SAM) regulados por um FT, à porcentagem de genes presentes na lista de referências completa reguladas pelo mesmo (FT Al-Sharour *et al.*, 2007); no presente trabalho, essa lista compreende 4300 clones que foram depositadas sobre a lâmina de microarranjo.

Os valores-p obtidos na análise de elementos de regulação foram estabelecidos pelo programa, utilizando o teste exato de Fisher para comparações múltiplas (valor-p não ajustado). O Índice de Enriquecimento (IE) é calculado para cada FT e corresponde ao incremento obtido quanto ao número de genes (%) estatisticamente modulados (SAM) e que estão associados a um FT específico (Lista n º1) dividido pelo número total de genes (%) presentes no microarranjos que foram associados ao mesmo FT (Lista n º 2):

$$\text{IE} = \% \text{ Lista de genes \#1} / \% \text{ lista de genes \#2}$$

Os FTs com valor-p não ajustados <0,05 foram selecionados. Os genes foram submetidos ao FatiGOplus v3.2, usando como identificador o símbolo do gene e a distância gênica (estabelecida como 10 kb). Depois de selecionar os FTs associadas aos genes modulados (SAM), foi realizada uma pesquisa no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) à procura de funções biológicas desses FTs.

### **3.4. Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR**

Foi analisada a expressão de HEB, um FT predito (por análise *in silico*) que foi associado a 57,7% dos genes modulados em células U87, 30 min. após a irradiação. O cDNA foi produzido por transcrição reversa utilizando as mesmas

amostras de RNA utilizadas nos microarranjos, com o auxilio da *Superscript III Reverse Transcriptase kit* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade das amostras de cDNA foi avaliada pela amplificação do gene endógeno B2M e visualização em gel de agarose submetido à eletroforese. A qRT-PCR foi realizada utilizando SYBR green master mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e os níveis de expressão foram calculados pela ferramenta Relative Expression Software (REST) (Pfaffl *et al.*, 2002), utilizando 10,000 interações como parâmetro de configuração. Todos os iniciadores (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA) foram desenhados com o auxilio do software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) e em exons diferentes, visando evitar a amplificação de DNA genômico residual (**Tabela 1**). As reações foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando conjuntos de iniciadores com uma temperatura de anelamento de cerca de 60 °C e amplicon de 100-120 pb. O ciclo de PCR foi o seguinte: Pré-aquecimento a 50 ° C durante 2 min, 10 min. a 95 ° C (passo de desnaturação), seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s, e a 60 ° C durante 60 s. As curvas de dissociação foram estabelecidas como se segue: 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 20 s e 95 ° C durante 15 s.

**Tabela 1:** Lista de iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR. Os iniciadores do gene B2M também foram utilizados na PCR convencional para a confirmação da integridade do cDNA produzido por RT-PCR.

Iniciadores	Sequência	Amplicon (pb)
B2M – forward	5'- AGGCTATCCAGCGTACTCCA - 3'	112
B2M – reverse	5' - TCAATGTCGGATGGATGAAA - 3'	
HEB – forward	5' - CCGCTTGAGTTATCCTCCAC - 3'	116
HEB – reverse	5' - GTGAGGCAGCAACGTAAGGT - 3'	

### **3.5. Western blot**

Esta técnica foi utilizada para a validação da expressão dos FTs HEB e E2F1 nas linhagens U87MG, ACBR 371 e também nas neuroesferas provenientes das mesmas. Além disso, esta também foi utilizada para detectar a redução na expressão desses mesmos FTs após a utilização da técnica de siRNA. Para as linhagens, foram semeadas um milhão de células e estas foram colhidas 24 h após a semeadura. As neuroesferas foram inicialmente semeadas a partir de um milhão de células U87 em meio de crescimento de neuroesferas, onde as mesmas cresceram por 3 dias e depois foram colhidas, enquanto que as neuroesferas provenientes da linhagem ACBRI foram cultivadas por 2 semanas antes de serem colhidas.

#### **3.5.1. Extração de proteínas**

As células foram brevemente tripsinizadas (no caso das células aderentes) e lavadas uma vez com PBS gelado. Posteriormente, foi adicionada a solução de lise ProteoJ<sup>TM</sup> Mammalian Cell Lysis Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA) gelada (100-200 µL/10<sup>6</sup> células) com 1% de inibidores de proteases Halt<sup>TM</sup>Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc). As células foram ressuspensas em vórtex e permaneceram por 10 minutos no shaker (1200 rpm). Logo após, o lisado celular foi centrifugada a 18.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e estocado a -80°C. As proteínas foram então quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida a partir de uma proteína conhecida (por exemplo: soro albumina bovina) utilizando-se o kit BSA (Thermo Fisher Scientific, Inc).

### **3.5.2. Eletroforese de proteínas**

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com dimensões 8 x 8 x 0,1cm (Invitrogen). As amostras foram preparadas com 30 µg de proteína, tampão NUPAGE Sample Buffer (Invitrogen) e agente redutor NUPAGE (Invitrogen). Estas foram desnaturadas a 70º C por 10 minutos e posteriormente aplicadas ao gel. Os marcadores de peso molecular empregados foram: MagicMark™ XP Western Protein Standard e SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, ambos da Invitrogen. A eletroforese foi realizada em cuba (XCellSureLock™ Mini-Cell/Invitrogen) contendo tampão SDS (Invitrogen), sendo aplicados 200V por 50 minutos.

### **3.5.3. Transferência eletroforética**

Após a eletroforose, as proteínas foram transferidas do gel para membranas Invitrolon PVDF (Invitrogen, USA) utilizando-se o sistema XCell II™ Blot Module (Invitrogen). Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi de 30V por cerca de 90 minutos, sendo que esse tempo foi variável dependendo do peso molecular da proteína estudada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por 5 minutos com o corante SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Posteriormente, as mesmas foram lavadas e submetidas à imunodetecção.

### **3.5.4. Imunodetecção e visualização das proteínas**

A imunodetecção e a visualização das proteínas foram realizadas com o auxílio do kit “Western Breeze Chromogenic” (Invitrogen). A membrana foi imersa em 10 mL de solução bloqueadora e incubada durante 30 minutos em um *shaker* rotatório. Em seguida, a mesma foi enxaguada com 20 mL de água deionizada durante 5 minutos e incubada com 10 mL da solução de anticorpo primário *overnight*. Após esse passo, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos (Invitrogen). A membrana então foi incubada em 10 mL da solução de anticorpo secundário por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavada quatro vezes por 5 minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados três enxágues com 20 mL de água por 2 minutos. Após este último, a membrana foi incubada com 5 mL de substrato cromogênico até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas 3 vezes em água deionizada, sendo posteriormente secadas em papel de filtro. Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti-HEB, anti-Actina β (ambos da Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) e anti-E2F1 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, EUA). Foram realizadas padronizações para otimização tanto da concentração de anticorpos quanto para a quantidade de proteínas que seriam utilizadas para os ensaios. Os anticorpos foram utilizados na concentração de 1/1000. A análise densitométrica das bandas de WB foi realizada pelo programa Gel Pro Analyzer 4,0 (MediaCybernetics, Rockville, EUA) e a expressão relativa de HEB e de E2F1 foi calculada relativamente à ACTB.

### **3.6. Imunocitoquímica**

Esta técnica foi utilizada para a verificação da expressão de HEB nas células U87 e ACBRI. Foram semeadas 50.000 células em placas de 6 poços contendo uma

lamínula/ poço. Após 24h os poços foram lavados com PBS e em seguida fixados por 10 min. em uma solução de PBS com 3% paraformaldeído e 2 % sucrose (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton 0,5% X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha) em PBS durante 10 min. à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo anti-HEB, diluído na proporção 1:100 em PBS suplementado com 2% de albumina sérica bovina fração V (BSA, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37 °C. O anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, Alexa-Fluor 488, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foi diluído 1:100 em BSA a 2% e aplicada às células durante 30 min. a 37 °C. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (90 µM em PBS, Sigma-Aldrich) durante 10 min. As lâminas foram montadas usando Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), seladas e armazenadas na ausencia de luz a 4 °C até a análise. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Inc., Hallbergmoos, BA, Alemanha) equipado com filtro triplô para DAPI, FITC e Rodamina.

### **3.7. Ensaio de inibição da expressão gênica por siRNA**

As células foram semeadas em frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, 1x10<sup>6</sup> células em 3 mL de meio de cultura (DMEM + HAM F10, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de SBF (Cutilab) sem antibióticos. Em seguida, as células foram incubadas até atingirem 60-80% de confluência (período de 18 a 24 h).

Para o silenciamento dos FTs *HEB* e *E2F1* foram utilizados os oligômeros *HEB* (A20) siRNA (sc-357 - **Santa Cruz Biotechnology Inc.**) e *E2F1* siRNA (sc-29297, **Santa Cruz Biotechnology Inc.**) que apresentam três sequências de 20-25 nucleotídeos para os mesmos genes. O oligômero foi transfetado na linhagem U87MG utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Inicialmente, o oligômero foi centrifugado e ressuspendido em água livre de nuclease a uma concentração de 10 µM. Para a transfecção, 15 µL de Lipofectamina (Invitrogen) foram diluídas em 100 µL do meio Opti-MEM (Life Technologies Corporation) pré-aquecido a 37°C e

incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o oligômero foi diluído em 100 µL do meio Opti-MEM (Life Technologies Corporation) para atingir uma concentração final de 25 nM ou 50 nM, quando adicionado às células. Após os 5 minutos de incubação, a Lipofectamina (Invitrogen) diluída foi combinada com o oligômero diluído e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o complexo oligômero-Lipofectamina foi adicionado a 2,8 mL de meio de cultura sem antibióticos produzindo um volume final de 3 mL. A transfecção ocorreu por 6 h, quando as células foram lavadas e um novo meio foi adicionado. Após esse procedimento, as células transfectadas foram incubadas por 24 a 96 horas a 37°C. A eficiência da transfecção foi monitorada por qPCR em temp real e *Western blot*. Como controle desta, foi utilizada a sequência *scrambled* (sc-37007, **Santa Cruz** Biotechnology Inc.) na mesma concentração que o siRNA. Após a padronização, foi escolhida a concentração de siRNA de 25 nM.

### **3.8. Ensaios de proliferação e viabilidade celular**

Foram semeadas  $1 \times 10^6$  células em frascos de cultivo, incubando-as por 24h. Decorrido esse tempo, procedeu-se a inibição por si RNA, sendo as células incubadas por 24 h. Em seguida, as culturas foram irradiadas com 4 Gy, sendo colhidas nos tempos de 24, 48 e 72h após a irradiação. No momento da colheita o meio foi removido e guardado, enquanto as células foram lavadas com PBS, individualizadas com accutase (Merck Millipore) e coletadas com o meio previamente guardado. 20 µL da solução de células foram adicionadas a 380 µL do Kit Guava ViaCount (Merck Millipore), e armazenadas a temperatura ambiente por 5 minutos, seguida pela leitura no citômetro. Este kit ajuda na detecção de células viáveis e passou a ser utilizado em todas as etapas de contagem e semeadura de experimentos. Para os experimentos de proliferação foram quantificadas as células viáveis em cada ponto experimental; a contagem do número de células inicialmente semeadas possibilita estimar a proliferação celular e assim, os resultados podem ser

representados como índices de duplicação celular. Além disso, é possível determinar a porcentagem de células mortas por apoptose e necrose.

As amostras foram analisadas utilizando o citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck Millipore) e o Software GuavaCytoSoft 4.2.1 (Merck Millipore), onde pelo menos 1000 eventos foram analisados para cada amostra. No teste de proliferação, foi utilizado um índice de divisão celular baseado no número de células colhidas/ pelo número de células semeadas. Também foi possível quantificar o número de células presentes em neuroesferas, 7 dias após o término do tratamento.

### **3.9. Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo**

As mesmas amostras utilizadas nos experimentos de proliferação celular foram utilizadas para a análise de ciclo celular (exceto os experimentos envolvendo neuroesferas), já que no ensaio de proliferação, apenas uma pequena alíquota (20 µL) de cada amostra é utilizada. No momento da colheita, após a retirada de uma alíquota para o experimento de proliferação, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Neste momento o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e o “pellet” foi lavado com PBS. As células foram novamente centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e, após a centrifugação, o PBS foi removido e o “pellet” ressuspensiondo em 2 mL de etanol 70% gelado e mantido a -20° C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Antes de se proceder à leitura das amostras, o material armazenado a -20° C foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos) e o etanol 70% foi removido. O “pellet” foi ressuspensiondo em 3 mL de PBS gelado e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo citados anteriormente. Após a centrifugação, o PBS foi removido e o “pellet” ressuspensiondo em 200 µL da solução do Guava Cell Cycle Reagent (Merck Millipore). Após 30 minutos de incubação o material foi analisado no citômetro. As amostras foram analisadas utilizando o citômetro *Guava EasyCyte Mini System* (Merck Millipore) e o Software *GuavaCytoSoft 4.2.1* (Merck Millipore), sendo que pelo menos 5000 eventos foram analisados para cada amostra.

### **3.10. Ensaio de limite de diluição e determinação do número de células por neuroesfera.**

A partir de células U87 não transfectadas (Co) ou transfectadas com a sequência scrambled (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, foram semeadas 500, 250, 125, 100, 50, 25 e 10 células/poço em triplicata, em 200 µL de meio para neuroesferas, em placas de 96 poços, 24h após a transfecção. 24 horas após a semeadura, as células foram irradiadas, sendo então mantidas em estufa (5% CO<sub>2</sub>) a 37 C°. Após 6 dias, realizou-se a contagem das neuroesferas com mais de 60 µm, utilizando um microscópio invertido Nikon TS100 em aumento de 100x. No dia seguinte, as neuroesferas foram dissociadas com accutase para proceder a determinação da concentração de suas células utilizando o kit Guava Via Count (Merck Millipore).

### **3.11. Ensaio de Imunofluorescência para a detecção de CD133**

O restante das células dissociadas a partir das neuroesferas provenientes do ensaio de limite de diluição, 6 dias após a semeadura, foi semeado em placas de 6 poços em meio para diferenciação celular, composto de DEM/F12, 10% de SBF (Cultilab) e 1% de penicilina (10.000U)/streptomicina (10 mg) (Sigma-Aldrich). Oito dias após a semeadura, as células que estavam aderidas foram individualizadas (Accutase, Merck Millipore) e preparadas para marcação por imunofluorescência. As células foram lavadas em PBS e centrifugadas por 5 min. a 1000 rpm e fixadas em 4 % paraformaldeído (Merck Millipore) por 15 min. à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as células permanecem 10 minutos em tampão de incubação (0,5% BSA em PBS) para a realização do bloqueio (com o objetivo de diminuir a ocorrência de marcação inespecífica), seguido da centrifugação por 5 min a 1000 rpm. Foi realizada a incubação com o anticorpo anti CD133 (C24B9, Cell Signaling) na proporção de 1:100 por 1h a 37°C. Após a mesma, as células foram lavadas com

o tampão de incubação, centrifugadas e incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, Alexa-Fluor 488, Life Technologies Corporation) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, procedeu-se a leitura no citômetro, visando quantificar as células marcadas com o anticorpo anti-CD133. Como controle negativo, as células foram semeadas apenas com o anticorpo secundário. As amostras foram analisadas utilizando o citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck Millipore) e o Software GuavaCytoSoft 4.2.1 (Merck Millipore), sendo que pelo menos 2500 eventos foram analisados para cada amostra.

### **3.12. Análise estatística**

Foram realizados no mínimo 4 experimentos independentes em quase todos os ensaios, exceto para a realização da imuno-marcação e Western blot para validação de FT, para os quais dois experimentos foram conduzidos. Os resultados foram analisados pelo teste-t de Student e o valor  $p<0.05$  foi considerado como significativo. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SigmaStat for Windows Version 3.5 (Jandel Scientific Software), enquanto que as construções de gráficos e tabelas foram realizadas com o auxílio do software Microsoft Excel, pertencente ao conjunto de programas do Microsoft Office Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation). Os resultados mostrados nos gráficos foram realizados a partir das médias dos experimentos e as barras correspondem ao desvio padrão.

# **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Predição de FTs a partir de dados de expressão gênica por microarranjos obtidos em linhagens de GBM irradiadas*

Os dados para análise de FTs foram obtidos em experimentos de microarranjos com amostras de RNA de células GBM (T98G, U251MG, U343MG-a e U87MG) irradiadas (8 Gy) ou não, colhidas 30 min. e 6 h após irradiação. Os exerimentos de expressão gênica por microarranjos foram conduzidos num estudo anterior, utilizando-se a plataforma Amersham III (Array Spotter, Automatic Slide Processor e Laser Scanner) com ≈4300 clones de cDNA (em duplicatas). Nesse trabalho, os resultados de expressão transcrecional foram submetidos ao SAM (*Significance Analysis of Microarray*) (Tusher *et al.*, 2001), comparando os dados obtidos para as linhagens T98G, U251MG, U343MG-a e U87MG irradiadas (8 Gy) *versus* não irradiadas (controles) independentemente, considerando-se dois pontos coleta nos tempos de 30 min. e 6 h, separadamente (Godoy *et al.*, 2013b, Anexo 4). Desta forma, obteve-se a lista de genes diferencialmente expressos em células irradiadas, comparadas às não irradiadas.

Os genes diferencialmente modulados (SAM) foram então submetidos à análise pelo FatiGOplus, com o objetivo de buscar FTs significativamente associados aos genes induzidos e reprimidos para valores de p não ajustados ( $p < 0.05$ ) (**Tabela 2**).

Um diagrama de Venn foi construído com base nos FTs preditos a partir dos dados da análise de expressão gênica transcrecional por microarranjos de DNA obtidos para cada linhagem celular (**Figura 1**). Os FTs preditos no tempo de 30 min. e 6 h foram agrupados conjuntamente. Cada linhagem celular apresentou FTs exclusivos e também comuns às outras linhagens estudadas. Entre 18 FTs exclusivos para a linhagem U87, PEBP ( $p = 0,008$ ), Bach2 ( $p = 0,007$ ), Freac-4 ( $p = 0,003$ ), HLV ( $p = 0,006$ ), Evi-1 ( $p = 0,009$ ) apresentaram baixos valores-p, enquanto que PPARG e SEF-1 apresentaram um IE elevado (31,3). A U343 apresentou 9 FTs

exclusivos; Altos valores de IE foram encontrados para MAF (33,1), E2F:DP-1 (22,0), PR (45,5) e STAT3 (38,5), e ARP-1 foi o FT que apresentou o menor valor-p (0,009). A linhagem T98 apresentou 6 FTs exclusivos: EBF, Pax, Pbx1b, C/EBP, Poly A downstream element e Pax-9; dois deles, EBF e PolyA apresentaram baixos valores-p, 0,005 e 0,007, respectivamente. Considerando as células U251, 13 FTs foram preditos e apenas APOLYA apresentou um alto valor de IE. (**Tabela 2**).

**Tabela 2** Fatores de transcrição associados a genes significativamente expressos (SAM, FDR ≤ 5 %), predo pelo FATIGOplus v3.2., para as linhagens U343, U87, T98 e U251 (30 min. e 6 h após a irradiação). Foram utilizadas listas de genes com padrão de repressão (↓) e indução (↑) em células irradiadas comparadas às células não irradiadas. O índice de Enriquecimento (IE) calculado para cada TF corresponde ao incremento no número de genes (%) significativamente modulados (SAM) que se apresentaram associados a um determinado FT (Lista 1) dividido pelo número total de genes (%) presentes nos microarranjos, os quais são alvos do mesmo FT (Lista 2). A distância gênica de 10 kb foi escolhida para a análise.

U343MG-a					
Tempo de coleta	Fator de transcrição	% de genes (Lista 1)	% de genes (Lista 2)	IE	Valor-p
30 min. (↓)	ARP-1	14,8	6,7	2,2	0,009
	TEF	37,5	25,3	1,5	0,013
	VBP	19,3	10,4	1,9	0,013
	Imperfect Hogness/Goldberg BOX	2,3	0,2	14,2	0,016
	Muscle initiator sequence-20	20,5	12,2	1,7	0,031
	Elk-1	44,3	33,1	1,3	0,038
6 h (↑)	Sox-5	4,6	1,5	3,1	0,048
	ACAAT	12,5	6,7	1,9	0,049
	MAF	50,0	1,5	33,1	0,031
6 h (↓)	E2F-4:DP-1	50,0	2,3	22,0	0,046
	ICSBP	40,0	3,7	10,9	0,013
	PR	20,0	0,4	45,5	0,024
	STAT3	20,0	0,5	38,5	0,028
	ARP-1	40,0	6,7	6,0	0,040

U87 MG					
Tempo de coleta	Fator de transcrição	% de genes (Lista 1)	% de genes (Lista 2)	IE	Valor-p

30 min. (↑)	C/EBPgamma	85,0	64,4	1,3	0,007
	AP-1	80,0	61,1	1,3	0,014
	HEB	57,5	38,5	1,5	0,021
	SREBP-1	97,5	84,5	1,2	0,024
	FOXP3	87,5	72,0	1,2	0,032
	PPARG	2,5	0,1	31,3	0,046
	SEF-1	2,5	0,1	31,3	0,046
	Bach2	63,5	43,9	1,4	0,007
	PEBP	28,9	14,4	2,0	0,008
	COUP-TF:HNF-4	11,5	3,7	3,1	0,014
30 min. (↓)	MEF-3	5,8	1,2	5,0	0,026
	FOX	78,9	64,8	1,2	0,039
	DEC	45,6	31,9	1,4	0,032
	STAT3	3,5	0,5	6,8	0,042
	Freac-4	10,5	1,6	6,8	0,003
	HLF	50,0	28,2	1,8	0,006
	Evi-1	97,4	81,6	1,2	0,009
	VBP	23,7	10,4	2,3	0,015
	TCF-4	55,3	37,2	1,5	0,028
	AP-1	79,0	61,1	1,3	0,028
6 h (↑)	Gfi-1	10,5	3,1	3,4	0,031
	CRE-BP1	15,8	6,6	2,4	0,039
	HNF-4alpha	29,0	16,4	1,8	0,047

T98G					
Tempo de coleta	Fator de transcrição	% de genes (Lista 1)	% de genes (Lista 2)	IE	Valor-p
30 min. (↑)	EBF	29,6	10,5	2,8	0,005
	ATF4	22,2	8,4	2,6	0,023
	Pax	92,6	75,3	1,2	0,041
6 h (↑)	Pbx1b	14,3	1,8	8,2	0,026
	C/EBP	100,0	20,0	5,0	0,002
6 h (↓)	Poly A downstream	75,0	12,6	6,0	0,007
	Pax-9	75,0	23,8	3,2	0,045

U251MG					
Tempo de coleta	Fator de transcrição	% de genes (Lista 1)	% de genes (Lista 2)	IE	Valor-p
30 min. (↑)	SMAD-4	40,0	10,4	3,9	0,015
	PTF1-beta	20,0	2,7	7,4	0,030
	APOLYA	10,0	0,4	27,8	0,039
30 min. (↓)	VBP	21,7	10,4	2,1	0,025
	HNF-6	6,5	1,4	4,7	0,030
	E2F	52,2	36,0	1,4	0,030
	TEF	39,1	25,3	1,5	0,040
	TFI	23,9	13,3	1,8	0,047

	CDP CR1	54,4	39,7	1,4	0,049
	POU1F1	54,4	39,7	1,4	0,049
	MAF	15,4	1,5	10,2	0,017
6 h (↑)	CREB	46,2	17,8	2,6	0,018
	ATF4	30,8	8,4	3,7	0,020
	MEIS1B:HOXA9	15,4	1,9	8,2	0,025
	C/EBPgamma	92,3	64,4	1,4	0,041
6 h (↓)	HES1	45,5	15,6	2,9	0,019
	Lmo2 complex	27,3	6,0	4,5	0,026
	ATATA	18,2	2,9	6,2	0,041

Interessantemente, o FT STAT3 foi comum às linhagens proficientes para TP53; entretanto, esse TF mostrou-se associado a genes induzidos na U87 e reprimidos na U343. Apenas o FT VBP foi comum a três linhagens (U87, U343 e U251), sendo associado a genes induzidos (30 min. e 6 h). Entre as linhagens mutantes para TP53, ATF4 foi o FT comum, associado a genes induzidos (30 min. e 6 h). Dois FTs foram comuns para U343 e U251: TEF (associado aos genes reprimidos em 30 min.) e MAF, (associados aos induzidos em 6 h). Finalmente, C/EBPGamma foi predito para U87 (30 min.) e U251 (6 h) (**Figura 1**).

Nossos resultados mostraram que a maioria dos FTs preditos foi exclusiva para cada linhagem celular, indicando que a resposta transcrecional à radiação ionizante é particular a cada linhagem, muito provavelmente devido à heterogeneidade genética das células de GBM.

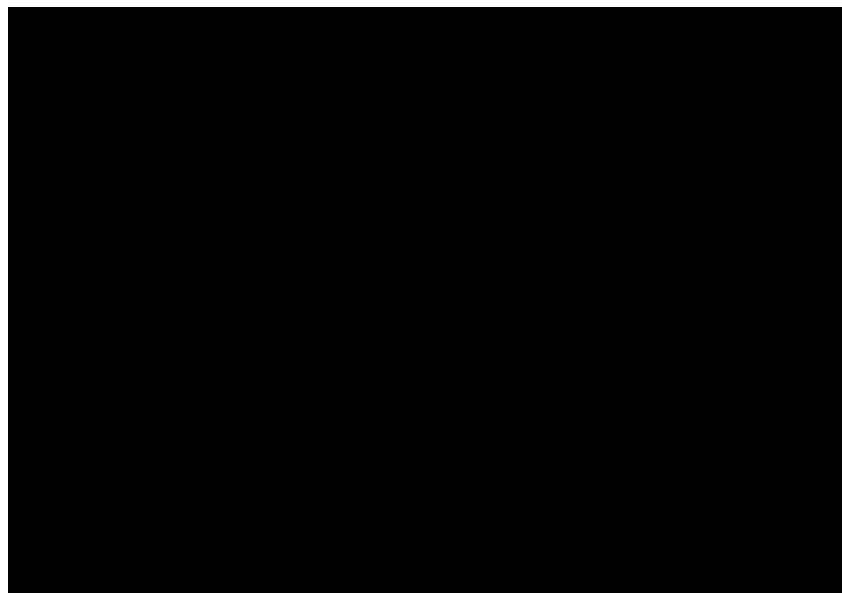


Figura 1: Diagrama de Venn ilustrando os FTs obtidos na análise de cada linhagem separadamente, ou em cada possível intersecção. Os FTs foram preditos a partir dos genes diferencialmente expressos (resultados da análise dos perfis de expressão gênica por microarranjo) selecionadas para quatro linhagens de GBM, comparando células irradiadas e não irradiadas, coletadas nos tempos de 30 min. e 6 h após a irradiação. Para a predição foi utilizada a ferramenta FatiGO+ v3.2.

#### **4.2 Expressão de HEB avaliada por qPCR em tempo real, Western blot e Imunocitoquímica**

O FT escolhido para testar a eficiência do método de predição foi o HEB, cujo papel ainda é pouco conhecido, principalmente relacionado com a manutenção do estado indiferenciado das células tronco (Uittenbogaard e Chiaramello, 2002). Foi testada a hipótese de que um possível silenciamento poderia contribuir para as células se diferenciarem, ou tornar o tumor mais suscetível à irradiação.

Antes da realização dos experimentos de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real foram testadas a eficiência de amplificação (*B2M* e *HEB*) e a concentração de iniciadores (HEB) necessários para aperfeiçoar os resultados.

Foi escolhida a concentração de iniciadores (*forward* e *reverse*) de 200/ 200 nM, sendo esta combinação eficiente na amplificação do fragmento, sem a formação de dímeros sob a mesma temperatura de *melting* ( $\approx 80^\circ \text{ C}$ ), o que pode ser observado pela presença de somente um pico de fluorescência. A eficiência de

amplificação dos iniciadores (HEB e B2M) também foram testadas, utilizando diluições seriadas de um *pool* de cDNA (1, 1/10, 1/100, 1/1000). O próprio programa REST forneceu a eficiência dos iniciadores de B2M (0,9615) e HEB (0,9652).

Após a padronização da reação foi possível validar o FT *HEB*. A análise pelo software REST 2009 mostrou que *HEB* sofreu uma indução transcrecional (Fold Change = +2,6) quando as células U87 irradiadas foram comparadas às não irradiadas (**Figura 2A**).

A expressão de HEB também foi demonstrada por Western blot. Foram utilizados anticorpos para ACTB e HEB para as células U87 irradiadas e não irradiadas, 30 minutos após a irradiação (**Fig.2B**). A expressão relativa foi calculada por análise densitométrica e constatou-se uma expressão 1,7 vezes maior nas células irradiadas (8 Gy), relativamente ao grupo controle (**Fig. 2C**).



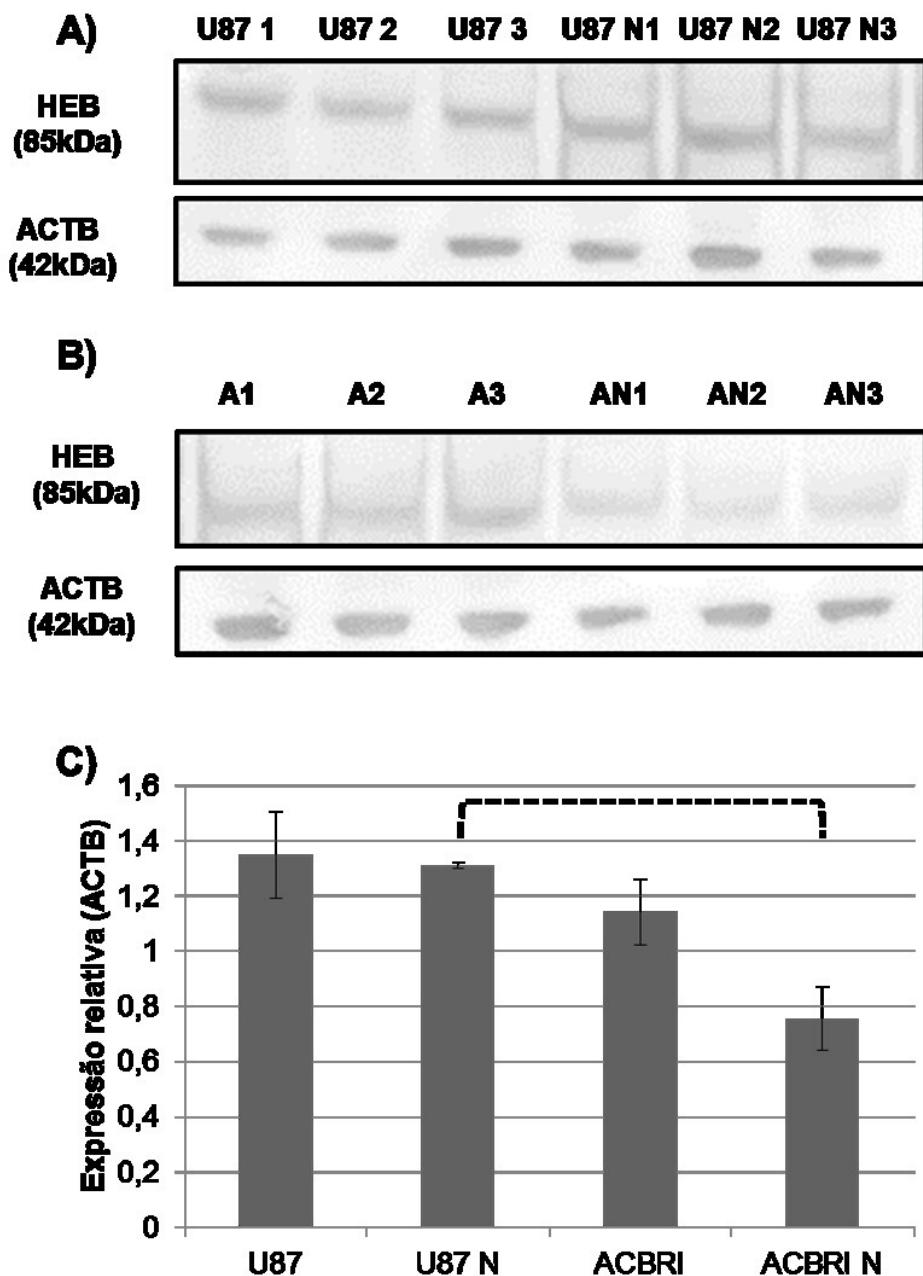
**Figura 2** Níveis de expressão de HEB obtido pelo método de qPCR (**A**). Este FT foi associado aos genes regulados em células U87, 30 min. após a irradiação. A caixa representa o intervalo interquartil e a linha tracejada na caixa representa o valor da mediana. **B)** Expressão proteica por Western blot utilizando anticorpos para HEB (Santa Cruz) e ACTB (Cell Signaling) como controle endógeno, obtidos para células não-irradiadas (Co) e irradiadas com 8 Gy. C) Análise densitométrica das bandas de Western Blot, utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0, os valores representam a expressão de HEB relativamente à ACTB.

Além disso, foi analisada a expressão da proteína HEB nas linhagens U87MG e ACBRI 371, bem como em suas respectivas neuroesferas, na ausência de tratamento (**Figura 3 A e B**).

Os dados da **Figura 3 A e B** foram quantificados por análise densitométrica das bandas utilizando software Gel Pro Analyzer softw1are 4.0, (**Figura 3 C**). A linhagem U87 apresentou uma expressão relativa de  $1,35 \pm 0,16$  e suas respectivas

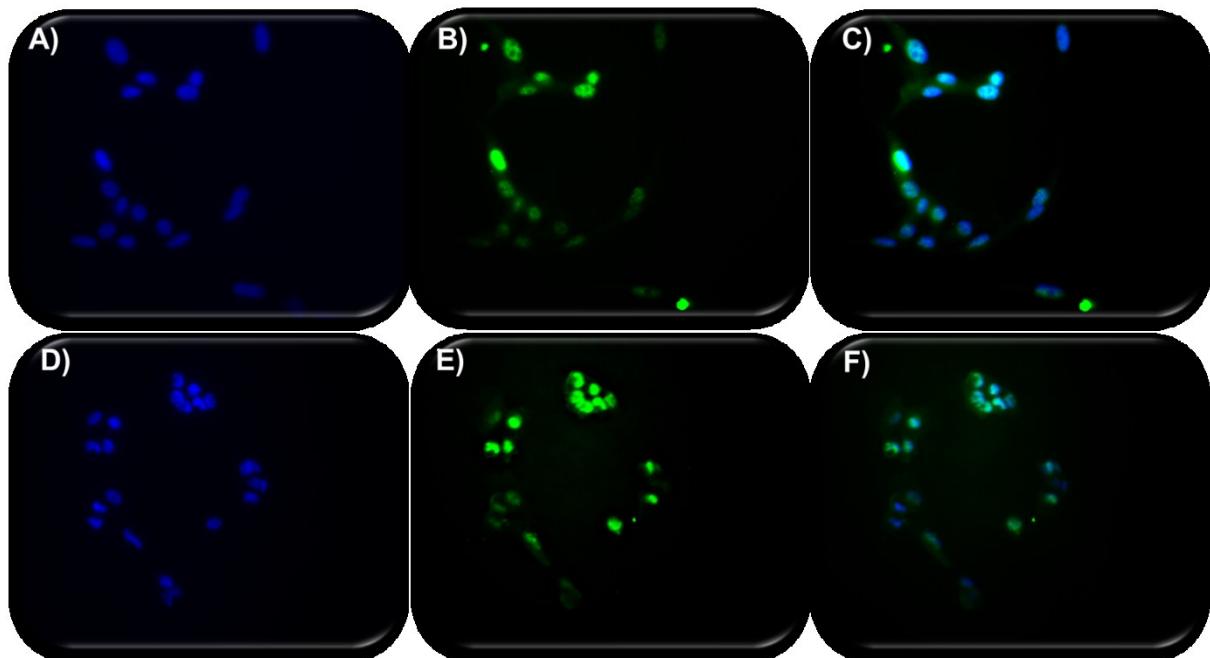
neuroesferas apresentaram o valor de  $1,31 \pm 0,01$ , enquanto que a linhagem de astrócitos (ACBRI 371) apresentou uma expressão relativa de  $1,14 \pm 0,24$  e suas neuroesferas de  $0,76 \pm 0,11$ . Não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparadas cada uma das linhagens com suas respectivas neuroesferas.

Embora a linhagem U87 tenha apresentado uma maior expressão de HEB em relação aos astrócitos, a diferença entre os resultados não foi significativa. Entretanto, diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,001$ ) foram observadas ao comparar os resultados obtidos entre as neuroesferas de U87 e ACBR. Estes resultados indicaram que a proteína HEB é um alvo interessante para ser utilizado quanto à aplicação da estratégia de inibição, principalmente nas neuroesferas, visto que a expressão de HEB nas neuroesferas oriundas da U87 foi maior do que aquelas provenientes da ACBR (**Figura 3**).



**Figura 3:** Expressão de HEB nas linhagens U87MG (U87) e suas respectivas neuroesferas (U87 N) (A) e na linhagem astrocítica ACBRI 371 e suas respectivas neuroesferas (AN) (B). Expressão relativa calculada para análise densitométrica das bandas de Western blot para HEB relativamente à ACTB (C). Foram utilizados os dados de 3 experimentos independentes. O colchete indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as amostras U87 N e ACBRI N. Foram utilizados anticorpos para HEB (Santa Cruz) e ACTB (Cell Signaling), como controle endógeno, na proporção de 1:1000.

A aplicação do método de imunocitoquímica possibilitou observar a localização da proteína HEB nas células U87 e ACBRI 371. Observou-se uma localização nuclear de HEB, indicando que esta proteína provavelmente atua como um fator de transcrição (**Figura 4**).



**Figura 4:** Expressão da proteína HEB visualizada por imunocitoquímica nas linhagens U87 (A-C) e ACBRI 371 (D-F). As imagens foram capturadas em filtro DAPI (A e D), que torna possível a observação dos núcleos e FITC (B e E), evidenciando a marcação da proteína HEB. As imagens capturadas nos dois filtros são visualizadas em C e F.

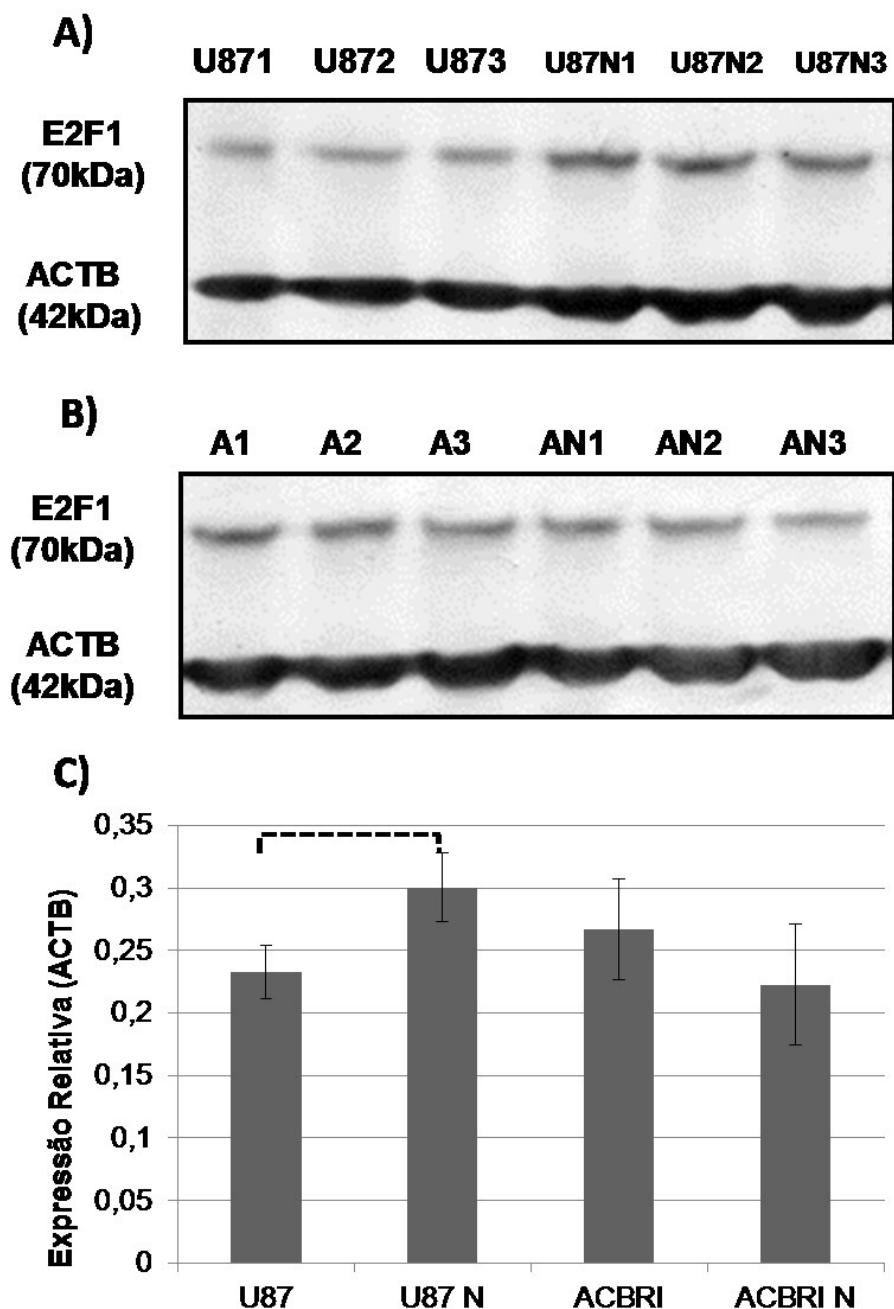
#### 4.3. Análise de Expressão de *E2F1* por Western blot

Em um estudo anterior realizado no presente laboratório, os dados dos microarranjos de 81 amostras de GBM e de 23 amostras de tecido cerebral de epiléticos foram transferidos a partir do banco de dados públicos *Gene Expression Omnibus* (GEO) do NCBI (Barrett *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2011), cujo número de acesso é GSE4290 (Donaires *et al.*, 2013); os genes superexpressos obtidos na análise estatística foram submetidos a duas análises de associação a FTs. A intersecção dos resultados obtidos nas duas análises de FTs interessantemente

apontou *E2F1* e *E2F4* como significativamente associados à lista inicial de genes. A predição dos FTs *E2F1* e *E2F4* foi confirmada por qPCR em tempo real em 7 linhagens de glioblastoma comparadas a um *pool* de RNA de tecido cerebral de vários doadores (Donaires *et al.*, 2013).

No presente trabalho, em continuidade ao estudo anterior, verificou-se a expressão proteica de *E2F1* nas linhagens U87 e ACBRI 371 (astrócitos) e suas respectivas neuroesferas (**Figura 5 A e B**). Para testar se houve diferença significativa na expressão de *E2F1* nessas linhagens, foi feita uma quantificação das bandas, por análise densitométrica descrita anteriormente (**Figura 5 C**). O valor de expressão relativa *E2F1/ACTB* variou de 0,22 a 0,30. A única diferença significativa ( $p=0,027$ ) foi observada na comparação entre a linhagem U87 ( $0,23 \pm 0,02$ ) e suas neuroesferas ( $0,30 \pm 0,03$ ). Além disso, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, o valor de expressão relativa das neuroesferas da linhagem U87 ( $0,30 \pm 0,03$ ) foi maior do que o observado para a linhagem astrocítica ( $0,22 \pm 0,05$ ).

Ainda que a expressão relativa de *E2F1* por *Western blot* não tenha correspondido ao resultado obtido por qPCR em tempo real, a diferença de expressão verificada entre as neuroesferas das células U87 e ACBRI 371 encorajou o presente estudo com relação ao silenciamento do gene *E2F1*.

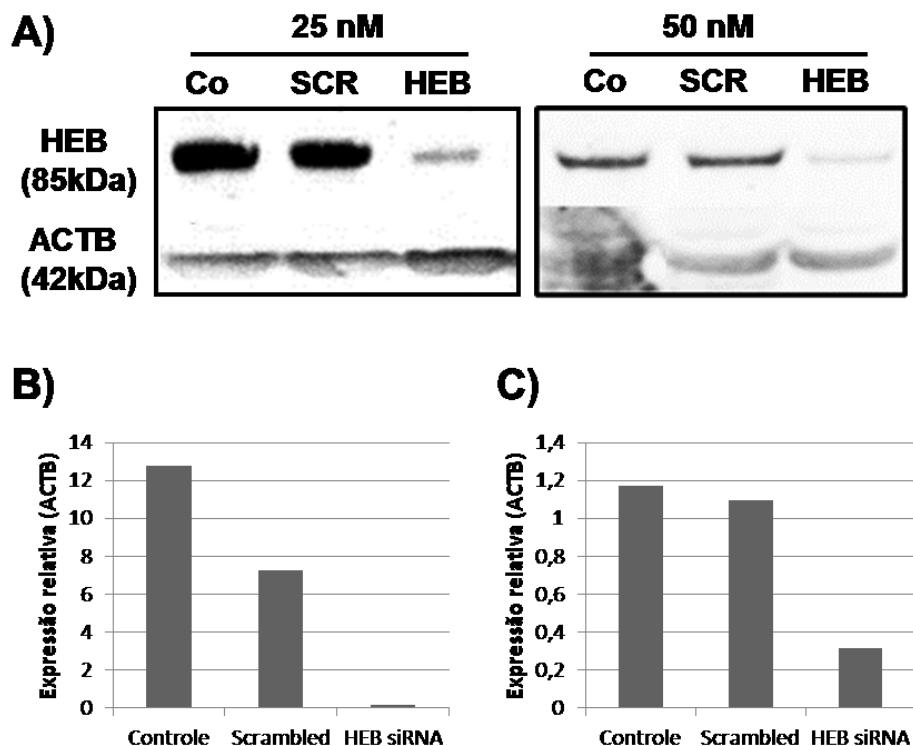


**Figura 5:** Expressão de E2F1 nas linhagens U87MG (U87) e suas respectivas neuroesferas (U87 N) (A) e na linhagem astrocítica ACBRI 371 e suas respectivas neuroesferas (AN) (B). Expressão relativa calculada para análise densitométrica das bandas de Western blot para E2F1 relativamente à ACTB (C). Foram utilizados os dados de 3 experimentos independentes. O colchete indica diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre as amostras U87 N e U87 N. Foram utilizados anticorpos para E2F1 (Cell Signaling) e ACTB (Cell Signaling), como controle endógeno, na proporção de 1:1000.

#### 4.4. Expressão da proteína HEB após o silenciamento por siRNA

A eficácia do silenciamento de HEB por siRNA foi verificada por *Western blot* para as amostras coletadas no tempo de 72 h após a transfecção com o HEB siRNA.

A inibição da expressão de HEB foi evidente, conforme visualizada no tempo de 72h para ambas as concentrações (25 e 50 nM) de HEB siRNA (**Figura 7A**).



**Figura 6:** A) Expressão de HEB em células da linhagem U87MG transfectada com a sequência de RNA Scrambled (SCR), HEB siRNA (HEB), comparados ao controle (Co) nas concentrações de 25 e 50 nM, 72 h após a inibição. Expressão relativa obtida por densitometria das bandas de Western blot nas concentrações de siRNA de 25 (B) e 50 nM (C), 72 h após a inibição. Foi utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0.

O cálculo do valor quantitativo correspondente ao silenciamento parcial de HEB foi realizado por densitometria; o valor relativo foi calculado pela divisão entre o valor obtido para a proteína HEB e o observado para ACTB, sendo que os valores

quantitativos foram utilizados para a comparação entre os tratamentos (**Figura 6 B e C**).

A inibição da expressão relativa de HEB em relação às células transfectadas com a sequência *scrambled* foi 97,8 e 70% para as concentração de 25 nM e 50nM, respectivamente. Assim, a concentração de 25 nM foi escolhida para os experimentos subsequentes.

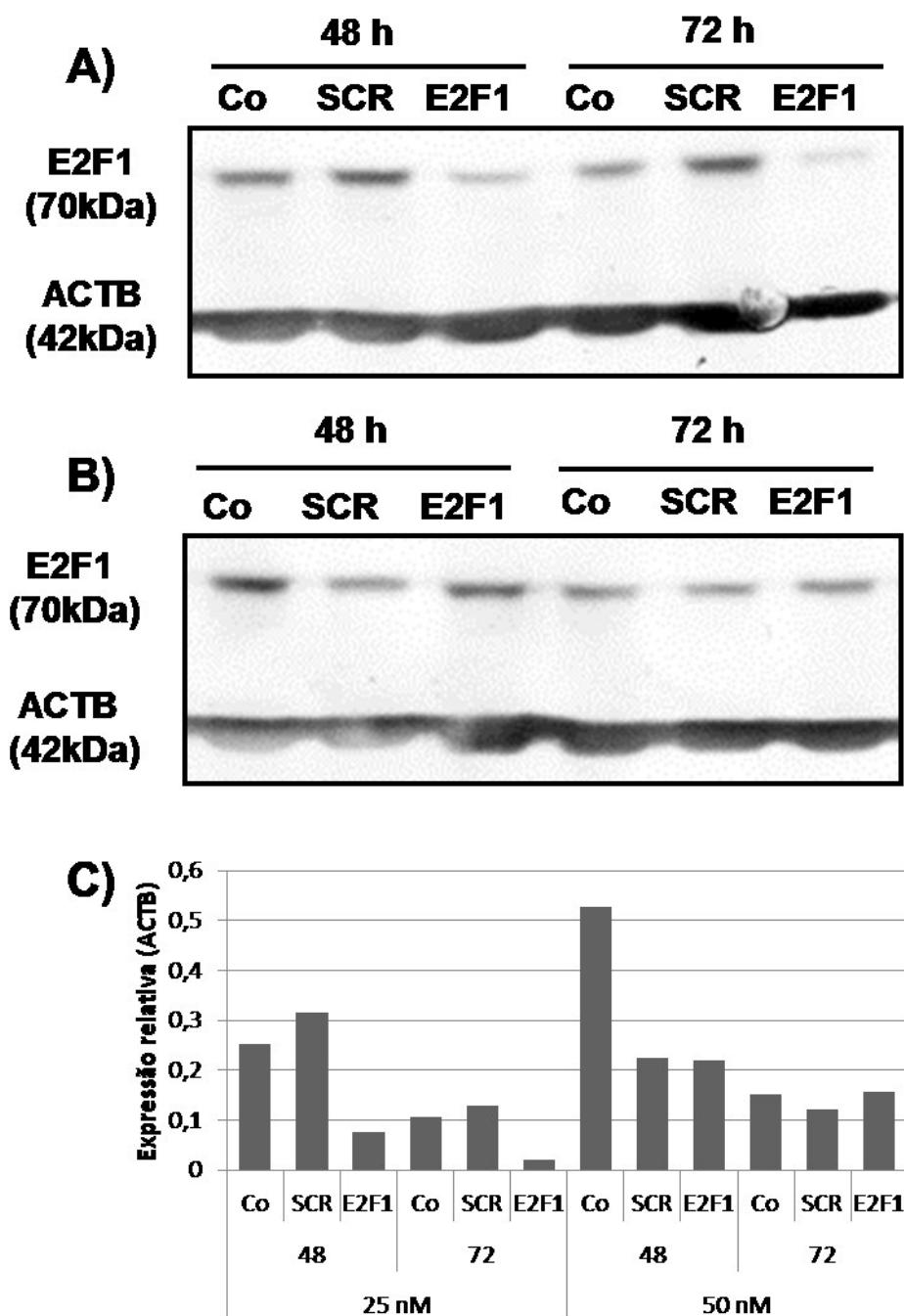
#### **4.5. Expressão da proteína E2F1 após o silenciamento por siRNA**

A diminuição na expressão de E2F1 após o silenciamento do gene foi comprovada por Western blot. Foram analisadas duas concentrações de siRNA (25 nM e 50 nM), 48 e 72 h após o silenciamento (**Figura 7 A e B**).

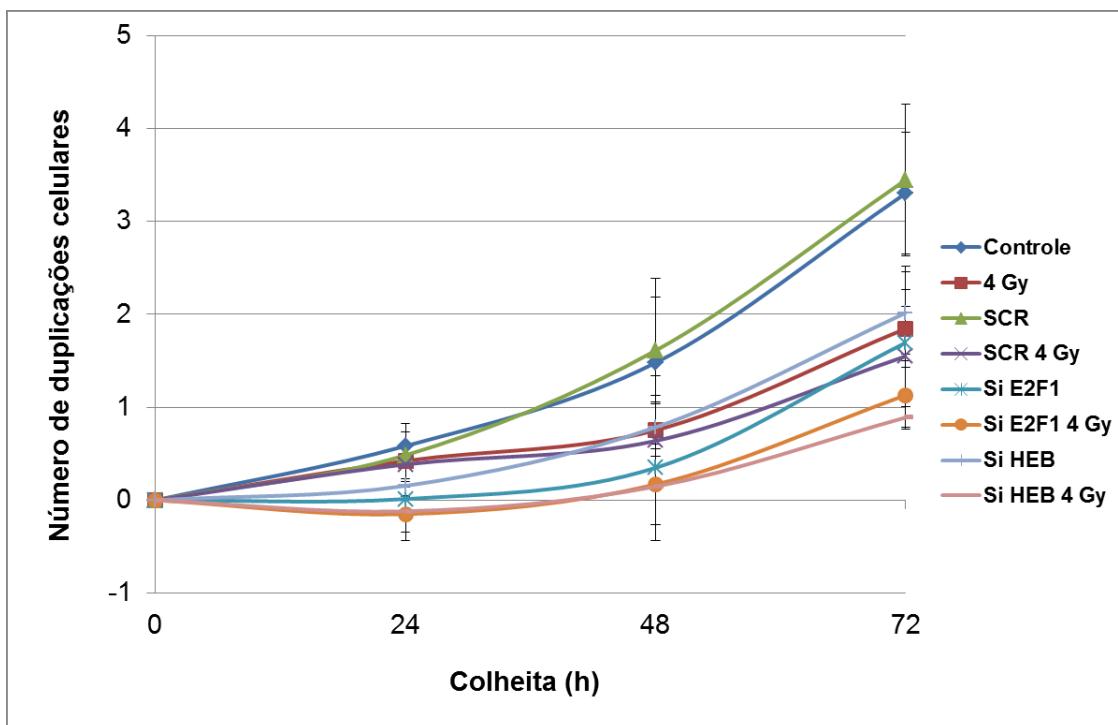
Relativamente às células transfectadas com a sequência *scrambled*, o silenciamento foi de 76 e 84,8% para os tempos de 48 e 72 h, respectivamente, usando-se siRNA na concentração de 25 nM. Para 50 nM, a inibição foi mínima em 48h (3%).

#### **4.6. Proliferação celular**

O teste de proliferação em células irradiadas e silenciadas por siRNA foi realizado com o emprego do *kit Guava Via Count*. A partir de um número conhecido de células viáveis foi possível estimar o quanto as células duplicaram dias após a semeadura. Foi contabilizado o número de células nos tempos de 24, 48 e 72 h após a irradiação. As células foram irradiadas 48 h após a transfecção por HEB siRNA, ou E2F1 siRNA ou SCR (**Figura 8**).



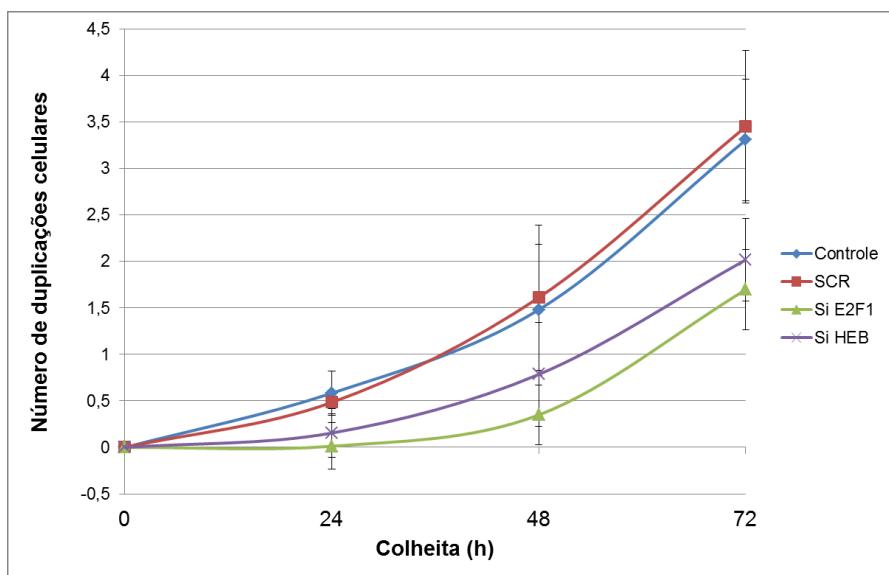
**Figura 7:** Análise da expressão de E2F1 em células da linhagem U87MG transfectada com a sequência de RNA Scrambled RNA (SCR), E2F1 siRNA (E2F1), comparadas ao controle (Co) nas concentrações de 25 (A) e 50 nM (B), 48 e 72 h após a inibição. Expressão relativa obtida por densitometria das bandas de Western blot nas concentrações de siRNA de 25 e 50 nM, 72 h após a inibição (C). Foi utilizando o software Gel Pro Analyzer 4.0.



**Figura 8:** Curvas de proliferação celular baseadas no número de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB siRNA ou E2F1 siRNA e grupo controle, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy e colhidas 24, 48 e 72 h após a irradiação. Foi utilizado o kit Guava Via Count para determinação da concentração/ viabilidade celular e a leitura feita no citômetro Easycyte Mini System (Merck Millipore). O tempo zero é considerado o momento da irradiação, portanto o valor da duplicação também é zero.

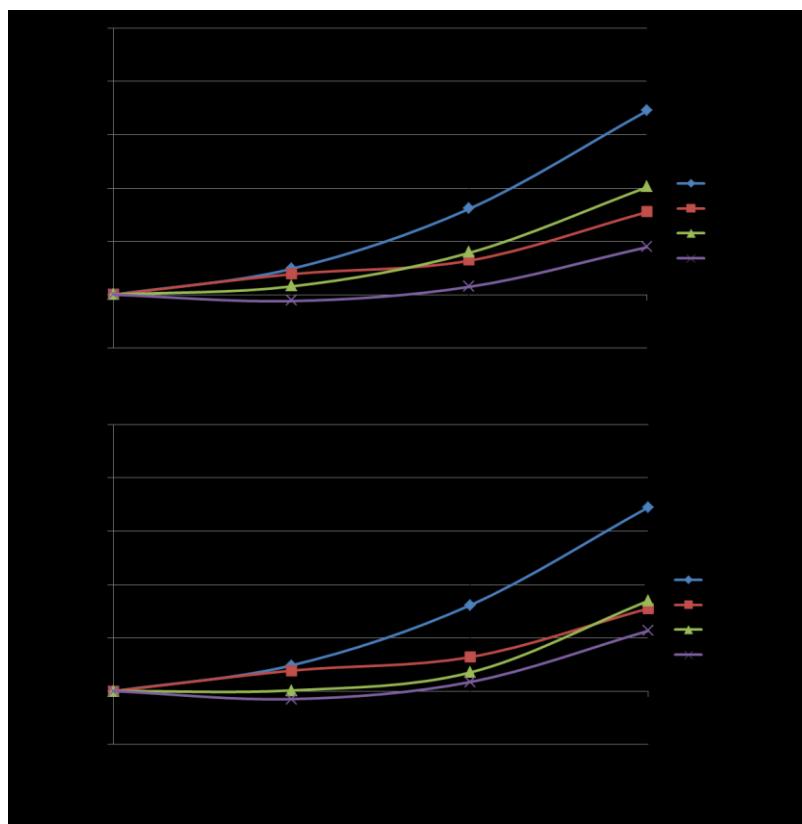
Para facilitar a descrição, separamos os resultados em grupos: células não irradiadas (**Figura 9**), silenciadas por HEB siRNA (**Figura 10**) ou E2F1 siRNA (**Figura 11**). O grupo controle sem qualquer tratamento foi utilizado para verificar se a introdução de um oligômero aleatório (sequência *scrambled*) interfere na viabilidade celular, assim como em sua proliferação e ciclo. Neste experimento foi possível observar que, na concentração de siRNA utilizada (25 nM) não houve interferência na proliferação celular, visto que as curvas de sobrevivência foram muito semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o grupo transfectado com a sequência SCR e o grupo controle em todos os pontos testados. Para verificar se a inibição dos genes *E2F1* e *HEB* por si só altera a proliferação, comparamos os resultados das células transfectadas com a sequência *scrambled* (**Figura 10**). As curvas de proliferação mostram claramente que a inibição de *E2F1* e *HEB* diminui a proliferação em todos os tempos, comparados ao grupo

SCR. Entretanto, só foram observadas diferenças significativas quando comparados o grupo silenciado por E2F1 e SCR em 24 h ( $p=0,032$ ), 48 h ( $p = 0,049$ ) e 72 h ( $p = 0,021$ ), assim como na comparação entre HEB siRNA e SCR no tempo de 72 h ( $p = 0,043$ ).

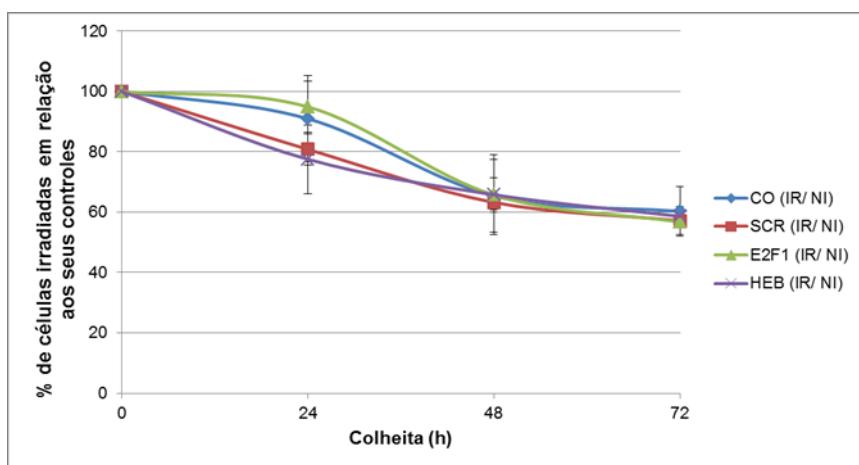


**Figura 9:** Curvas de proliferação celular baseadas na taxa de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA e grupo controle. Foi utilizado o kit Guava Via Count para determinação do número de células viáveis por meio da análise por citometria (citômetro Easycyte Mini System - Merck Millipore).

As curvas de proliferação para as células silenciadas por siRNA para HEB (**Figura 11 A**) e E2F1 (**Figura 11 B**) mostram pequenas diferenças entre os grupos irradiados e seus respectivos controles em 24 e 48 h. Contudo, em 72h foram detectadas diferenças significativas em todas as comparações ( $p<0,05$ ) entre os irradiados e seus controles. Para comparar os grupos irradiados, foi calculada a porcentagem de células viáveis irradiadas em relação ao grupo não irradiado, os quais foram usados para a construção de curvas de sobrevivência (Figura 12). Desta maneira, observa-se que em 24 h, o silenciamento de E2F1 reduziu a porcentagem relativa de células viáveis irradiadas em menor escala quando comparado ao grupo SCR irradiado ( $p= 0,029$ ). Nos tempos de 48 e 72h, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Os resultados demonstram que o silenciamento de HEB ou E2F1 não promoveu a radiosensibilização das células, conforme esperado, mas apenas uma radiorresistência temporária em 24 h, pelo menos para E2F1 (**Figura 12**).



**Figura 10:** Curvas de proliferação celular baseadas na taxa de duplicação de células U87 transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB (A) ou E2F1 siRNA (B) colhidas no tempos de 24, 48 e 72 h após a irradiação com 4 Gy. Foi utilizado o *kit Guava Via Count* para determinação do número de células viáveis e leitura no citômetro *Easycyte Mini System* (*Merck Millipore*).



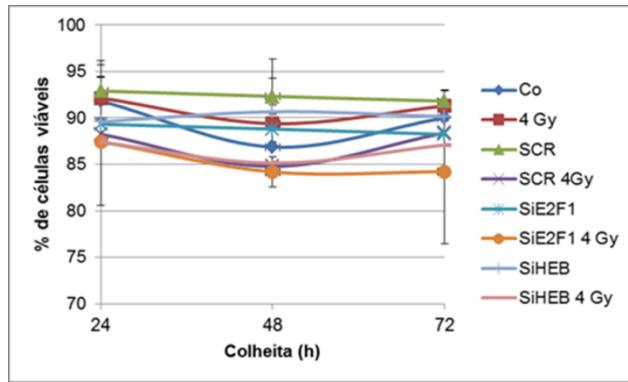
**Figura 11:** Curvas de sobrevivência baseadas na porcentagem de células viáveis irradiadas em relação às não irradiadas. Foram utilizados os grupos não transfectados (controle) e transfectados com E2F1, HEB e SCR; irradiados (IR) ou não (NI), analisados nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento.

#### **4.7. Análise de viabilidade e morte celular**

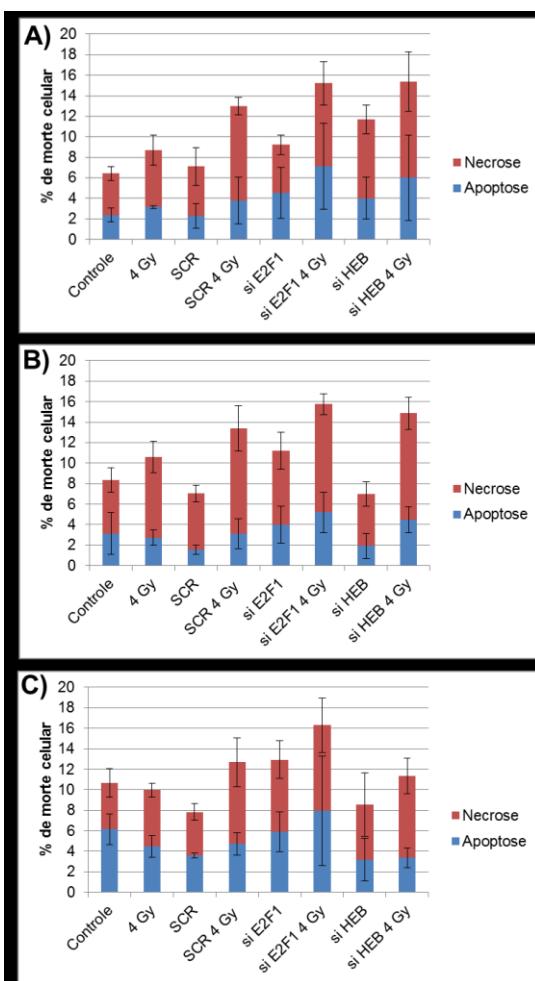
A viabilidade celular avaliada para a linhagem U87 não transfectada ou transfectada com SCR, E2F1 ou HEB siRNA, irradiadas ou não sofreu pequenas variações não significativas, de 87,4 a 92,3% (**Figura 12**). A única diferença estatisticamente significativa foi detectada entre o grupo SCR e SCR 4 Gy, 48 h após a irradiação ( $p= 0,024$ ).

Foram também calculadas as porcentagens de células apoptóticas e necróticas, 24, 48 e 72 h após a irradiação (**Figura 13**). Observou-se que a transfecção com a sequência SCR não alterou significativamente a indução de morte celular (apoptose e necrose) e consequentemente a viabilidade, em comparação ao grupo controle, indicando que a metodologia do silenciamento foi bem sucedida; assim os efeitos biológicos observados foram decorrentes da inibição do gene em questão e não do processo de transfecção. Os índices de células apoptóticas foram baixos, com pico de indução de 7,9% no grupo de células transfectadas com E2F1 siRNA e irradiadas (analisadas após 72 h), não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas para outras comparações.

Os índices de indução de morte celular por necrose foram pouco maiores do que os de apoptose, com um pico de indução de 10,3% (SCR 4 Gy, 48 h). É notável um aumento da indução de necrose nos grupos irradiados em relação aos não irradiados. Foram observadas diferenças significativas entre o grupo de células transfectadas com a sequência SCR e analisadas nos tempos de 24 h ( $p=0,013$ ), 48 h ( $p = 0,007$ ) e 72 h ( $p = 0,026$ ), bem como para as células silenciadas para E2F1 ( $p = 0,019$ ) e para HEB siRNA ( $p = 0,005$ ), ambas em 48 h e, em todos os casos, na comparação do grupo irradiado versus não-irradiado. Foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre o grupo de células transfectadas com SCR e transfectadas com E2F1 siRNA no tempo de 72 h ( $p = 0,041$ ).



**Figura 12:** Viabilidade de células U87 não transfectadas (Co) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas 24, 48 e 72 h após a irradiação. Foi utilizado o *kit Guava Via Count* para determinação da viabilidade celular e leitura no citômetro *Easycyte Mini System* (Merck Millipore).



**Figura 13:** Frequências de apoptose e necrose em células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) após a irradiação.

#### 4.8. Análise da cinética do ciclo celular

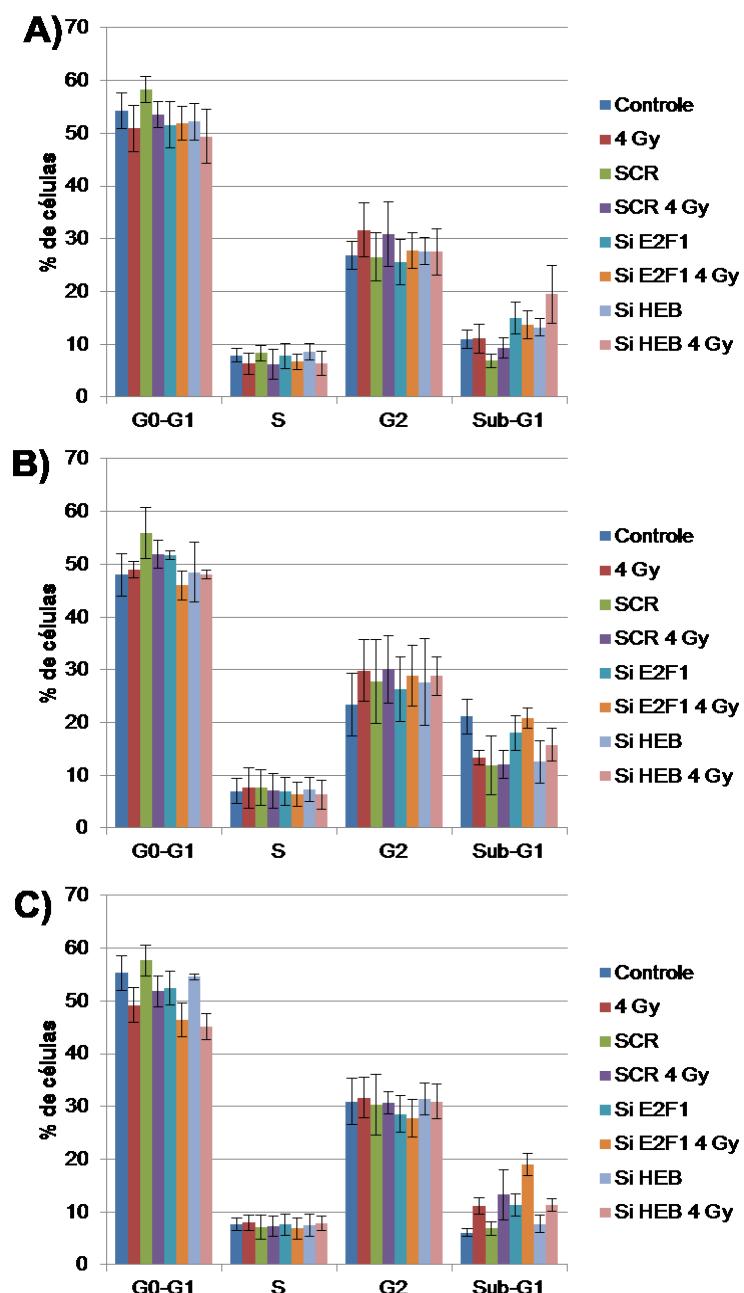
Para a detecção de células em diferentes estágios do ciclo celular, utilizou-se o *kit Guava cell cycle*, sendo possível distinguir células em G0/G1, S, e G2, além da detecção de morte celular pela quantificação de células em sub-G1. As culturas de células U87MG foram irradiadas 48 h após a transfecção com SCR, E2F1 ou HEB siRNA, sendo analisadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após a irradiação (**Figura 14**). O grupo controle, sem silenciamento, foi utilizado com o intuito de avaliar se a transfecção em si gera alterações na cinética do ciclo. A única diferença estatisticamente detectável entre os grupos foi na comparação entre o grupo controle e o SCR no tempo de 24 h, na fase sub-G1 ( $p = 0,010$ ).

De maneira geral, o grupo transfectado com E2F1 siRNA apresentou uma diminuição significativa na proporção de células em G0/G1 em relação ao grupo SCR em 24 h ( $p = 0,037$ ), além de um aumento significativo de sub-G1 ( $p = 0,002$ ) em 24 h, e em 72 h ( $p = 0,011$ ). Para a comparação HEB siRNA versus SCR, observou-se uma diminuição na proporção G0/G1 ( $p=0,029$ ) e um aumento significativo de sub-G1 ( $p=0,040$ ) em 24 h.

O grupo transfectado com E2F1 siRNA e irradiado apresentou uma diminuição significativa de G0/G1 em 48 h em relação ao E2F1 não irradiado ( $p = 0,020$ ), enquanto que o grupo transfectado com HEB siRNA e irradiado apresentou diminuição de G1 comparado ao HEB não irradiado ( $p=0,003$ ), além de aumento significativo de sub-G1 ( $p= 0,023$ ) em 72 h. Finalmente, o grupo SCR irradiado apresentou, em relação ao SCR não irradiado, diminuição estatisticamente significativa de células em G0/G1 em 24 h ( $p=0,036$ ) e 72 h ( $p=0,042$ ).

Assim, observou-se que nas células silenciadas com E2F1 e HEB siRNA e irradiadas, houve uma certa radioproteção no tempo de 24 h após o tratamento, não sendo observada qualquer diferença significativa nas proporções de células nas diferentes fases do ciclo celular. Por outro lado, foi observada uma diminuição significativa de G0/G1 para o grupo transfectado com a sequência SCR (células irradiadas), o que pode se correlacionar com os resultados de proliferação, visto que em 24 h as células silenciadas para E2F1 sofreram uma queda menos acentuada no índice de duplicação celular. Com relação às diferenças relativas aos efeitos da

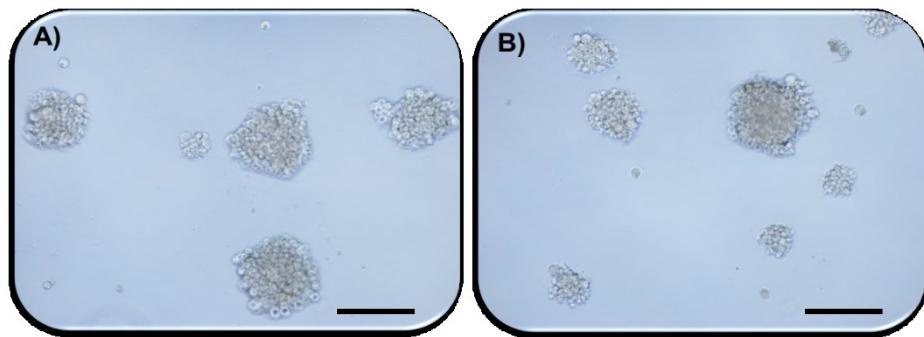
radiação, estas ocorreram principalmente após 24 h, isto é, 48 h para E2F1 siRNA e 72 h para HEB siRNA; enquanto que, os efeitos somente do silenciamento foram observados significativamente em 24 h, havendo diminuição de G0/ G1 e aumento de sub-G1 em ambos os casos.



**Figura 14:** Distribuição das células em diferentes fases do ciclo celular: U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas ou não com a dose de 4 Gy, colhidas 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) após a irradiação. Foi utilizado o kit *Guava Cell Cycle reagent* e a leitura foi feita no citômetro *Easycyte Mini System*.

#### 4.9. Ensaio de limite de diluição na formação de neuroesferas

A partir de células U87 não transfectadas (Co) ou transfectadas com a sequência scrambled (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, foram semeadas 10 a 500 células/poço, 24h após a transfecção. 24 horas após a semeadura, as células foram irradiadas e, 6 dias após a irradiação, foi realizada a contagem das neuroesferas com mais de 60 µm (**Figura 15**).



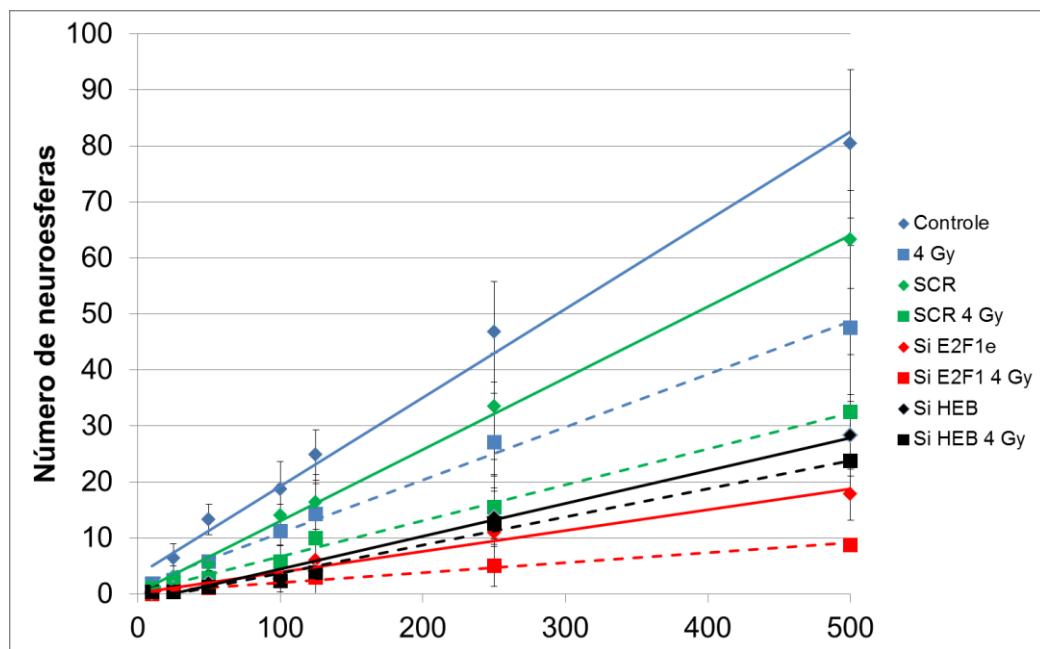
**Figura 15:** Neuroesferas formadas 6 dias após semeadura de células em meio específico para o seu crescimento em placas de 96 poços. Fotografias obtidas pelo sistema de captura acoplado ao microscópio invertido Nikon TS100 em aumento de 100x. Foram consideradas as neuroesferas com mais de 60 µm de diâmetro. A barra de escala corresponde a 200 µm.

Foi possível estabelecer uma relação linear entre o número de células semeadas e o número de neuroesferas formadas para cada tratamento (**Figura 16** e **Tabela 3**).

A eficiência de clonagem dessas neuroesferas foi calculada a partir da fórmula: Eficiência de Clonagem = número de neuroesferas formadas/ número de células semeadas (**Tabela 3**).

Nos experimentos em que foram semeadas 500 células por poço/ tratamento foi observada uma maximização do número de neuroesferas formadas (**Figura 16**). Esses dados são apresentados com detalhe para os diferentes tratamentos na **Figura 17 A**. Além disso, para comparar os efeitos da irradiação entre os diferentes silenciamento, foi calculada a porcentagem do número de neuroesferas irradiadas

em relação ao grupo não irradiado para cada grupo, controle, SCR, E2F1 e HEB (**Figura 17 B**).



**Figura 16:** Correlação linear entre o número de células semeadas/ número de neuroesferas. As esferas foram contabilizadas 6 dias após a radiação. As neuroesferas foram formadas a partir de células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, e irradiadas 48 h após o processo de transfecção. As células foram semeadas em triplicatas e em quantidades gradativas de 10-500 por poço em placas de 96 poços.

**Tabela 3:** Dados da análise de regressão linear (equação da reta e coeficientes de regressão  $R^2$ ) a partir do número inicial de células semeadas (x) em relação ao número observado de neuroesferas (y) nos diferentes tratamentos, bem como os resultados de eficiência de clonagem para cada tratamento.

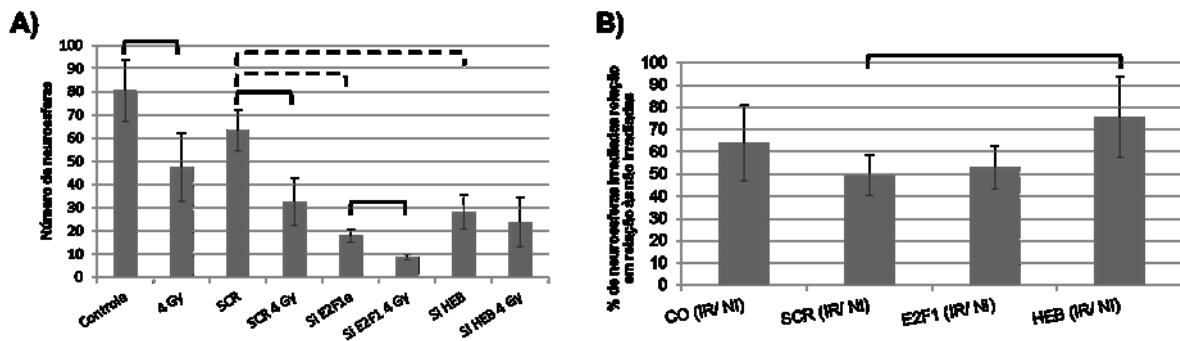
Tratamento	Equação da reta	$R^2$	Eficiência de clonagem
Controle	$y = 0,1583x + 3,4354$	0,9915	16,08
4 Gy	$y = 0,0947x + 1,4332$	0,9946	9,51
SCR	$y = 0,1275x + 0,3082$	0,9982	12,66
SCR 4 Gy	$y = 0,0643x + 0,208$	0,9937	6,50

Si E2F1e	$y = 0,0587x - 1,4534$	0,9857	3,58
Si E2F1 4 Gy	$y = 0,0371x + 0,1683$	0,9753	1,76
Si HEB	$y = 0,0587x - 1,4534$	0,9857	5,66
Si HEB 4 Gy	$y = 0,0503x - 1,2808$	0,986	4,76

Foram também calculadas as porcentagens relativas de neuroesferas formadas nos grupos de células irradiadas *versus* não-irradiadas; os dados mostram os efeitos da irradiação no sentido de reduzir na formação de neuroesferas (**Figura 17 B**).

Não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo Co e transfetado com a sequência SCR. Ainda considerando os grupos não irradiados, foram observadas diminuições significativas na formação de neuroesferas entre o grupo SCR e E2F1 ( $p \leq 0,001$ ) e SCR e HEB ( $p = 0,005$ ). A radiação ionizante também reduziu o número de neuroesferas entre no grupo SCR irradiados em relação ao SCR não irradiado ( $p = 0,007$ ) e e E2F1 siRNA irradiados versus E2F1 não irradiado ( $p= 0,013$ ). Entretanto, os grupos HEB si RNA e HEB irradiados apresentaram valores semelhantes.

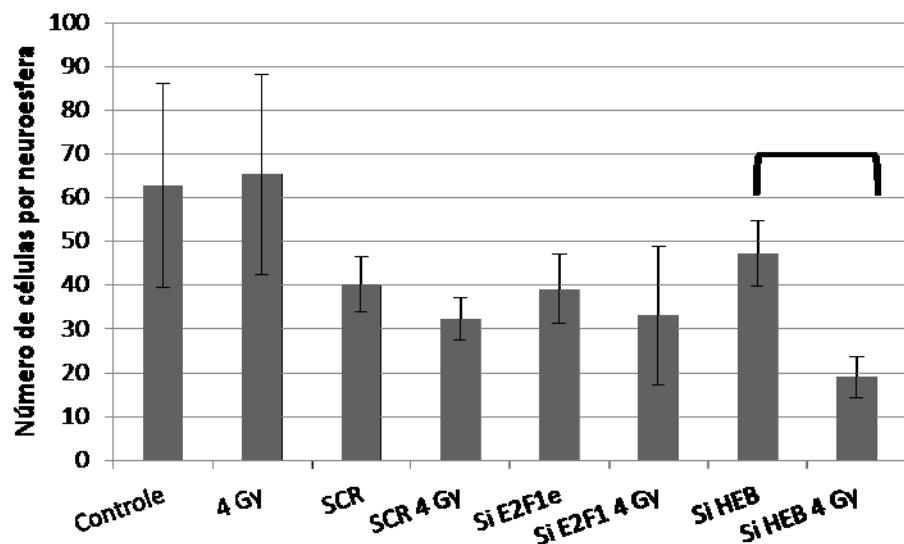
Ao analisar os efeitos da irradiação entre os diferentes grupos transfetados (E2F1, HEB e SCR), foi detectada uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,024$ ) quando comparados os valores relativos entre os grupos irradiados SCR e HEB, demonstrando que a inibição deste gene confere uma radiorresistência aumentada em relação ao grupo SCR.



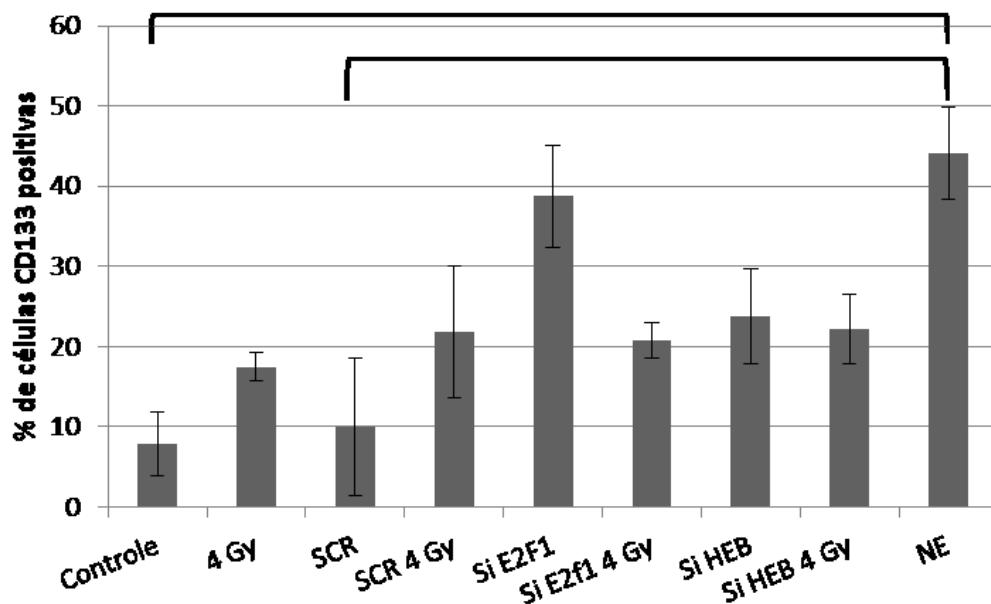
**Figura 17:** (A) Número de neuroesferas formadas a partir de 500 células de U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas 48 h após a transfecção, e colhidas 6 dias após a irradiação. As linhas contínuas representam diferenças significativas entre grupos irradiados (IR) e não irradiados (NI), enquanto que a linha tracejada indica a diferença entre os grupos silenciados com o controle *Scrambled* (B) Porcentagem do número de neuroesferas formadas nos grupos celulares irradiados (IR) em relação às neuroesferas formadas nos grupos celulares não irradiados (NI). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre as amostras são indicadas pelos colchetes.

#### 4.10. Avaliação do número de células presentes nas neuroesferas

Após 24 h da contagem das neuroesferas, as mesmas foram dissociadas para avaliação da concentração celular em cada uma. Assim, foi possível calcular a quantidade de células viáveis em cada neuroesfera, dividindo-se a quantidade de células pelo número de neuroesferas contabilizadas (Figura 18). De maneira geral, não houve diferenças significativas entre o grupo SCR e Controle e entre os silenciados por E2F1 ou HEB siRNA em relação ao grupo SCR. Apesar de não haver diferença significativa, observou-se que o processo de transfecção reduziu o número de células ao comparar o grupo controle e SCR. Por outro lado, ao comparar o grupo HEB irradiado com o não irradiado verificou-se um efeito da irradiação, visto que a diferença foi significativa ( $p = 0,005$ ), indicada pelo colchete.



**Figura 18:** Número de células presentes em cada neuroesfera, que foram contabilizadas após semeadura de 500 células de U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas 48 h após a transfeção, e colhidas 7 dias após a irradiação. Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas por um colchete, analisadas pelo teste-t.



**Figura 19:** Porcentagem de células marcadas positivamente para CD133 8 dias após a dissociação das neuroesferas formadas a partir das células U87MG não transfectadas (Controle) ou transfectadas com a sequência *scrambled* (SCR), HEB ou E2F1 siRNA, irradiadas 48 h após a transfeção e analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados dois experimentos independentes. O grupo NE, considerado como controle positivo, consistiu em neuroesferas cultivadas em meio específico para as mesmas. Todas as outras células foram semeadas em meio de diferenciação. Os colchetes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) obtidas pelo teste-t.

#### **4.11. Avaliação das células marcadas com o anticorpo CD133 por imunofluorescência**

A partir das neuroesferas dissociadas 7 dias após o tratamento, as células foram reincubadas em meio de diferenciação celular, sendo colhidas após 8 dias e submetidas à marcação de CD133 por imunofluorescência (**Figura 19**). Com exceção do grupo de neuroesferas, todos os outros tratamentos apresentaram células aderidas às placas de cultivo. A presença da proteína CD133 é característica de alguns tipos de células-tronco tumorais, sendo relacionada com a capacidade de diferenciação destas. Assim, nosso controle positivo consistiu em neuroesferas cultivadas por 8 dias em meio de cultivo apropriado, diferentemente do meio de diferenciação no qual as células provenientes de outros tratamentos foram semeadas. Estas apresentaram os maiores índices de células marcadas para CD133 ( $44,07 \pm 5,75$ ).

Após um período de 8 dias a contar da dissociação das neuroesferas formadas pela linhagem U87MG foram detectadas diferenças significativas quanto à diminuição do número de células positivas para CD133, comparando-se os grupos NE versus controle ( $p=0,018$ ) e NE versus SCR ( $p=0,043$ ). Esses resultados indicam que o meio de diferenciação reduziu a quantidade de células positivas para CD133, o que pode estar diretamente correlacionado com o aumento na diferenciação dessas células-tronco.

Tanto o grupo SCR e o controle apresentaram quantidades semelhantes de células marcadas e também um acréscimo na marcação quando as mesmas foram irradiadas, apesar deste não ter sido estatisticamente significativo. Também foi notória a acentuada marcação de CD133 nas células silenciadas para E2F1 e a redução na marcação das mesmas quando irradiadas, embora as diferenças entre esses dois grupos não tenham sido significativas. Em contraste, o grupo silenciado para HEB apresentou uma quantidade de marcação considerável nas células não irradiadas ( $22,24 \pm 4,34$ ), mas manteve uma porcentagem semelhante de células CD133 positivas nas células silenciadas e irradiadas.

# **DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

### **5.1. Predição de FTs a partir de dados de expressão gênica por microarranjos obtidos em linhagens de GBM irradiadas**

Recentemente, tecnologias genômicas, como os microarranjos de DNA, fornecem uma quantidade enorme de informações sobre a expressão gênica, mas exigem análises adicionais de bioinformática para interpretação dos dados.

A fim de reduzir as assinaturas complexas para um pequeno número de elementos de transcrição ativados, novas ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidas. As regiões de ligação de FTs em todo genoma foram identificadas utilizando uma variedade de métodos indiretos e conjuntos de dados, revelando abundantes sítios de ligação para FTs diferentes em células de mamíferos (Cawley *et al.*, 2004; Bieda *et al.*, 2006; Birney *et al.*, 2007; Ferretti *et al.*, 2007).

A utilização de listas de genes diferencialmente expressos geradas por experimentos de microarranjos possibilita a previsão de FTs que potencialmente possam se ligar a sítios de ligação comuns a um conjunto de genes. No atual estudo, foi realizada uma análise *in silico* (Fatigo + v3.2.) para identificar FTs a partir de listas de genes diferencialmente expressos selecionados para linhagens de GBM irradiadas em experimentos de microarranjos (dados obtidos anteriormente).

Apenas poucos FTs preditos foram comuns às linhagens de GBM, enquanto vários FTs foram exclusivos de cada linhagem, indicando que a resposta transcripcional em resposta à radiação ionizante foi peculiar a cada linhagem examinada neste estudo de microarranjos. Além disso, esses dados mostram também o alto grau de heterogeneidade entre as linhagens estudadas (Godoy *et al.*, 2011, Anexo2).

Os FTs mais relevantes, baseados em valores p menores que 0,01 e IE maiores do que 20 são discutidos a seguir. Foram encontrados poucos FTs preditos para mais de uma linhagem celular: MAF (U343 e U251), TEF (U343 e U251), ATF4

(U251 e T98G), STAT3 (U87 e U343), VBP (U87, U343 e U251) e C/EBPGamma (U87 e U251). O STAT3 atua na transcrição de genes envolvidos nos processos de proliferação celular, supressão de apoptose e angiogênese (Bowman *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2009). Os TFs MAF e TEF também estão relacionados com a apoptose (Benito *et al.*, 2006), enquanto que ATF4 atua nas respostas ao estresse de retículo endoplasmático (RE) (Tian *et al.*, 2011) (Blais *et al.*, 2004) e CEBPGamma participa do reparo por excisão de nucleotídeos (Crawford *et al.*, 2007) (O'Donovan *et al.*, 1994). Alguns desses FTs já foram associados ao câncer, como o STAT3, o qual se mostrou superexpresso em GBM (Lo *et al.*, 2008), e MAF, o qual foi associado a vários tipos de câncer (Natkunam *et al.*, 2009; Asting *et al.*, 2011).

Tais FTs preditos por análise *in silico* representam uma resposta global das células de GBM à irradiação, uma vez que eles foram preditos para mais de uma linhagem e, como mencionado acima, as suas funções são diretamente associadas a respostas ao estresse, envolvendo a apoptose, reparo no DNA e estresse de RE. Assim, alguns FTs preditos são alvos potenciais a serem investigados e validados no tratamento do câncer, como por exemplo, a inibição de STAT3, que já está em processo de triagem clínica (Sen *et al.*, 2012).

Os FTs exclusivamente previstos para as linhagens analisadas também foram analisados. Apenas dois FTs foram preditos para T98G: EBF e C/EBP. Ambos atuam na expressão de genes envolvidos no bloqueio da proliferação celular (Zhao *et al.*, 2006) (Wang *et al.*, 2001). A inativação de EBF e C/EBP (também conhecido como CEBPA) contribui no processo de tumorigênese (Liao, 2009) (Pabst *et al.*, 2001). O FT CEBPA também é importante na resposta aos danos no DNA dependente de TP53, tal como observado em queratinócitos (Yoon e Smart, 2004). O único FT selecionado de acordo com o critério de seleção (alto IE ou baixo valor p) foi o APOLYA, cuja função ainda não é bem conhecida.

A linhagem U343 apresentou poucos FTs preditos associados significativamente aos genes modulados, os quais foram exclusivos para essa linhagem celular irradiada: PR, E2F4:DP-1, e ARP-1. As funções destes FTs estão principalmente associadas ao ciclo celular, crescimento tumoral, e angiogênese, sendo envolvido em vários tipos de câncer (Schrell *et al.*, 1990; Grunberg *et al.*, 1991; Graham e Clarke, 1997; Qin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). A superexpressão

de E2F4 foi confirmada em várias linhagens GBM (Donaires *et al.*, 2013), demonstrando o potencial deste FT como alvo molecular na terapia do câncer.

A linhagem U87 apresentou vários FTs preditos com os valores de p não ajustados significativos e pelo alto índice de enriquecimento, maiores do que em outras linhagens celulares. A maioria dos FTs preditos desempenha funções relacionadas ao processo de apoptose, como por exemplo, PPARG (Strakova *et al.*, 2005; Cellai *et al.*, 2006; Grommes *et al.*, 2006), Batch2 (Muto *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 2000), PEBP (Wu e Bonavida, 2009), HLF (Benito *et al.*, 2006), AP1 (Schreiber *et al.*, 1999; Shaulian e Karin, 2001) e EVI1 (Wieser, 2007)), sendo que estes foram associados tanto a genes induzidos como reprimidos. Outras funções biológicas também foram associadas aos FTs, como proliferação celular (PPARG, PEBP, AP1 e EVI1), diferenciação (Bach2 e EVI1) e angiogênese (AP1). Muitos destes FTs estão relacionados com a manutenção do crescimento tumoral, indicando a importância da sua desregulação no desenvolvimento do câncer e, possivelmente, em respostas tumorais a terapias anticâncer. Alguns desses FTs estão sendo utilizados em ensaios clínicos. Agonistas de PPARG utilizados como monoterapia não surtiram efeito no tratamento do câncer (Veliceasa *et al.*, 2008)

HEB foi escolhido como um dos FTs preditos na análise *in silico*, associado a genes induzidos na linhagem U87 (valor-p = 0,021 e IE = 1,5) a ser estudada em termos de níveis de expressão, apesar deste não ter apresentado baixo valor p e alto valor de IE, P. Há evidência de que HEB possa estar envolvido no controle da proliferação celular de células tronco neurais e também de células progenitoras, sendo importante na manutenção do estado celular indiferenciado durante a neurogênese embrionária e adulta (Uittenbogaard e Chiaramello, 2002). Mais informações serão fornecidas subsequentemente, quando abordaremos os efeitos do silenciamento desse FT.

Deste modo, foi demonstrado um aumento na expressão da transcrição de HEB (FC = + 2,6) 30 min. após a irradiação, ao passo que a expressão da proteína HEB, analisada por Western blot foi 1,7 vezes maior em células irradiadas (8 Gy), relativamente aos controles não-expostos. Ainda, foi detectada a expressão proteica de HEB na linhagem U87 e em astrócitos primários (ACBRI 371), além de suas neuroesferas pelos métodos de Western blot e imunocitoquímica.

Provavelmente, esta variação nas respostas transcricionais é devida à heterogeneidade genética, o que é característico de GBM. Apesar desta observação, várias funções biológicas associadas aos FTs foram similares entre as linhagens, tais como apoptose, proliferação celular, controle do ciclo celular, reparo de DNA, estresse de RE, e diferenciação. Ainda, a maioria dos FTs preditos já foi descrita como expressos diferencialmente, ou deletados ou mutados em tumores, incluindo GBM. No entanto, apesar da semelhança nas funções biológicas, diferentes vias parecem estar associadas aos FTs preditos.

Curiosamente, não foi possível encontrar TP53 como um FT associado ao conjunto de dados (genes diferencialmente expressos em células irradiadas) analisados no presente estudo, mesmo para as células de GBM que eram do tipo selvagem para o gene *TP53*, muito embora o clone de cDNA de TP53 estivesse presente na lâmina do microarranjo. É possível que devido a algum bloqueio nas vias de sinalização, a proteína TP53 não possa ser ativada em células GBM, prejudicando a sua ação como fator de transcrição, tal como foi sugerido anteriormente por outros autores (Shu *et al.*, 1998).

Desse modo, resultados interessantes obtidos nesse trabalho apontam a associação de FTs a processos importantes na manutenção tumoral, angiogênese, proliferação, diferenciação, manutenção de células tronco, etc. Entretanto, algumas limitações tecnológicas devem ser mencionadas, relativas à predição de FTs *in silico*; apesar do grande avanço em termos de detecção dos sítios de ligação no DNA, é difícil determinar quais são elementos reguladores funcionais que influenciam a transcrição. É possível que uma fração considerável dos sítios de ligação não seja funcional e possa constituir um ruído biológico (Struhl, 2001). Alternativas, como os experimentos de ChIP, podem superar este problema detectando interações indiretas entre os FTs e os sítios de ligação no DNA (Chen *et al.*, 2008).

Em um estudo anterior de nosso grupo, foi validada a expressão de E2F1 por qPCR em tempo real em sete linhagens de GMB (Donaires *et al.*, 2013). No presente trabalho, confirmamos a expressão de E2F1 por *Western blot* nas linhagens U87, ACBRI 371 e suas respectivas neuroesferas, demonstrando a confiabilidade do método de predição. Do mesmo modo, foram selecionados FTs preditos associados a genes de resposta ao estresse, sendo que os mesmos foram

relatados como desregulados ou mutados em diferentes tipos de câncer, o que indica a importância de estudos adicionais para melhor explorar o papel desses FTs no contexto das estratégias terapêuticas baseadas em alvos moleculares.

### **5.2. Expressão de HEB e efeitos do silenciamento desse gene**

Após a realização da análise *in silico*, o FT HEB, o qual foi associado a genes induzidos na linhagem U87 irradiada (valor-p = 0,021 e IE = 1,5), foi estudado em termos de níveis de expressão transcrional e proteica. Foi comparada a expressão proteica de HEB entre U87 e astrócitos primários (ACBRI 371), além de suas neuroesferas, usando-se os métodos de Western blot e imunocitoquímica. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, observou-se que as células U87 apresentaram uma maior expressão relativa de HEB em relação aos astrócitos. Condizente com esse resultado, HEB foi transcrionalmente induzido em gliomas em comparação com tecido cerebral não canceroso (Riemenschneider *et al.*, 2004). Outros estudos associaram a superexpressão de HEB a metástase de câncer colorretal (Lee *et al.*, 2012).

A proteína HEB, também chamada de TCF12 ou HTF4, é membro da família básica de hélice-alça-hélice (bHLH) de fatores de transcrição. Esta família é dividida em sete classes, de acordo com sua distribuição, capacidade de dimerização e especificidade de ligação ao DNA (Massari e Murre, 2000). HEB pertence à classe I, também conhecida como proteínas E, expressas em vários tecidos formando homo e heterodímeros. Esta proteína participa no desenvolvimento do sistema nervoso, interagindo com proteínas específicas da neurogênese e atuando na manutenção e proliferação das células tronco neurais (Uittenbogaard e Chiaramello, 2002; Ravanpay e Olson, 2008).

No presente trabalho, foi também demonstrado um aumento transcrional de HEB, 30 min. após a irradiação, ao passo que a expressão da proteína HEB foi 1,7 vezes maior em células irradiadas (8 Gy), relativamente aos controles não-expostos.

Desta forma, foram estudadas as consequências do silenciamento de HEB siRNA na proliferação, morte celular, ciclo celular, formação de neuroesferas e na proporção de células CD133 positivas, utilizado como um marcador de células-tronco.

O silenciamento de HEB foi analisado 72 h após a transfecção e atingiu 97,8% de inibição em relação ao grupo SCR. Quando comparados os grupos silenciados por HEB, em relação ao SCR, sem tratamento, foi observada uma redução significativa da proliferação celular no tempo de 72h e um aumento de morte celular pela quantificação de células na fase sub-G1 do ciclo em 24 h. Esse aumento de morte foi acompanhado de uma diminuição significativa de células em G0/ G1.

O silenciamento de HEB em linhagens de câncer colorretal reduziu a capacidade de migração, invasão e metástase (Lee *et al.*, 2012). Nesse trabalho, a correlação da superexpressão de HEB mRNA com a metástase de câncer colorretal foi sugerida por dados de microarranjos e validados em 120 pacientes, sendo demonstrado que HEB atua como um repressor de E-caderina (Lee *et al.*, 2012). Portanto, o silenciamento de HEB, em ambos os casos (câncer colorretal e GBM), levou à redução de características que são importantes na patogênese do câncer, como proliferação e invasão celular.

Como descrito anteriormente, o valor de expressão relativa transcrecional e proteica de HEB foi maior nas células U87 irradiadas, o que motivou a realização de experimentos para verificar os efeitos do silenciamento do gene HEB. A irradiação também diminuiu significativamente a proliferação das células silenciadas para HEB, em relação às não irradiadas e analisadas após 72 h. Entretanto, em termos relativos, a irradiação reduziu na mesma proporção o número de células dos grupos silenciados para HEB e transfectados com a sequência *scrambled*, da mesma forma que a indução de necrose no tempo de 48 h e a redução no número de células em G0/ G1 em 72 h.

Assim, podemos concluir que apesar da expressão aumentada em células irradiadas, HEB não interferiu na radiosensibilidade da linhagem U87. Uma possível causa pode estar associada à sobreposição funcional das proteínas da família das proteínas-E. Em um estudo realizado em camundongos, foi descoberto que as proteínas-E são sobrepostas funcionalmente por outras proteínas da mesma família durante o desenvolvimento do sistema nervoso, de forma que o silenciamento de

HEB e E2A não explicitou nenhuma deficiência neuro-anatômica, celular ou comportamental em ensaios *in vivo* em camundongos (Ravanpay e Olson, 2008). Essa sobreposição funcional das proteínas-E foi demonstrada durante o desenvolvimento, mas é plausível que ocorra em outros processos, como na resposta à irradiação. Apesar de não ter influenciado na radiosensibilidade, o silenciamento de HEB na linhagem U87 reduziu a proliferação celular.

### **5.3. Expressão de E2F1 e efeitos do silenciamento desse gene**

A predição de FTs *in silico* realizada a partir de amostras de GBM comparados a amostras de tecido cerebral de epiléticos indicou uma elevada expressão de E2F1. Esta foi demonstrada em amostras de células U87. A expressão transcracional de E2F1, avaliada anteriormente por qPCR em tempo real, foi maior em 7 linhagens de GBM comparadas a um *pool* de RNA de tecido cerebral de vários doadores (Donaires *et al.*, 2013). Entre os FTs preditos, escolhemos E2F1 para estudar a expressão protéica por Western blot, comparando a expressão relativa (ACTB) entre U87 e astrócitos primários (ACBRI 371), além de suas respectivas neuroesferas. A expressão de E2F1 foi detectada em todos os grupos experimentais. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na comparação dos valores relativos de expressão entre a linhagem U87 (0,23) e suas neuroesferas (0,30).

A proteína E2F1 é uma entre os oito membros da família de E2F, cuja função principal está ligada ao controle da progressão do ciclo celular (Helin *et al.*, 1992; Kaelin *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1992). De modo geral, as proteínas E2F são funcionalmente classificadas em ativadoras transpcionais (incluindo E2F1) e repressoras. As proteínas E2Fs podem se dimerizar com as proteínas da família DP (*DRTF Polypeptide*), formando um complexo que regula a expressão de vários genes (DeGregori e Johnson, 2006). A via *E2F-DP* é crucial na regulação da duplicação do DNA, apoptose e diferenciação celular (Dyson, 1998; DeGregori e Johnson, 2006).

A proteína do Retinoblastoma (pRb), um conhecido supressor tumoral, liga-se ao domínio de transativação da proteína e na região promotora do gene *E2F1*, reprimindo a transcrição gênica requerida para a transição G1-S (Giacinti e Giordano, 2006). A proteína E2F1 é o principal alvo da pRb (Wells *et al.*, 2003; Frolov e Dyson, 2004). A fosforilação de pRb pela Ciclina D/CDK4 e Ciclina E/CDK2, tardiamente na fase G1 do ciclo, libera as proteínas E2F promovendo assim a expressão de genes relacionados à síntese de DNA e progressão do ciclo celular, resultando na proliferação de células (Polyak *et al.*, 1994; DeGregori *et al.*, 1995). A dissociação da proteína pRb de E2F parece ser o principal determinante na regulação da proliferação celular, ao permitir que ocorra a transativação de genes, tais como *Ciclina A*, *Ciclina E*, *c-myb*, *cdc2*, *PCNA* e timidina-quinase, além de direcionar as células para a fase S do ciclo (DeGregori, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que pRB/ E2F1 integra a resposta proliferativa com as vias de sobrevivência celular por induzir o acúmulo de TP53 (Qin *et al.*, 1994; Shan e Lee, 1994; Wu e Levine, 1994; Kowalik *et al.*, 1995; Kowalik *et al.*, 1998).

O gene mais bem caracterizado da família E2F é o *E2F1*. Este apresenta uma dicotomia de funções (Pierce *et al.*, 1999). O E2F1 também pode atuar como uma molécula supressora tumoral induzindo apoptose *in vivo* e *in vitro* (DeGregori *et al.*, 1997). Em camundongos *knockout* para E2F1, houve a indução espontânea de malignidades (Field *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1996). Em resposta ao dano no DNA, E2F1 pode induzir apoptose por meio da regulação de genes dependentes ou independentes de TP53 (Bates *et al.*, 1998; Irwin *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2001). Até o presente, não houve descrição de mutações com perda de função de E2F1 em tumores humanos. Entretanto, *E2F1* também atua como um oncogene, cuja superexpressão é suficiente para induzir a transformação de células primárias de roedores (Johnson *et al.*, 1994) e promover tumorigênese quando expresso em tumores epiteliais escamosos de camundongos (Pierce *et al.*, 1999). A dupla função de E2F1 também é evidenciada na modulação de miRNAs. Recentemente, foram descritos miRNAs induzidos por E2F1 que atuam como supressores tumorais, reduzindo o crescimento celular e induzindo apoptose (Lize *et al.*, 2010; Suh *et al.*, 2012). Contudo, miRNAs dependentes de E2F1 estão envolvidos na proliferação e sobrevivência alvejando vários supressores tumorais (Brosh *et al.*, 2008; Petrocca *et al.*, 2008; Lize *et al.*, 2010).

O papel pró-oncogênico de E2F1 é corroborado pelos inúmeros relatos de superexpressão e/ ou a amplificação do gene E2F1 em vários tipos de tumores humanos, tais como carcinoma gastrointestinal (Suzuki *et al.*, 1999), carcinoma e câncer de cólon (Suzuki *et al.*, 1999; Postma *et al.*, 2005), linfoma maligno (Lai *et al.*, 1998), e carcinoma pulmonar de células pequenas (Eymin *et al.*, 2001) ou não-pequenas (Kotsinas *et al.*, 2002). É importante ressaltar que a amplificação do gene E2F1 tem sido associada à progressão de metástase em câncer colo-retal (Iwamoto *et al.*, 2004) e ao carcinoma de células escamosas do esôfago (Fujita *et al.*, 2003). Em gliomas malignos, Parr e colaboradores (Parr *et al.*, 1997) relataram uma maior atividade dos promotores responsivos ao E2F em células tumorais do que em células normais. A superexpressão de E2F em gliomas pode se resultante de um excesso de E2F1 "livre", já que a via de pRb é inativada em mais de 90% dos tumores (Gomez-Manzano *et al.*, 2004), além do aumento nos níveis totais de E2F1 observada no GBM (Alonso *et al.*, 2005). Aliás, E2F1 pode participar na regulação da atividade da telomerase em gliomas malignos, sendo correlacionada com a sobrevida de pacientes com este tipo de tumor (Alonso *et al.*, 2005).

Embora E2F1 tenha sido transcripcionalmente superexpresso em GBM, em relação a amostras de tecido normal de cérebro (Donaires *et al.*, 2013), o mesmo não foi observado quanto à expressão proteica, visto que os níveis de proteína E2F1 foram semelhantes entre os astrócitos e a linhagem U87.

O silenciamento de E2F1 por siRNA reduziu a expressão dessa proteína em 76 e 84,8% em 48 e 72 h, respectivamente, quando o grupo silenciado foi comparado ao grupo transfetado com a sequência *scrambled*, conforme os dados da análise densitométrica das bandas do Western blot. Igualmente, foram estudadas as consequências do silenciamento de E2F1 siRNA na proliferação, morte celular, ciclo celular, formação de neuroesferas e na proporção de células tronco CD133+.

O silenciamento de E2F1 diminuiu significativamente a proliferação das células U87, nos tempos de 24, 48 e 72 h, comparados ao grupo SCR. Em vários trabalhos, foi demonstrado que o silenciamento de E2F1 reduz o crescimento tumoral em câncer gástrico *in vitro* (Xie *et al.*, 2009) e *in vivo* (Wang *et al.*, 2011), em carcinoma hepatocelular (Farra *et al.*, 2011) e em células de glioma de ratos (Dos Reis Vasques *et al.*, 2010). Uma das possíveis explicações para essa queda na proliferação parece estar relacionada a diminuição da expressão de ciclina A, um

dos alvos de E2F1 (Dos Reis Vasques *et al.*, 2010). A ciclina A participa da síntese de DNA e da entrada em mitose (Pagano *et al.*, 1992), sendo a sua atividade relacionada ao estado proliferativo e grau de malignidade de astrocitomas de diferentes graus (I-IV) (Allan *et al.*, 2000). A repressão de E2F1 em conjunto com a repressão de Ciclina A, por meio de drogas de ação não específica como a D9-THC (D9-Tetrahydrocannabinol) e extratos de *T. japonica*, resultou na redução da proliferação celular. No entanto, D9-THC não induziu apoptose e promoveu bloqueio em G1, enquanto que o extrato de *T. japonica* resultou na indução de apoptose, e bloqueio em S, respectivamente (Galanti *et al.*, 2008; Jung e Ghil, 2010). Em um trabalho relacionado, a repressão de E2F1 via miR-106a suprimiu a proliferação e induziu apoptose em gliomas humanos, além de induzir o bloqueio em G0/G1 e diminuir o número de células na fase S do ciclo celular. Foi demonstrado que os altos níveis de expressão de E2F1 e o alto grau de malignidade em gliomas se correlacionam com a baixa expressão de miR-106a (Yang *et al.*, 2011).

Existem relatos na literatura relacionados ao silenciamento de E2F1 pela técnica de RNAi, mas poucos foram realizados especificamente para células de GBM. Observou-se que a repressão de E2F1 em GBM está relacionada aos efeitos de drogas de ação não específica ou através do efeito da transfecção de miRNA (Galanti *et al.*, 2008; Jung e Ghil, 2010; Yang *et al.*, 2011), tornando difícil a comparação com os nossos resultados, já que nesses casos, provavelmente outras vias importantes podem estar alteradas. Em vários trabalhos foi relatado que a repressão de E2F1 alterou a proliferação celular (Xie *et al.*, 2009; Dos Reis Vasques *et al.*, 2010; Farra *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Entretanto, os resultados variaram quanto à fase do ciclo celular em que ocorreu o bloqueio e também quanto à indução ou não de apoptose. Foram relatados bloqueios tanto em G0/G1 quanto em S, além de indução de apoptose ou não, em decorrência da repressão de E2F1 em células de GBM (Galanti *et al.*, 2008; Jung e Ghil, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, a redução na proliferação celular ocorrida após o silenciamento de E2F1 pode estar associada parcialmente ao aumento de células necróticas em relação às células transfectadas com a sequência SCR em 24 h, avaliado por citometria (*kit Via Count*) e pela taxa de indução de morte (apoptose + necrose) pela análise da população sub-G1 do ciclo celular em 24 e 72 h. O ensaio de detecção de células em sub-G1 não evidencia o tipo de morte celular, detectando

apenas as células apoptóticas em estágio final. Assim, nossos resultados referentes ao silenciamento de E2F1 assemelham-se aos da literatura, por reduzir a proliferação e induzir morte celular (pelo menos nos tempos de 24 e 72h). Entretanto, não detectamos bloqueio no ciclo celular e sim uma diminuição de G0/G1 (24h), sendo que esta possa ser uma resposta específica de GBM a esse silenciamento, nunca antes observada para a linhagem U87.

Ainda, a radiação ionizante reduziu a proliferação celular do grupo silenciado para E2F1 em relação ao grupo somente silenciado (72h). Entretanto, neste mesmo tempo de coleta, a redução na proliferação do grupo SCR irradiado foi semelhante ao do grupo E2F1 irradiado, em termos de porcentagem relativa. Observou-se que o efeito da irradiação das células associado ao silenciamento de E2F1, 24 h após o tratamento, reduziu a porcentagem relativa de células viáveis irradiadas em menor escala quando comparado ao grupo SCR irradiado. Enquanto a radiação ionizante aumentou significativamente os níveis de necrose nos tempos de 24, 48 e 72 h, no grupo SCR, o grupo silenciado para E2F1 só apresentou um aumento significativo de necrose no tempo de 48h, quando irradiado. Pelo menos no tempo de 24 h, essa ausência de diferenças significativas entre o grupo irradiado e o não irradiados do grupo E2F1 siRNA corrobora os dados de proliferação, visto que o silenciamento de alguma forma atenuou os efeitos da irradiação, quando comparados com o grupo SCR.

Apesar de E2F1 ter sido predito a partir de amostras não irradiadas, sabe-se que este FT atua na resposta a danos no DNA, no reparo do DNA, no ciclo celular e apoptose (Biswas e Johnson, 2012). Mecanismos distintos de regulação de E2F1 podem ser responsáveis pelas respostas opostas de sua ativação, as quais podem variar de progressão no ciclo à indução de apoptose. Em resposta ao estresse genotóxico, ocorre a indução da transcrição de E2F1, dependente de ATM e ATR, sensores de danos no DNA, resultando em um aumento de E2F1 (Carcagno *et al.*, 2009). A ativação de ATM/ ATR é um evento muito precoce na resposta ao dano no DNA e ativa checkpoints do ciclo celular, reparo no DNA e apoptose através de cascadas de transdução de sinal a moléculas efetoras (Xu e Baltimore, 1996; Barlow *et al.*, 1997). Além disso, E2F1 também forma *foci* em regiões de DSBs, embora sua função nessas regiões ainda seja desconhecida. A deficiência em E2F1 resulta em uma fosforilação e formação deficiente de *foci* de NBS1, RPA e Rad51 em resposta

à formação de DSBs. O silenciamento de E2F1 leva a quebras espontâneas no DNA e diminuição na recuperação celular após a irradiação ionizante em linhagens de fibroblastos de camundongos (Chen *et al.*, 2011).

Além de estudos envolvendo o silenciamento direto de E2F1, outros estão relacionados ao silenciamento indireto. Em trabalhos que utilizaram várias linhagens celulares de câncer, incluindo GBM, o silenciamento de MDM2, o qual ativa E2F1, resultou em uma diminuição da expressão de E2F1, a qual se apresentou aumentada em células irradiadas (Dong *et al.* 2002). Assim, foi concluído que a redução da expressão de E2F1 é pelo menos em parte responsável pelos efeitos radiosensibilizadores da inibição de MDM2 (Zhang *et al.*, 2004).

Os efeitos da superexpressão de E2F1 também já foram estudados em resposta à radiação. Segundo Afshar e colaboradores, (2006), a irradiação da linhagem U87 não induz E2F1. Entretanto, utilizando um sistema induzível de E2F1, os autores observaram a indução da caspase 8 e consequente diminuição da viabilidade das células irradiadas (Afshar *et al.*, 2006). Em outro estudo, foi demonstrado que a indução de apoptose por meio da superexpressão induzida de E2F1 foi aumentada ainda mais após a irradiação (Shu *et al.*, 2000). Apesar de a superexpressão ter efeito na indução de apoptose, o E2F (o qual apresenta grande atividade em termos de afetar a capacidade proliferativa das células) pode promover um aumento na agressividade do tumor (Johnson *et al.*, 1994).

Os dados apresentados neste trabalho são contrastantes com os da literatura citada acima, pois o silenciamento de E2F1 não aumentou os efeitos dos raios-gama, mas ao contrário, amenizou esses efeitos, pelo menos em 24 h, sendo que nos outros tempos de coleta (48 e 72h) os efeitos do silenciamento associados à irradiação não foram detectados. Uma possível explicação seria que o próprio silenciamento de E2F1 tenha gerado muitos danos nas células, visto que houve diminuição na proliferação e índices de morte celular, mesmo nas células não irradiadas. Essa explicação é plausível em face aos resultados obtidos por Chen et al. (2011), visto que foi demonstrado que o silenciamento de E2F1 pode gerar danos no DNA. Como o silenciamento ocorreu em 48 h antes da irradiação, provavelmente essas células já estariam adaptadas a esse estresse e estariam com o mecanismo de reparo já ativado, da mesma forma que no mecanismo de resposta adaptativa às radiações; células pré-expostas a uma baixa dose de radiação e depois irradiadas

com uma dose alta apresentam menor quantidade de aberrações cromossômicas do que as células que só foram irradiadas com a uma dose alta (Fomenko *et al.*, 2006). Como existem poucos trabalhos envolvendo o silenciamento de E2F1 associados aos efeitos das radiações, torna-se difícil estabelecer uma comparação, principalmente porque a expressão de E2F1 apresenta diferentes significados e consequências em vários tipos de células tumorais, além das diferentes condições de cultivo.

#### **5.4. Formação de neuroesferas e diferenciação**

As células cultivadas em neuroesferas apresentam um número maior de marcadores de superfície celular associados ao fenótipo de células-tronco, comparativamente às células cultivadas em monocamada, além de apresentar capacidade de auto-renovação e diferenciação multipotente (Rappa *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a eficiência na formação de neuroesferas observada para a linhagem U87 foi de 16,08 %, enquanto que a porcentagem de células tronco CD133 + nas neuroesferas foi de ≈ 40 %. Em outros trabalhos, observou-se 3,5 % de neuroesferas para a mesma linhagem (Rappa *et al.*, 2008) e cerca de 3 a 5 % para linhagens primárias de GBM (Yuan *et al.*, 2004). Em ensaios com a mesma linhagem celular (U87), foi demonstrado que 59% das células presentes nas neuroesferas eram CD133 +, cerca de 10% acima do valor obtido para as linhagens cultivadas em monocamada (Ajeawung e Deepak Kamnasaran, 2010), enquanto outros autores relataram 80% de células CD133 + (Yuan *et al.*, 2004).

Em nossos resultados, a radiação ionizante reduziu em 40% o número de neuroesferas 6 dias após a irradiação, porcentagem de redução semelhante à observada nas células cultivadas e irradiadas em monocamada, colhidas 3 dias após o tratamento. Como os tempos de coleta foram diferentes, foi difícil comparar a radiorresistência baseada no método de cultivo. O cultivo das neuroesferas em meio contendo EGF e FGF-2 provavelmente ativam o reparo do DNA, o que gera

dificuldade na comparação dos resultados gerados por experimentos com células aderentes mais diferenciadas (Firat *et al.*, 2011).

Conforme demonstrado por Fedrigo e colaboradores (2011), o volume das neuroesferas foi mantido mesmo após a irradiação, sendo que em nosso caso, este foi definido a partir da contagem das células presentes nas neuroesferas. Foi relatado na literatura que as CTCs CD133 positivas atuam na radiorresistência dos tumores, aumentando a sua proporção após a irradiação em consequência da apoptose seletiva de células CD133 negativas (Bao *et al.*, 2006). As células sobreviventes após a irradiação apresentaram capacidade de diferenciação múltipla e de formação de tumores secundários (Bao *et al.*, 2006).

Em outro trabalho, as neuroesferas cultivadas a partir de linhagens primárias de GBM apresentaram até 80% de células CD133+ e quando semeadas em meio de diferenciação por 7 dias, essa quantidade de células CD133+ foi reduzida a menos de 5 % (Yuan *et al.*, 2004). As células cultivadas em monocamada não apresentam células CD133 +. Essa redução de CD133, tanto em células cultivadas em monocamada quanto em células provenientes das neuroesferas semeadas em meio de diferenciação, acompanhada da redução de nestina, outro marcador de pluripotência das células tronco, sendo também observado um acréscimo nos marcadores  $\beta$ -Tubulina III, GFAP e mielina, marcadores específicos para neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, respectivamente (Yuan *et al.*, 2004). Assim, a redução de células CD133+ implica em perda da capacidade de pluripotência, além de um aumento na diferenciação celular quando as células são semeadas em meio de cultivo para diferenciação. Neste estudo, os resultados do ensaio no qual as células dissociadas a partir das neuroesferas foram semeadas em meio de diferenciação e cultivadas por 8 dias foi possível observar uma diminuição significativa da proporção de células CD133+ (<10%), enquanto que as células irradiadas apresentaram uma maior proporção de células CD133+ ( $\approx$  20%). Em células IPS irradiadas, não foram detectadas diferenças nos níveis de expressão de marcadores de células tronco como Nanog e Oct-4 em relação à não irradiadas (Hayashi *et al.*, 2012).

Vários inibidores de formação de neuroesferas foram avaliados em um amplo estudo de compostos com capacidade inibitória de proliferação em culturas de CTC. Esses agentes químicos induziram diferentes fenótipos nas neuroesferas, alterando o número, tamanho e capacidade de adesão das esferas (Diamandis *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, foi avaliada a influência do silenciamento de FTs cujas funções são também relacionadas, de alguma forma, às células-tronco.

No presente trabalho, a análise de expressão proteica mostrou um aumento na expressão de E2F1 nas neuroesferas em relação às células U87 cultivadas e aderidas em monocamada, o que pode ser associado a uma maior proliferação das células tronco em relação às cultivadas em monocamada. A superexpressão deste FT já foi relatada em vários tipos de câncer, incluindo glioblastoma (Alonso *et al.*, 2005).

O número de neuroesferas formadas a partir de células silenciadas para E2F1 sofreu uma redução significativa (aproximadamente três vezes) em relação ao grupo SCR, apesar de o número de células por neuroesferas ter se mantido constante. Esta redução provavelmente está relacionada à perda da capacidade proliferativa conferida pela E2F1. Outra possibilidade seria a de que as neuroesferas possam ter sido formadas a partir das células que não foram transfectadas por E2F1 siRNA, ou que estas voltaram a apresentar a expressão desse gene graças ao término do efeito do E2F1 siRNA, já que o número de células por neuroesfera se manteve constante.

Baseado em uma análise genômica *in silico* de sítios de ligação e de microarranjos, os FTs da família E2F foram identificados como um dos principais candidatos à regulação do transcriptoma das células tronco pluripotentes humanas. Análises subsequentes de grupos gênicos funcionais demonstraram a importância deste FT na pluripotência, interagindo com alvos relacionados à sinalização global (vias de autorrenovação por WNT e FGF) e redes metabólicas (vias de geração de energia, transporte molecular e metabolismo de ácidos graxos) (Yeo *et al.*, 2011). E2F1 também está envolvido na neurogênese do cérebro pós-natal e adulto de camundongos, controlando a proliferação celular dos neurônios (Cooper-Kuhn *et al.*, 2002). Mutantes para E2F1 apresentaram uma diminuição na taxa de divisão celular das células tronco progenitoras provenientes de zonas proliferativas da parede do ventrículo lateral e do hipocampo (Cooper-Kuhn *et al.*, 2002). Portanto, é evidente o número de trabalhos que relacionam a expressão de E2F1 à proliferação de células tronco pluripotentes (Yeo *et al.*, 2011) e células tronco neurais (Cooper-Kuhn *et al.*, 2002), o que corrobora nossos resultados, os quais indicam que o silenciamento de E2F1 levou a uma diminuição na proliferação das neuroesferas de U87.

Adicionalmente, os resultados do presente estudo mostraram que a irradiação das células reduziu a formação das neuroesferas de células silenciadas para E2F1, mas a proporção da redução observada em neuroesferas foi igual à gerada pelas células transfectadas para SCR e irradiadas, evidenciando que o silenciamento com o E2F1 siRNA não alterou a resposta à irradiação em células tronco de GBM. Entretanto, a acentuada marcação de CD133 nas células silenciadas para E2F1 indica um enriquecimento de células CD133+, mesmo em condições adversas para a mesma (meio de diferenciação), quando comparado ao grupo SCR, cujos valores de expressão de CD133 foram bem menores.

Esta proporção maior de CD133 presente nas células silenciadas para E2F1 pode indicar que o silenciamento bloqueou a capacidade de diferenciação celular, já que a quantidade de células CD133+ tende a diminuir com o aumento da diferenciação (Yuan *et al.*, 2004). Nossa hipótese é plausível, pois, já foi demonstrado que E2F1 atua na expressão de genes específicos durante a diferenciação de miócitos e adipócitos (Flowers *et al.*, 2013). Outra possibilidade é a seleção das células CD133+ após o silenciamento de E2F1. Todavia, a diminuição de células CD133 positivas no grupo silenciado para E2F1 irradiado, em relação ao não irradiado é contraditória, pois tanto o silenciamento quanto a irradiação ionizante deveriam manter a quantidade de células CD133 positivas, e não apresentar uma diminuição.

HEB, outro FT selecionado para o silenciamento parece estar envolvido no controle da proliferação celular de células tronco neurais e também de células progenitoras, sendo importante na manutenção do estado celular indiferenciado durante a neurogênese embrionária e adulta (Uittenbogaard e Chiaramello, 2002).

Em nossos estudos, os valores de expressão de HEB nas neuroesferas da linhagem U87 foram superiores em relação às neuroesferas da linhagem de astrócitos primários.

As neuroesferas formadas a partir de células silenciadas para HEB foram reduzidas significativamente em aproximadamente 2 vezes, quando comparadas às neuroesferas formadas a partir das células transfectadas com a sequência *scrambled*. É possível que a redução de HEB possa ter alterado a sua capacidade de manutenção das células tronco, diminuindo assim o número de neuroesferas. A expressão de CD133 avaliada oito dias após a dissociação das células silenciadas

para HEB não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SCR, apesar de visualmente maior no grupo silenciado para HEB, indicando uma diminuição na diferenciação. Há evidência de que HEB possa participar da oligodendrogênese e assim regular a sobrevivência celular e proliferação dessas células (Sussman *et al.*, 2002), indicando um possível papel no processo de diferenciação, o que corrobora nossa hipótese.

Neste trabalho, não foi observado efeito da irradiação na redução do número de neuroesferas silenciadas para HEB em comparação ao grupo não irradiado, mas houve uma redução no número de células presentes nas neuroesferas, indicando que o silenciamento de HEB, de alguma maneira, causou um efeito associado à irradiação, resultando em redução no número de células por neuroesfera. Do mesmo modo, a proporção de células CD133 + foi semelhante nos grupos silenciados para HEB, irradiados ou não. Esses dados indicam que HEB, de alguma forma, possa atuar na resposta das neuroesferas aos raios-gama, fato este ainda não relatado na literatura. A manutenção da mesma proporção de células CD133+ 8 dias após a dissociação de células silenciadas para HEB, irradiadas ou não, indica que possivelmente o silenciamento de HEB protegeu as células CD133- dos efeitos da radiação. Assim, o silenciamento de HEB mostrou-se eficaz na redução do número de células presentes nas neuroesferas, mas ineficaz na radio-sensibilização das neuroesferas da linhagem U87. Além disso, o silenciamento desses FTs resultou em uma menor taxa de diferenciação, associada à baixa diminuição do marcador CD133, diferente do observado no grupo transfetado com a sequência *scrambled*.

# **CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- Foram identificados FTs alvos a partir da predição *in silico* utilizando como base de dados os genes diferencialmente expressos após a irradiação (8 Gy) de linhagens de GBM (T98G, U343MG-a, U251 e U87MG), sendo que a maioria dos FTs preditos foi exclusiva para cada linhagem, indicando que a resposta transcrecional em resposta à irradiação é muito específica, provavelmente devido à heterogeneidade genética destas. Esta análise resultou em possíveis alvos para o silenciamento.
- O FT HEB, envolvido na formação do sistema nervoso, foi predito a partir de predição *in silico* (a partir dos resultados da análise de dados de expressão transcrecional obtidos por microarranjos de DNA) em células de GBM irradiadas. Na linhagem U87 foi observado um aumento na expressão de HEB após a irradiação, em comparação ao controle. Em neuroesferas dessa linhagem, também se observou uma expressão aumentada em relação às neuroesferas formadas a partir dos astrócitos, indicando um possível papel de HEB em GBM.
- O FT E2F1, envolvido na proliferação celular, foi predito por meio de análise *in silico* realizada anteriormente para um conjunto de dados obtidos a partir de repositórios públicos de experimentos de microarranjos envolvendo várias amostras de GBM comparadas a amostras de tecido cerebral de epiléticos. Este FT foi expresso nas linhagens U87 e astrocítica e suas respectivas neuroesferas, cuja expressão pode estar associada à alta proliferação dessas células.
- O silenciamento de HEB e E2F1 na linhagem U87 demonstrou que esses FTs devem provavelmente atuar na manutenção da proliferação/ viabilidade e no ciclo celular, indicando uma possível semelhança funcional entre esses FTs, além destes pouco interferirem nas respostas dessas células à irradiação.
- O silenciamento de HEB e E2F1 reduziu o número de neuroesferas oriundas da linhagem U87 em duas e três vezes, respectivamente, quando comparadas às células transfetadas com a sequência *scrambled*. Possivelmente, a capacidade anti-proliferativa do silenciamento dos FTs HEB e E2F1 observada no cultivo em monocamada da U87, possam atuar na capacidade de formação de neuroesferas e,

consequentemente, apresentar um papel na manutenção das células tronco do GBM.

- A irradiação não reduziu o número de neuroesferas silenciadas para HEB em comparação ao grupo não irradiado, mas reduziu o número de células presentes nas neuroesferas, indicando uma possível atuação de HEB na resposta à irradiação ionizante em neuroesferas, fato este nunca antes descrito. O silenciamento de E2F1 não interferiu na resposta das neuroesferas à radiação.
- A expressão de CD133 avaliada oito dias após a dissociação das células silenciadas para E2F1 e HEB, cultivadas em meio de diferenciação, foi superior ao do grupo *scrambled*, indicando uma possível diminuição na diferenciação celular. A participação de HEB e E2F1 na diferenciação de células tronco de GBM ainda não foi relatada na literatura.
- O silenciamento de E2F1 e HEB não influenciou na seleção positiva de CD133+ após a irradiação, como observado no grupo das neuroesferas transfectadas com a sequência *scrambled* e irradiadas, comparado às não irradiadas, o que merece ainda ser investigado.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afshar, G., N. Jelluma, X. Yang, D. Basila, N. D. Arvold, A. Karlsson, G. L. Yount, T. B. Dansen, E. Koller e D. A. Haas-Kogan (2006). "Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells." Cancer Res **66**(8): 4223-4232.
- Ajeawung, N. e D. Deepak Kamnasaran (2010). "An efficient approach to Enrich Glioma Stem Cells from Glioma Cell Lines in Culture" WebmedCentral ONCOLOGY **1**: 9.
- Al-Shahrour, F., P. Minguez, J. Tarraga, I. Medina, E. Alloza, D. Montaner e J. Dopazo (2007). "FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W91-96.
- Al-Shahrour, F., P. Minguez, J. M. Vaquerizas, L. Conde e J. Dopazo (2005). "BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W460-464.
- Allan, K., R. C. Jordan, L. C. Ang, M. Taylor e B. Young (2000). "Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas." Arch Pathol Lab Med **124**(2): 216-220.
- Alonso, M. M., J. Fueyo, J. W. Shay, K. D. Aldape, H. Jiang, O. H. Lee, D. G. Johnson, J. Xu, Y. Kondo, T. Kanzawa, S. Kyo, B. N. Bekele, X. Zhou, J. Nigro, J. M. McDonald, W. K. Yung e C. Gomez-Manzano (2005). "Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance." J Natl Cancer Inst **97**(21): 1589-1600.
- Asting, A. G., H. Caren, M. Andersson, C. Lonnroth, K. Lagerstedt e K. Lundholm (2011). "COX-2 gene expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter methylation status." BMC Cancer **11**: 238.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner e J. N. Rich (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-760.
- Barlow, C., K. D. Brown, C. X. Deng, D. A. Tagle e A. Wynshaw-Boris (1997). "Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways." Nat Genet **17**(4): 453-456.

- Barrett, T., T. O. Suzek, D. B. Troup, S. E. Wilhite, W. C. Ngau, P. Ledoux, D. Rudnev, A. E. Lash, W. Fujibuchi e R. Edgar (2005). "NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D562-566.
- Barrett, T., D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, C. Evangelista, I. F. Kim, M. Tomashevsky, K. A. Marshall, K. H. Phillippy, P. M. Sherman, R. N. Muertter, M. Holko, O. Ayanbule, A. Yefanov e A. Soboleva (2011). "NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D1005-1010.
- Bartek, J., C. Lukas e J. Lukas (2004). "Checking on DNA damage in S phase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 792-804.
- Bartek, J. e J. Lukas (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 238-245.
- Batchelor, T. T., R. A. Betensky, J. M. Esposito, L. D. Pham, M. V. Dorfman, N. Piscatelli, S. Jhung, D. Rhee e D. N. Louis (2004). "Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 228-233.
- Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, F. Stott, G. Peters, R. L. Ludwig e K. H. Vousden (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." Nature **395**(6698): 124-125.
- Battaglia, S., O. Maguire e M. J. Campbell (2010). "Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting." Int J Cancer **126**(11): 2511-2519.
- Belli, M., O. Sapora e M. A. Tabocchini (2002). "Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection." J Radiat Res (Tokyo) **43 Suppl**: S13-19.
- Benito, A., O. Gutierrez, C. Pipaon, P. J. Real, F. Gachon, A. E. Ritchie e J. L. Fernandez-Luna (2006). "A novel role for proline- and acid-rich basic region leucine zipper (PAR bZIP) proteins in the transcriptional regulation of a BH3-only proapoptotic gene." J Biol Chem **281**(50): 38351-38357.
- Bieda, M., X. Xu, M. A. Singer, R. Green e P. J. Farnham (2006). "Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome." Genome Res **16**(5): 595-605.
- Birney, E., J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, . . . e P. J. de Jong (2007). "Identification and

- analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." Nature **447**(7146): 799-816.
- Biswas, A. K. e D. G. Johnson (2012). "Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage." Cancer Res **72**(1): 13-17.
- Blais, J. D., V. Filipenko, M. Bi, H. P. Harding, D. Ron, C. Koumenis, B. G. Wouters e J. C. Bell (2004). "Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress." Mol Cell Biol **24**(17): 7469-7482.
- Bohr, V. A. (2002). "Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells." Free Radic Biol Med **32**(9): 804-812.
- Bowman, T., M. A. Broome, D. Sinibaldi, W. Wharton, W. J. Pledger, J. M. Sedivy, R. Irby, T. Yeatman, S. A. Courtneidge e R. Jove (2001). "Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7319-7324.
- Brennan, C., H. Momota, D. Hambardzumyan, T. Ozawa, A. Tandon, A. Pedraza e E. Holland (2009). "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations." PLoS ONE **4**(11): e7752.
- Brosh, R., R. Shalgi, A. Liran, G. Landan, K. Korotayev, G. H. Nguyen, E. Enerly, H. Johnsen, Y. Buganim, H. Solomon, I. Goldstein, S. Madar, N. Goldfinger, A. L. Borresen-Dale, D. Ginsberg, C. C. Harris, Y. Pilpel, M. Oren e V. Rotter (2008). "p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation." Mol Syst Biol **4**: 229.
- Carcagno, A. L., M. F. Ogara, S. V. Sonzogni, M. C. Marazita, P. F. Sirkin, J. M. Ceruti e E. T. Canepa (2009). "E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation." IUBMB Life **61**(5): 537-543.
- Carminati, P. O., F. S. Donaires, P. R. D. V. Godoy, A. P. Montaldi, G. A. S. Passos, J. A. Meador, A. S. Balajee e E. T. Sakamoto-Hojo (2013). DNA-PK is a potential molecular therapeutic target for glioblastoma. Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications, InTech. (*in press*)
- Carminati, P. O., S. S. Mello, A. L. Fachin, C. M. Junta, P. Sandrin-Garcia, C. G. Carlotti, E. A. Donadi, G. A. S. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2010). "Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line." Genetics and Molecular Biology **33**(1).

- Cawley, S., S. Bekiranov, H. H. Ng, P. Kapranov, E. A. Sekinger, D. Kampa, A. Piccolboni, V. Sementchenko, J. Cheng, A. J. Williams, R. Wheeler, B. Wong, J. Drenkow, M. Yamanaka, S. Patel, S. Brubaker, H. Tammana, G. Helt, K. Struhl e T. R. Gingeras (2004). "Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs." *Cell* **116**(4): 499-509.
- Cellai, I., S. Benvenuti, P. Luciani, A. Galli, E. Ceni, L. Simi, S. Baglioni, M. Muratori, B. Ottanelli, M. Serio, C. J. Thiele e A. Peri (2006). "Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells." *Br J Cancer* **95**(7): 879-888.
- Chaubey, R. C., H. N. Bhilwade, R. Rajagopalan e S. V. Bannur (2001). "Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for Comet assay." *Mutat Res* **490**(2): 187-197.
- Chen, J., R. M. McKay e L. F. Parada (2012). "Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells." *Cell* **149**(1): 36-47.
- Chen, J., F. Zhu, R. L. Weak, A. K. Biswas, R. Guo, Y. Li e D. G. Johnson (2011). "E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks." *Cell Cycle* **10**(8): 1287-1294.
- Chen, X., H. Xu, P. Yuan, F. Fang, M. Huss, V. B. Vega, E. Wong, Y. L. Orlov, W. Zhang, J. Jiang, Y. H. Loh, H. C. Yeo, Z. X. Yeo, V. Narang, K. R. Govindarajan, B. Leong, A. Shahab, Y. Ruan, G. Bourque, W. K. Sung, N. D. Clarke, C. L. Wei, H. H. Ng, S. Battaglia, O. Maguire e M. J. Campbell (2008). "Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting." *Cell* **133**(6): 1106-1117.
- Cooper-Kuhn, C. M., M. Vroemen, J. Brown, H. Ye, M. A. Thompson, J. Winkler e H. G. Kuhn (2002). "Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1." *Mol Cell Neurosci* **21**(2): 312-323.
- Crawford, E. L., T. Blomquist, D. N. Mullins, Y. Yoon, D. R. Hernandez, M. Al-Baghdadi, J. Ruiz, J. Hammersley e J. C. Willey (2007). "CEBPG regulates ERCC5/XPG expression in human bronchial epithelial cells and this regulation is modified by E2F1/YY1 interactions." *Carcinogenesis* **28**(12): 2552-2559.
- DeGregori, J. (2002). "The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles." *Biochim Biophys Acta* **1602**(2): 131-150.

- DeGregori, J. e D. G. Johnson (2006). "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis." Curr Mol Med **6**(7): 739-748.
- DeGregori, J., T. Kowalik e J. R. Nevins (1995). "Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes." Mol Cell Biol **15**(8): 4215-4224.
- DeGregori, J., G. Leone, A. Miron, L. Jakoi e J. R. Nevins (1997). "Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7245-7250.
- DeNardo, G. L., J. Schlom, D. J. Buchsbaum, R. F. Meredith, J. A. O'Donoghue, G. Sgouros, J. L. Humm e S. J. DeNardo (2002). "Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy." Cancer **94**(4 Suppl): 1332-1348.
- Diamandis, P., J. Wildenhain, I. D. Clarke, A. G. Sacher, J. Graham, D. S. Bellows, E. K. Ling, R. J. Ward, L. G. Jamieson, M. Tyers e P. B. Dirks (2007). "Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells." Nat Chem Biol **3**(5): 268-273.
- Dillon, C. P., P. Sandy, A. Nencioni, S. Kissler, D. A. Rubinson e L. Van Parijs (2005). "Rnai as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes." Annu Rev Physiol **67**: 147-173.
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu e H. Rodriguez (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." Free Radic Biol Med **32**(11): 1102-1115.
- Donaires, F. S., P. R. D. V. Godoy, G. S. Leandro, D. A. Espósito, D. Puthier e E. T. Sakamoto-Hojo (2013). "Transcriptional factors associated to over-expressed genes in glioblastoma multiforme, as predicted by in silico analysis on publicly microarray dataset " Submitted.
- Dos Reis Vasques, L., R. S. Pujiz, B. E. Strauss e J. E. Krieger (2010). "Knockdown of E2f1 by RNA interference impairs proliferation of rat cells in vitro." Genet Mol Biol **33**(1): 17-22.
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina e P. A. Sharp (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 457-467.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-2262.

- Eastman, A. (2004). "Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies." *J Cell Biochem* **91**(2): 223-231.
- el-Deiry, W. S. (1998). "Regulation of p53 downstream genes." *Semin Cancer Biol* **8**(5): 345-357.
- Eyler, C. E. e J. N. Rich (2008). "Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis." *J Clin Oncol* **26**(17): 2839-2845.
- Eymin, B., S. Gazzeri, C. Brambilla e E. Brambilla (2001). "Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma." *Oncogene* **20**(14): 1678-1687.
- Fachin, A. L., S. S. Mello, P. Sandrin-Garcia, C. M. Junta, E. A. Donadi, G. A. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2007). "Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays." *Radiat Res* **168**(6): 650-665.
- Fachin, A. L., S. S. Mello, P. Sandrin-Garcia, C. M. Junta, T. Ghilardi-Netto, E. A. Donadi, G. A. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2009). "Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation." *J Radiat Res (Tokyo)* **50**(1): 61-71.
- Fang, D., T. K. Nguyen, K. Leishear, R. Finko, A. N. Kulp, S. Hotz, P. A. Van Belle, X. Xu, D. E. Elder e M. Herlyn (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." *Cancer Res* **65**(20): 9328-9337.
- Farra, R., B. Dapas, G. Pozzato, B. Scaggiante, F. Agostini, C. Zennaro, M. Grassi, N. Rosso, C. Giansante, N. Fiotti e G. Grassi (2011). "Effects of E2F1-cyclin E1-E2 circuit down regulation in hepatocellular carcinoma cells." *Dig Liver Dis* **43**(12): 1006-1014.
- Fedrigo, C. A., I. Grivicich, D. P. Schunemann, I. M. Chemale, D. dos Santos, T. Jacovas, P. S. Boschetti, G. P. Jotz, A. Braga Filho e A. B. da Rocha (2011). "Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr." *Radiat Oncol* **6**: 156.
- Ferretti, V., C. Poitras, D. Bergeron, B. Coulombe, F. Robert e M. Blanchette (2007). "PReMod: a database of genome-wide mammalian cis-regulatory module predictions." *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D122-126.
- Field, S. J., F. Y. Tsai, F. Kuo, A. M. Zubiaga, W. G. Kaelin, Jr., D. M. Livingston, S. H. Orkin e M. E. Greenberg (1996). "E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation." *Cell* **85**(4): 549-561.

- Firat, E., S. Gaedicke, C. Tsurumi, N. Esser, A. Weyerbrock e G. Niedermann (2011). "Delayed cell death associated with mitotic catastrophe in gamma-irradiated stem-like glioma cells." Radiat Oncol **6**: 71.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver e C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Flowers, S., F. Xu e E. Moran (2013). "Cooperative activation of tissue specific genes by pRB and E2F1." Cancer Res.
- Fomenko, L. A., M. G. Lomaeva, V. G. Bezlepkin e A. I. Gaziev (2006). "[Genome instability in the F1-progeny of mice irradiated by ionizing radiation as determined by micronucleus assay]." Radiats Biol Radioecol **46**(4): 431-435.
- Frolov, M. V. e N. J. Dyson (2004). "Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2173-2181.
- Fujita, Y., C. Sakakura, K. Shimomura, M. Nakanishi, R. Yasuoka, H. Aragane, A. Hagiwara, T. Abe, J. Inazawa e H. Yamagishi (2003). "Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization." Hepatogastroenterology **50**(54): 1857-1863.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho e W. K. Cavenee (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-2710.
- Galanti, G., T. Fisher, I. Kvetsel, J. Shoham, R. Gallily, R. Mechoulam, G. Lavie, N. Amariglio, G. Rechavi e A. Toren (2008). "Delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells." Acta Oncol **47**(6): 1062-1070.
- Gaston, K. e P. S. Jayaraman (2003). "Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms." Cell Mol Life Sci **60**(4): 721-741.
- Gavrilov, K. e W. M. Saltzman (2012). "Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies." Yale J Biol Med **85**(2): 187-200.
- Giacinti, C. e A. Giordano (2006). "RB and cell cycle progression." Oncogene **25**(38): 5220-5227.

- Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, F. S. Donaires, E. A. Donadi, G. A. S. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2013a). *In silico* analysis of transcription factors associated to differentially expressed genes in irradiated Glioblastoma cell lines. Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. D. T. Lichtor, InTech. (*in press*)
- Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, D. A. R. Magalhães, F. S. Donaires, A. P. Montaldi, P. Nicolucci, E. A. Donadi, G. A. S. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2011). Portrait of transcriptional expression profiles displayed by different glioblastoma cell lines. Molecular Targets of CNS Tumors. M. Garami. Rijeka, InTech. **1**: 277-300.
- Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, D. A. R. Magalhães, F. S. Donaires, P. Nicolucci, E. A. Donadi, G. A. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2013b). "Glioblastoma cell lines differing in TP53 status (mutant or wild-type) display different molecular signaling responses to gamma-irradiation " Submitted.
- Gomez-Manzano, C., W. K. Yung, R. Alemany e J. Fueyo (2004). "Genetically modified adenoviruses against gliomas: from bench to bedside." Neurology **63**(3): 418-426.
- Graham, J. D. e C. L. Clarke (1997). "Physiological action of progesterone in target tissues." Endocr Rev **18**(4): 502-519.
- Grommes, C., G. E. Landreth, M. Sastre, M. Beck, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, U. Schlegel e M. T. Heneka (2006). "Inhibition of *in vivo* glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment." Mol Pharmacol **70**(5): 1524-1533.
- Grunberg, S. M., M. H. Weiss, I. M. Spitz, J. Ahmadi, A. Sadun, C. A. Russell, L. Lucci e L. L. Stevenson (1991). "Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestrone agent mifepristone." J Neurosurg **74**(6): 861-866.
- Hall, E. J. (2000). Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamilton, A. J. e D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 465-503.

- Han, Z., D. Chatterjee, D. M. He, J. Early, P. Pantazis, J. H. Wyche e E. A. Hendrickson (1995). "Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation." Mol Cell Biol **15**(11): 5849-5857.
- Hayashi, N., S. Monzen, K. Ito, T. Fujioka, Y. Nakamura e I. Kashiwakura (2012). "Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells." J Radiat Res **53**(2): 195-201.
- Helin, K., J. A. Lees, M. Vidal, N. Dyson, E. Harlow e A. Fattaey (1992). "A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F." Cell **70**(2): 337-350.
- Ho, M. M., A. V. Ng, S. Lam e J. Y. Hung (2007). "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells." Cancer Res **67**(10): 4827-4833.
- Hoffmann, M., U. S. Schwarz, A. Weigmann, D. Corbeil, A. Hellwig e W. B. Huttner (2013). "A kinetic model for RNA-interference of focal adhesions." BMC Syst Biol **7**(1): 2.
- Hoh, J., S. Jin, T. Parrado, J. Edington, A. J. Levine e J. Ott (2002). "The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8467-8472.
- Horn, H. F. e K. H. Vousden (2007). "Coping with stress: multiple ways to activate p53." Oncogene **26**(9): 1306-1316.
- Hoshino, H., A. Kobayashi, M. Yoshida, N. Kudo, T. Oyake, H. Motohashi, N. Hayashi, M. Yamamoto e K. Igarashi (2000). "Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element." J Biol Chem **275**(20): 15370-15376.
- Iliakis, G., Y. Wang, J. Guan e H. Wang (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing." Oncogene **22**(37): 5834-5847.
- Irwin, M., M. C. Marin, A. C. Phillips, R. S. Seelan, D. I. Smith, W. Liu, E. R. Flores, K. Y. Tsai, T. Jacks, K. H. Vousden e W. G. Kaelin, Jr. (2000). "Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis." Nature **407**(6804): 645-648.
- Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. C. Diserens e E. G. Van Meir (1999). "Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines." Brain Pathol **9**(3): 469-479.

- Iwamoto, M., D. Banerjee, L. G. Menon, A. Jurkiewicz, P. H. Rao, N. E. Kemeny, Y. Fong, S. C. Jhanwar, R. Gorlick e J. R. Bertino (2004). "Overexpression of E2F-1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification." *Cancer Biol Ther* **3**(4): 395-399.
- Jinek, M. e J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* **457**(7228): 405-412.
- Johnson, D. G., W. D. Cress, L. Jakoi e J. R. Nevins (1994). "Oncogenic capacity of the E2F1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12823-12827.
- Jung, H. W. e S. H. Ghil (2010). "A *Torilis japonica* extract exerts anti-proliferative activities on the U87MG human glioblastoma cell line." *Mol Med Report* **3**(6): 1041-1045.
- Kaelin, W. G., Jr., W. Krek, W. R. Sellers, J. A. DeCaprio, F. Ajchenbaum, C. S. Fuchs, T. Chittenden, Y. Li, P. J. Farnham, M. A. Blanar e et al. (1992). "Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties." *Cell* **70**(2): 351-364.
- Kel, A., N. Voss, R. Jauregui, O. Kel-Margoulis e E. Wingender (2006). "Beyond microarrays: find key transcription factors controlling signal transduction pathways." *BMC Bioinformatics* **7 Suppl 2**: S13.
- Kleihues, P. e H. Ohgaki (2000). "Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors." *Toxicol Pathol* **28**(1): 164-170.
- Kotsinas, A., K. Evangelou, P. Zacharatos, C. Kittas e V. G. Gorgoulis (2002). "Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct beta-catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli and G(1)-to S-phase cell-cycle regulators." *Am J Pathol* **161**(5): 1619-1634.
- Kowalik, T. F., J. DeGregori, G. Leone, L. Jakoi e J. R. Nevins (1998). "E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2." *Cell Growth Differ* **9**(2): 113-118.
- Kowalik, T. F., J. DeGregori, J. K. Schwarz e J. R. Nevins (1995). "E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis." *J Virol* **69**(4): 2491-2500.
- Kruszewski, M., M. Wojewodzka, T. Iwanenko, A. R. Collins e I. Szumiel (1998). "Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low dose irradiation. II. Base damage." *Mutat Res* **416**(1 2): 37-57.

- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh e M. B. Kastan (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7491-7495.
- Lai, R., L. J. Medeiros, R. Coupland, A. McCourt e R. K. Brynes (1998). "Immunohistochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lymphomas: a survey of 124 cases." Mod Pathol **11**(5): 457-463.
- Laptenko, O. e C. Prives (2006). "Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities." Cell Death Differ **13**(6): 951-961.
- Lee, B. K., A. A. Bhinge e V. R. Iyer (2011). "Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis." Nucleic Acids Res **39**(9): 3558-3573.
- Lee, C. C., W. S. Chen, C. C. Chen, L. L. Chen, Y. S. Lin, C. S. Fan e T. S. Huang (2012). "TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer." J Biol Chem **287**(4): 2798-2809.
- Lennon, S. V., S. J. Martin e T. G. Cotter (1991). "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli." Cell Prolif **24**(2): 203-214.
- Leung, R. K. e P. A. Whittaker (2005). "RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics." Pharmacol Ther **107**(2): 222-239.
- Li, L., M. Story e R. J. Legerski (2001). "Cellular responses to ionizing radiation damage." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(4): 1157-1162.
- Liao, D. (2009). "Emerging roles of the EBF family of transcription factors in tumor suppression." Mol Cancer Res **7**(12): 1893-1901.
- Lin, H., X. Zhang, G. Cheng, H. F. Tang, W. Zhang, H. N. Zhen, J. X. Cheng, B. L. Liu, W. D. Cao, W. P. Dong e P. Wang (2008). "Apoptosis induced by ardispusilloside III through BAD dephosphorylation and cleavage in human glioblastoma U251MG cells." Apoptosis.
- Lissy, N. A., P. K. Davis, M. Irwin, W. G. Kaelin e S. F. Dowdy (2000). "A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation." Nature **407**(6804): 642-645.

- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black e J. S. Yu (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer **5**: 67.
- Liu, Q., D. H. Nguyen, Q. Dong, P. Shitaku, K. Chung, O. Y. Liu, J. L. Tso, J. Y. Liu, V. Konkankit, T. F. Cloughesy, P. S. Mischel, T. F. Lane, L. M. Liau, S. F. Nelson e C. L. Tso (2009). "Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors." J Neurooncol **94**(1): 1-19.
- Lize, M., S. Pilarski e M. Dobbelstein (2010). "E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis." Cell Death Differ **17**(3): 452-458.
- Lo, H. W., X. Cao, H. Zhu e F. Ali-Osman (2008). "Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators." Clin Cancer Res **14**(19): 6042-6054.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer e P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Massari, M. E. e C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-440.
- Maston, G. A., S. K. Evans e M. R. Green (2006). "Transcriptional regulatory elements in the human genome." Annu Rev Genomics Hum Genet **7**: 29-59.
- Mees, C., J. Nemunaitis e N. Senzer (2009). "Transcription factors: their potential as targets for an individualized therapeutic approach to cancer." Cancer Gene Ther **16**(2): 103-112.
- Milinkovic, V., J. Bankovic, M. Rakic, N. Milosevic, T. Stankovic, M. Jokovic, Z. Milosevic, M. Skender-Gazibara, A. Podolski-Renic, M. Pesic, S. Ruzdijic e N. Tanic (2012). "Genomic instability and p53 alterations in patients with malignant glioma." Exp Mol Pathol **93**(2): 200-206.
- Mitsutake, N., A. Iwao, K. Nagai, H. Namba, A. Ohtsuru, V. Saenko e S. Yamashita (2007). "Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively." Endocrinology **148**(4): 1797-1803.
- Moroni, M. C., E. S. Hickman, E. Lazzerini Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Muller e K. Helin (2001). "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." Nat Cell Biol **3**(6): 552-558.

- Murray, D. e A. J. McEwan (2007). "Radiobiology of systemic radiation therapy." Cancer Biother Radiopharm **22**(1): 1-23.
- Muto, A., H. Hoshino, L. Madisen, N. Yanai, M. Obinata, H. Karasuyama, N. Hayashi, H. Nakauchi, M. Yamamoto, M. Groudine e K. Igarashi (1998). "Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer." Embo J **17**(19): 5734-5743.
- Natarajan, A. T., F. Darroudi, A. N. Jha, M. Meijers e M. Z. Zdzienicka (1993). "Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations." Mutat Res **299**(3-4): 297-303.
- Natkunam, Y., S. Tedoldi, J. C. Paterson, S. Zhao, M. Rodriguez-Justo, A. H. Beck, R. Siebert, D. Y. Mason e T. Marafioti (2009). "Characterization of c-Maf transcription factor in normal and neoplastic hematolymphoid tissue and its relevance in plasma cell neoplasia." Am J Clin Pathol **132**(3): 361-371.
- Natsume, A., S. Kinjo, K. Yuki, T. Kato, M. Ohno, K. Motomura, K. Iwami e T. Wakabayashi (2011). "Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy." Brain Tumor Pathol **28**(1): 1-12.
- Newcomb, E. W., H. Cohen, S. R. Lee, S. K. Bhalla, J. Bloom, R. L. Hayes, D. C. Miller, M. L. Simmons, K. R. Lamborn, M. Takahashi, P. Chen, M. A. Israel, M. S. Berger, T. Godfrey, J. Nigro, M. Prados, S. Chang, F. G. Barker, 2nd e K. Aldape (1998). "Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes." Brain Pathol **8**(4): 655-667.
- O'Donovan, A., D. Scherly, S. G. Clarkson e R. D. Wood (1994). "Isolation of active recombinant XPG protein, a human DNA repair endonuclease." J Biol Chem **269**(23): 15965-15968.
- Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." Neuropathology **25**(1): 1-7.
- Ohka, F., A. Natsume e T. Wakabayashi (2012). "Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme." Neurol Res Int **2012**: 878425.
- Otomo, T., M. Hishii, H. Arai, K. Sato e K. Sasai (2004). "Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes." J Radiat Res (Tokyo) **45**(1): 53-60.
- Pabst, T., B. U. Mueller, P. Zhang, H. S. Radomska, S. Narravula, S. Schnittger, G. Behre, W. Hiddemann e D. G. Tenen (2001). "Dominant-negative mutations of CEBPA,

- encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia." Nat Genet **27**(3): 263-270.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge e G. Draetta (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." Embo J **11**(3): 961-971.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay e P. Pisani (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer **94**(2): 153-156.
- Parr, M. J., Y. Manome, T. Tanaka, P. Wen, D. W. Kufe, W. G. Kaelin, Jr. e H. A. Fine (1997). "Tumor-selective transgene expression in vivo mediated by an E2F-responsive adenoviral vector." Nat Med **3**(10): 1145-1149.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu e K. W. Kinzler (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**(5897): 1807-1812.
- Pastink, A., J. C. Eeken e P. H. Lohman (2001). "Genomic integrity and the repair of double strand DNA breaks." Mutat Res **480** **481**: 37-50.
- Perry, J., M. Okamoto, M. Guiou, K. Shirai, A. Errett e A. Chakravarti (2012). "Novel therapies in glioblastoma." Neurol Res Int **2012**: 428565.
- Petrocca, F., R. Visone, M. R. Onelli, M. H. Shah, M. S. Nicoloso, I. de Martino, D. Iliopoulos, E. Pilozzi, C. G. Liu, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L. P. Ruco, G. Baldassarre, C. M. Croce e A. Vecchione (2008). "E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer." Cancer Cell **13**(3): 272-286.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan e L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Pierce, A. M., R. Schneider-Broussard, I. B. Gimenez-Conti, J. L. Russell, C. J. Conti e D. G. Johnson (1999). "E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model." Mol Cell Biol **19**(9): 6408-6414.
- Polivka, J., Jr., J. Polivka, V. Rohan, O. Topolcan e J. Ferda (2012). "New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme." Anticancer Res **32**(7): 2935-2946.

- Polyak, K., J. Y. Kato, M. J. Solomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts e A. Koff (1994). "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." Genes Dev **8**(1): 9-22.
- Postma, C., M. A. HermSEN, J. Coffa, J. P. Baak, J. D. Mueller, E. Mueller, B. Bethke, J. P. Schouten, M. Stolte e G. A. Meijer (2005). "Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon." J Pathol **205**(4): 514-521.
- Prise, K. M., G. Schettino, M. Folkard e K. D. Held (2005). "New insights on cell death from radiation exposure." Lancet Oncol **6**(7): 520-528.
- Qin, J., X. Chen, X. Xie, M. J. Tsai e S. Y. Tsai (2010). "COUP-TFII regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(8): 3687-3692.
- Qin, X. Q., D. M. Livingston, W. G. Kaelin e P. D. Adams (1994). "Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10918-10922.
- Rainov, N. G., K. U. Dobberstein, H. Bahn, H. J. Holzhausen, C. Lautenschlager, V. Heidecke e W. Burkert (1997). "Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival." J Neurooncol **35**(1): 13-28.
- Rappa, G., J. Mercapide, F. Anzanello, L. Prasmickaite, Y. Xi, J. Ju, O. Fodstad e A. Lorico (2008). "Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets." Exp Cell Res **314**(10): 2110-2122.
- Ravanpay, A. C. e J. M. Olson (2008). "E protein dosage influences brain development more than family member identity." J Neurosci Res **86**(7): 1472-1481.
- Reifenberger, G. e V. P. Collins (2004). "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas." J Mol Med **82**(10): 656-670.
- Riballo, E., M. Kuhne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo e M. Lobrich (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci." Mol Cell **16**(5): 715-724.
- Riemenschneider, M. J., T. H. Koy e G. Reifenberger (2004). "Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas." Acta Neuropathol **107**(3): 277-282.

- Robertson, G., M. Bilenky, K. Lin, A. He, W. Yuen, M. Dagpinar, R. Varhol, K. Teague, O. L. Griffith, X. Zhang, Y. Pan, M. Hassel, M. C. Sleumer, W. Pan, E. D. Pleasance, M. Chuang, H. Hao, Y. Y. Li, N. Robertson, C. Fjell, B. Li, S. B. Montgomery, T. Astakhova, J. Zhou, J. Sander, A. S. Siddiqui e S. J. Jones (2006). "cisRED: a database system for genome-scale computational discovery of regulatory elements." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D68-73.
- Roninson, I. B., E. V. Broude e B. D. Chang (2001). "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells." *Drug Resist Updat* **4**(5): 303-313.
- Sakamoto-Hojo, E. T., S. S. Mello, C. L. Bassi, I. M. Merchi, P. O. Carminati, A. L. Fachin, E. A. Donadi e G. A. S. Passos (2005). Genomic Instability:Signaling Pathways Orchestrating the Responses to Ionizing Radiation and Cisplatin. *Genome Dynamics and Stability*. D. H. Lankenau. Heidelberg, Springer Berlin / Heidelberg. **1**: 1861-3381.
- Sakamoto-Hojo, E. T., S. S. Mello, E. Pereira, A. L. Fachin, R. S. Cardoso, C. M. Junta, P. Sandrin Garcia, E. A. Donadi e G. A. S. Passos (2003). "Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress." *Mutat Res* **544**(2 3): 403-413.
- Sathornsumetee, S., D. A. Reardon, A. Desjardins, J. A. Quinn, J. J. Vredenburgh e J. N. Rich (2007). "Molecularly targeted therapy for malignant glioma." *Cancer* **110**(1): 13-24.
- Sbisa, E., D. Catalano, G. Grillo, F. Licciulli, A. Turi, S. Liuni, G. Pesole, A. De Grassi, M. F. Caratozzolo, A. M. D'Erchia, B. Navarro, A. Tullo, C. Saccone e A. Gisel (2007). "p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data." *BMC Bioinformatics* **8 Suppl 1**: S20.
- Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel e E. F. Wagner (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." *Genes Dev* **13**(5): 607-619.
- Schrell, U. M., E. F. Adams, R. Fahlbusch, R. Greb, G. Jirikowski, R. Prior e F. J. Ramalho-Ortigao (1990). "Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 1: Female sex steroid receptors and their significance as specific markers for adjuvant medical therapy." *J Neurosurg* **73**(5): 743-749.
- Sen, M., S. M. Thomas, S. Kim, J. I. Yeh, R. L. Ferris, J. T. Johnson, U. Duvvuri, J. Lee, N. Sahu, S. Joyce, M. L. Freilino, H. Shi, C. Li, D. Ly, S. Rapireddy, J. P. Etter, P. K. Li, L. Wang, S. Chiosea, R. R. Seethala, W. E. Gooding, X. Chen, N. Kaminski, K. Pandit, D. E. Johnson e J. R. Grandis (2012). "First-in-Human Trial of a STAT3

- Decoy Oligonucleotide in Head and Neck Tumors: Implications for Cancer Therapy." Cancer Discov **2**(8): 694-705.
- Shan, B. e W. H. Lee (1994). "Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis." Mol Cell Biol **14**(12): 8166-8173.
- Shan, B., X. Zhu, P. L. Chen, T. Durfee, Y. Yang, D. Sharp e W. H. Lee (1992). "Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F." Mol Cell Biol **12**(12): 5620-5631.
- Shaulian, E. e M. Karin (2001). "AP 1 in cell proliferation and survival." Oncogene **20**(19): 2390-2400.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-168.
- Shu, H. K., C. M. Julin, F. Furman, G. L. Yount, D. Haas Kogan e M. A. Israel (2000). "Overexpression of E2F1 in glioma derived cell lines induces a p53 independent apoptosis that is further enhanced by ionizing radiation." Neuro Oncol **2**(1): 16-21.
- Shu, H. K., M. M. Kim, P. Chen, F. Furman, C. M. Julin e M. A. Israel (1998). "The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14453-14458.
- Simmons, M. L., K. R. Lamborn, M. Takahashi, P. Chen, M. A. Israel, M. S. Berger, T. Godfrey, J. Nigro, M. Prados, S. Chang, F. G. Barker, 2nd e K. Aldape (2001). "Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients." Cancer Res **61**(3): 1122-1128.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire e P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano e P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Slupphaug, G., B. Kavli e H. E. Krokan (2003). "The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage." Mutat Res **531**(1-2): 231-251.

- Smeenk, L., S. J. van Heeringen, M. Koeppel, M. A. van Driel, S. J. Bartels, R. C. Akkers, S. Denissov, H. G. Stunnenberg e M. Lohrum (2008). "Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response." *Nucleic Acids Res* **36**(11): 3639-3654.
- Smith, J. S., I. Tachibana, S. M. Passe, B. K. Huntley, T. J. Borell, N. Iturria, J. R. O'Fallon, P. L. Schaefer, B. W. Scheithauer, C. D. James, J. C. Buckner e R. B. Jenkins (2001). "PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme." *J Natl Cancer Inst* **93**(16): 1246-1256.
- Strakova, N., J. Ehrmann, J. Bartos, J. Malikova, J. Dolezel e Z. Kolar (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors." *Neoplasma* **52**(2): 126-136.
- Struhl, K. (2001). "Gene regulation. A paradigm for precision." *Science* **293**(5532): 1054-1055.
- Stupp, R., M. E. Hegi, M. R. Gilbert e A. Chakravarti (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." *J Clin Oncol* **25**(26): 4127-4136.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer e R. O. Mirimanoff (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* **352**(10): 987-996.
- Suh, S. S., J. Y. Yoo, G. J. Nuovo, Y. J. Jeon, S. Kim, T. J. Lee, T. Kim, A. Bakacs, H. Alder, B. Kaur, R. I. Aqeilan, F. Pichiorri e C. M. Croce (2012). "MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma multiforme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(14): 5316-5321.
- Sussman, C. R., J. E. Davies e R. H. Miller (2002). "Extracellular and intracellular regulation of oligodendrocyte development: roles of Sonic hedgehog and expression of E proteins." *Glia* **40**(1): 55-64.
- Suzuki, M. e D. A. Boothman (2008). "Stress-induced Premature Senescence (SIPS)." *J Radiat Res (Tokyo)*.
- Suzuki, T., W. Yasui, H. Yokozaki, K. Naka, T. Ishikawa e E. Tahara (1999). "Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas." *Int J Cancer* **81**(4): 535-538.

- Thomas, M. C. e C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(3): 105-178.
- Thorne, J. L., M. J. Campbell e B. M. Turner (2009). "Transcription factors, chromatin and cancer." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 164-175.
- Tian, X., J. Ye, M. Alonso-Basanta, S. M. Hahn, C. Koumenis e J. F. Dorsey (2011). "Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." J Biol Chem **286**(33): 29408-29416.
- Toledo, F. e G. M. Wahl (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." Nat Rev Cancer **6**(12): 909-923.
- Tribius, S., A. Pidel e D. Casper (2001). "ATM protein expression correlates with radioresistance in primary glioblastoma cells in culture." Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(2): 511-523.
- Turenne, G. A., P. Paul, L. Laflair e B. D. Price (2001). "Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N terminal serine residues of p53." Oncogene **20**(37): 5100-5110.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani e G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.
- Uittenbogaard, M. e A. Chiaramello (2002). "Expression of the bHLH transcription factor Tcf12 (ME1) gene is linked to the expansion of precursor cell populations during neurogenesis." Brain Res Gene Expr Patterns **1**(2): 115-121.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm e S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." Nucleic Acids Res.
- Veliceasa, D., F. T. Schulze-Hoepfner e O. V. Volpert (2008). "PPARgamma and Agonists against Cancer: Rational Design of Complementation Treatments." PPAR Res **2008**: 945275.
- Veprintsev, D. B. e A. R. Fersht (2008). "Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA." Nucleic Acids Res **36**(5): 1589-1598.
- Vousden, K. H. e D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 275-283.

- Wang, H., P. Iakova, M. Wilde, A. Welm, T. Goode, W. J. Roesler e N. A. Timchenko (2001). "C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4." Mol Cell **8**(4): 817-828.
- Wang, X. T., Y. B. Xie e Q. Xiao (2011). "Lentivirus-mediated RNA interference targeting E2F-1 inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth in vivo." Exp Mol Med **43**(11): 638-645.
- Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig e W. B. Huttner (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12425-12430.
- Wells, J., P. S. Yan, M. Cechvala, T. Huang e P. J. Farnham (2003). "Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase." Oncogene **22**(10): 1445-1460.
- Wieser, R. (2007). "The oncogene and developmental regulator EVI1: expression, biochemical properties, and biological functions." Gene **396**(2): 346-357.
- Wingender, E., X. Chen, R. Hehl, H. Karas, I. Liebich, V. Matys, T. Meinhardt, M. Pruss, I. Reuter e F. Schacherer (2000). "TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation." Nucleic Acids Res **28**(1): 316-319.
- Wu, K. e B. Bonavida (2009). "The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs." Crit Rev Immunol **29**(3): 241-254.
- Wu, X. e A. J. Levine (1994). "p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3602-3606.
- Xie, Y., Y. Yin, L. Li, Y. Ma e Q. Xiao (2009). "Short interfering RNA directed against the E2F-1 gene suppressing gastric cancer progression in vitro." Oncol Rep **21**(5): 1345-1353.
- Xu, Y. e D. Baltimore (1996). "Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control." Genes Dev **10**(19): 2401-2410.
- Yamasaki, L., T. Jacks, R. Bronson, E. Goillot, E. Harlow e N. J. Dyson (1996). "Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1." Cell **85**(4): 537-548.

- Yang, G., R. Zhang, X. Chen, Y. Mu, J. Ai, C. Shi, Y. Liu, L. Sun, N. G. Rainov, H. Li, B. Yang e S. Zhao (2011). "MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status." *J Mol Med (Berl)* **89**(10): 1037-1050.
- Yeo, H. C., T. T. Beh, J. J. Quek, G. Koh, K. K. Chan e D. Y. Lee (2011). "Integrated transcriptome and binding sites analysis implicates E2F in the regulation of self-renewal in human pluripotent stem cells." *PLoS ONE* **6**(11): e27231.
- Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney e D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-5012.
- Yoon, K. e R. C. Smart (2004). "C/EBPalpha is a DNA damage-inducible p53-regulated mediator of the G1 checkpoint in keratinocytes." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10650-10660.
- Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black e J. S. Yu (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." *Oncogene* **23**(58): 9392-9400.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp e D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." *Cell* **101**(1): 25-33.
- Zhang, Z., H. Wang, G. Prasad, M. Li, D. Yu, J. A. Bonner, S. Agrawal e R. Zhang (2004). "Radiosensitization by antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in vitro and in vivo human cancer models." *Clin Cancer Res* **10**(4): 1263-1273.
- Zhao, H. e H. Piwnica Worms (2001). "ATR mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1." *Mol Cell Biol* **21**(13): 4129-4139.
- Zhao, L. Y., Y. Niu, A. Santiago, J. Liu, S. H. Albert, K. D. Robertson e D. Liao (2006). "An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis." *Cancer Res* **66**(19): 9445-9452.

# **ANEXOS**

---

## **ANEXO 1: Publicações**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

BASSI, C., MELLO, S., CARDOSO, R., GODOY, P., FACHIN, A., JUNTA, C., SANDRINI-GARCIA, P., CARLOTTI, C., FALCAO, R., DONADI, E. A., PASSOS, G., SAKAMOTO-HOJO, E.T. Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation. *Human & Experimental Toxicology*. v.27, p.919 - 929, 2008.

BRASSESCO, M.S., XAVIER, D.J., CAMPAROTO, M.L., MONTALDI, A.P., DE GODOY, P.R.D.V., SCRIDELEI, C.A., TONE, L.G., SAKAMOTO-HOJO, E.T. CytogeneticInstability in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Print). , v.2011, p.1 - 9, 2011.

### **Artigo em preparação**

DONAIRES, F. S., P.R.D.V. GODOY, G.S. LEANDRO, ESPÓSITO, D.A., PUTHIER, D., SAKAMOTO-HOJO, E.T. Transcriptional factors associated to over-expressed genes in glioblastoma multiforme, as predicted by in silico analysis on publicly microarray dataset, 2013.

### **Artigos submetidos**

Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, D. A. R. Magalhães, F. S. Donaires, P. Nicolucci, E. A. Donadi, G. A. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo (2013). "Glioblastoma cell lines differing in TP53 status (mutant or wild-type) display different molecular signaling responses to gamma-irradiation " Submetido (ANEXO 4)

### **Capítulos de livro**

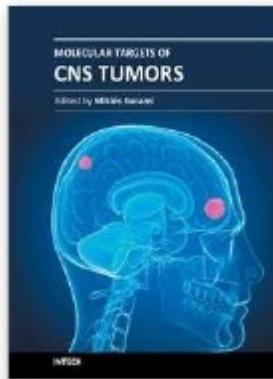
Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, D. A. R. Magalhães, F. S. Donaires, A. P. Montaldi, P. Nicolucci, E. A. Donadi, G. A. S. Passos e E. T. Sakamoto-HojoPortrait of transcriptional expression profiles displayed by different glioblastoma cell lines. in: M Garami. (ed.) Molecular Targets of CNS Tumors. Rijeka: InTech; 2011. p. 277-300 (ANEXO 2).

Godoy, P. R. D. V., S. S. Mello, F. S. Donaires, E. A. Donadi, G. A. S. Passos e E. T. Sakamoto-Hojo. In silico analysis of transcription factors associated to differentially expressed genes in irradiated Glioblastoma cell lines. in: DT Lichtor. (ed.) Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. InTech; 2013. (*in press*). (ANEXO 3)

Carminati, P. O., F. S. Donaires, P. R. D. V. Godoy, A. P. Montaldi, G. A. S. Passos, J. A. Meador, A. S. Balajee e E. T. Sakamoto-Hojo (2013). DNA-PK is a potential molecular therapeutic target for glioblastoma. in: DT Lichtor. (ed.) Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. InTech; 2013. (*in press*)

## **ANEXO 2 – Capítulo de livro:**

Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines



### **Molecular Targets of CNS Tumors**

Edited by Dr. Miklos Garami

ISBN 978-953-307-736-9

Hard cover, 674 pages

**Publisher** InTech

**Published online** 22, September, 2011

**Published in print edition** September, 2011

Molecular Targets of CNS Tumors is a selected review of Central Nervous System (CNS) tumors with particular emphasis on signaling pathway of the most common CNS tumor types. To develop drugs which specifically attack the cancer cells requires an understanding of the distinct characteristics of those cells. Additional detailed information is provided on selected signal pathways in CNS tumors.

### **How to reference**

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Paulo R. D. V. Godoy, Stephano S. Mello, Daniele A. Magalhães, Flavia S. Donaires, Ana P. Lima-Montaldi, Patricia Nicolucci, Eduardo A. Donadi, Geraldo A. S. Passos and Elza T. Sakamoto-Hojo (2011). Portrait of Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines, Molecular Targets of CNS Tumors, Dr. Miklos Garami (Ed.), ISBN: 978-953-307-736-9, InTech, Available from:  
<http://www.intechopen.com/books/molecular-targets-of-cns-tumors/portrait-of-transcriptional-expression-profiles-displayed-by-different-glioblastoma-cell-lines>

# 12

## Portrait of Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines

Paulo R. D. V. Godoy et al.<sup>1</sup>

*University of São Paulo,  
Brazil*

### 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is among the most lethal of all human tumors, with the average survival of approximately 1 year from diagnosis (Avgeropoulos and Batchelor, 1999). In glioblastomas, LOH 10q is the most frequent genetic alteration (69%), followed by EGFR amplification (34%), TP53 mutations (31%), p16INK4a deletion (31%), and PTEN mutations (24%) (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Treatments of patients with GBM include surgery, radiotherapy and parallel adjuvant chemotherapy (Stupp et al., 2005). While radiotherapy has been found to significantly prolong survival rates for GBM patients, a poor prognosis and radioresistance are typical characteristics of this disease (Stupp et al., 2007).

The antitumoral drug Temozolomide (TMZ) constitutes, in combination with radiotherapy, the current standard of care for glioblastoma (Stupp et al., 2005). However, the action of TMZ may be counteracted in tumors by the expression of the DNA repair enzyme MGMT, which repairs TMZ-induced DNA lesions (Hegi et al., 2005). MGMT activity and resistance to TMZ were highly correlated, indicating that MGMT is a major predictor of response to TMZ in glioma cells (Hermisson et al., 2006). According to the authors, collectively, MGMT expression and TP53 status may become valuable parameters to predict cell responses to TMZ treatment in patients with GBM. Modulation of MSH6, PARP1 and NTL1, DNA repair genes involved in mismatch repair and base excision repair (BER), were found at transcription and protein levels in GBM cells resistant to TMZ (Zhang et al., 2010).

Other genotoxic agents exert different effects in GBM cells with different TP53 status. UV light (UV-C) (Batista et al., 2009) and chloroethylating agents (ACNU and BCNU) (Batista et al., 2007), significantly induce apoptosis in TP53-mutated glioma cells, while WT TP53 cells are more sensitive to methylating agents, including TMZ (Hermisson et al., 2006; Roos et al., 2007).

Efforts have been made to overcome drug and radio-resistance of GBM cells, but the heterogeneity of these tumors seems to be critical, and molecular analysis is an important tool to elucidate the mechanisms underlying cellular responses to antitumoral agents. Recently, application of genome-scale methodologies has opened the opportunity to study

<sup>1</sup> Stephano S. Mello, Daniele A. Magalhães, Flavia S. Donaires, Ana P. Lima-Montaldi, Patricia Nicolucci, Eduardo A. Donadi, Geraldo A. S. Passos and Elza T. Sakamoto-Hojo

transcript profiles for thousands of genes simultaneously, thus providing a picture on how different biological processes can be modulated under irradiation, drug treatment or even between different cell types, on the basis of the lists of differentially expressed genes (either induced or repressed genes) provided by the microarray experiments. This approach allows comparisons between different biological situations (Tusher et al., 2001; Sakamoto-Hojo et al., 2003; Fachin et al., 2007; Fachin et al., 2009). In a previous work, several stress response/DNA repair genes, such as *HSPA9B*, *INPP5A*, *PIP5K1A*, *FANCG*, and *TPP2* were found up-regulated in U343MG-a GBM cells analyzed at 6 h following irradiation with 1 Gy, reflecting the radio-resistance of these cells; at this condition, the survival rate was 61%, and a broad spectrum of other biological processes was found associated to the list of differentially expressed genes in irradiated cells (Bassi et al., 2008).

*TP53* gene plays a role in drug and radioresistance mechanisms, but the complex network of signaling pathways involving this gene is not well elucidated. *TP53* is a multifunctional protein that acts in cell cycle blockage and signaling pathways towards DNA repair, contributing to the maintenance of genome integrity in response to a variety of genotoxic stresses (Bartussek et al., 1999). Alternatively, *TP53* protein triggers a cascade of signaling pathways culminating in apoptosis, depending on the extent of DNA damage (Prise et al., 2005). The *TP53* protein is also a transcription factor that regulates the expression of a large number of target genes (Vogelstein et al., 2000). Many *TP53* target genes have been described (el-Deiry, 1998; Horn and Vousden, 2007; Laptenco and Prives, 2006; Sbisa et al., 2007), and some other targets have been computationally predicted by the analysis of their binding sites (Hoh et al., 2002; Smeenk et al., 2008; Veprintsev and Fersht, 2008).

According to the literature data, there are controversial findings about the outcome of patients in relation to the *TP53* status of tumors; this gene may positive or negatively influences the cell radioresistance, as well as it can exert no influence in cellular responses to therapies (McIlwraith et al., 1994; Slichenmyer et al., 1993; Smith et al., 1995).

## 2. Objective

In the present work, we aim to compare gene expression profiles displayed by four GBM cell lines in the absence of any kind of treatment, using the microarray method, looking for molecular signatures that can provide new clues towards the understanding of GBM biology and radioresistance mechanisms. The results on the transcriptional profiles presented by a number of genes with different biological functions are discussed on the light of literature data regarding GBM cell responses to ionizing radiation and antitumor drugs, generally provided by survival assays.

## 3. Materials and methods

### 3.1 GBM cell lines

Human GBM U343 MG-a cell line was kindly donated by Dr. James T. Rutka (The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Center, Canada), while T98G, U251MG, and U87MG were supplied by the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). T98G and U251MG cell lines harbor three mutations (*TP53*, *CDKN2A*, and *PTEN*) while U343MG-a and U87MG cells are wild-type (WT) for *TP53*, and mutant (MT) for *CDKN2A* and *PTEN* genes (Ishii et al., 1999).

### 3.2 Cell culture and total RNA extraction

For gene expression analysis, cells were thawed from the nitrogen and sub-cultured for four passages in the presence of HAM F10 + DEM medium plus 15% fetal bovine serum and kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After the fourth sub-culturing, they were incubated for two days, and total RNA extraction was performed in replicate at 48 h, by using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNA samples was evaluated by denaturing agarose gel electrophoresis under standard conditions. To remove the contaminating DNA, RNA samples used in cDNA microarrays were treated with the Deoxyribonuclease I (Amplification Grade kit, Invitrogen), according to manufacturer's instructions.

### 3.3 cDNA microarray method

Four experiments in duplicate using GBM cells were carried out using a glass slide microarray containing 4500 clones of cDNA probe (in duplicates) from the human IMAGE Consortium cDNA library [<http://image.llnl.gov/image/>; kindly provided by Dr. Catherine Nguyen (INSERM-CNRS, Marseille, France)], and prepared according to the protocol described by Hegde et al (2000).

Microarrays were spotted onto glass slides (Corning) using a Generation III Array Spotter Amersham-Molecular Dynamics according to the manufacturer's instructions. Each cDNA sample was spotted twice on the slide (duplicate spots). The cDNA complex probes were prepared using the CyScribe Post Labelling Kit (Amersham Biosciences, England) (Fachin et al., 2009). Hybridizations were carried out using an automatic system (Automatic Slide Processor, Amersham Biosciences, England) and signals were immediately captured after the final wash procedure, using a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences, England).

In an attempt to characterize the clones present in the array slide, the gene set was submitted to the NIH-DAVID bioinformatic tool, in order to obtain biological functions associated with the gene sequences present in the arrays, as well as the number of genes associated with each biological process. Among all clones, 2334 were identified by official gene symbol (HUGO), distributed in classes according to biological processes (Table 1).

#### 3.3.1 Data acquisition and gene expression analysis

The image quantification was performed using the Spot software, (<http://spot.cmis.csiro.au/spot/>, CSIRO, Australia). Filtering, normalization and data analysis were done using the R statistical environment (Ihaka and Gentleman, 1996), in addition to Limma (Smyth et al., 2005), Bioconductor (Ihaka and Gentleman, 1996), Aroma (Bengtsson, 2004) and KTH (Wirta, 2004). The background to each feature was subtracted from the foreground value. Furthermore, the spots were evaluated by their circularity and calculations on the median versus mean deviation, so that those presenting irregular circularity, or with large differences between mean and median values, were considered unreliable. The raw data (red - R and green - G) was transformed into MA format before normalization, where M = log<sub>2</sub>(R/G) and A = 1/2 × log<sub>2</sub>(R × G). These procedures were followed by the application of the Print-tip Lowess normalization for each slide. Following the normalization procedure, microarray data were exported to tab-delimited tables in MEV format and analyzed in MEV (v. 3.1) software (Saeed et al., 2003). The microarrays data analysis involved the application of the statistical method SAM - Significance Analysis of

GOTERM-BIOLOGICAL PROCESS - FAT	%	PValue
GO:0007242~intracellular signaling cascade	10.28	3.90E-09
GO:0006793~phosphorus metabolic process	9.43	8.50E-16
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	6.73	6.81E-13
GO:0008104~protein localization	6.68	2.00E-04
GO:0042981~regulation of apoptosis	6.47	1.20E-05
GO:0007049~cell cycle	5.96	2.63E-04
GO:0033554~cellular response to stress	5.78	1.27E-11
GO:0006259~DNA metabolic process	4.50	4.42E-06
GO:0006974~Response to DNA damage stimulus	4.07	5.32E-10
GO:0006281~DNA repair	3.43	8.95E-11
GO:0007243~protein kinase cascade	3.43	1.53E-05
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	3.08	1.04E-04
GO:0009314~response to radiation	1.93	5.82E-04
GO:0000165~MAPKKK cascade	1.89	1.69E-04
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	1.41	4.85E-04
GO:0006310~DNA recombination	1.29	9.19E-05
GO:0031344~regulation of cell projection organization	1.11	2.05E-04
GO:0006302~double-strand break repair	0.94	3.35E-05
GO:0006289~nucleotide-excision repair	0.86	5.76E-05
GO:0050770~regulation of axonogenesis	0.81	3.26E-04
GO:0051291~protein heterooligomerization	0.77	2.99E-04
GO:0050772~positive regulation of axonogenesis	0.51	1.85E-04
GO:0000723~telomere maintenance	0.51	6.05E-04
GO:0032925~regulation of activin receptor signaling pathway	0.30	7.62E-04

Table 1. Percentage of genes for each biological process analyzed for a total of 2334 genes

present in a glass slide microarray. The array gene set (containing 4300 image clones) was submitted to NIH-DAVID (Dennis et al. 2003).

Microarray (Tusher et al., 2001), with the objective to compare MT versus WT *TP53* cell lines in terms of expression profiles. We used FDR< 0.68% to select only highly significant differentially expressed genes.

Information regarding biological functions were obtained at S.O.U.R.C.E. (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/source>), and NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gene functional groups were given by DAVID tool (Dunne et al., 2003),

choosing *Homo sapiens* as the current background, Gene Ontology: GOTERM\_BP\_FAT as parameters, and Functional Annotation Chart as the analyzing tool. The main biological functions associated to the list of differentially expressed genes were selected.

Every modulated gene was compared to a list of previously identified genes with TP53 binding sites using genome-wide tiling Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip approach (Smeenk et al., 2008) or (ChIP) with the paired-end ditag (PET) (Wei et al., 2006) in order to point out genes that could be modulated by TP53 transactivation.

## 4. Results

### 4.1 Transcript profiles displayed by GBM cell lines

#### 4.1.1 Hierarchical cluster analysis

Gene expression profiles studied by the cDNA microarray method generated interesting results about the transcriptional profiles exhibited by each cell line. Analysis of gene cluster uses standard statistical algorithms in order to arrange genes according to similarity of expression patterns, and the results can be graphically represented (Eisen et al., 1998). The analysis of hierarchical clustering was performed to compare MT and WT TP53 cells regarding transcript profiles by using a set of genes previously selected by the SAM analysis. The results of the hierarchical clustering showed that MT TP53 cells were grouped apart from the WT TP53 cells. The mutant cell lines (T98G and U251) were not separated within a gene cluster, indicating more similarity in the basal transcription levels between cell lines; in contrast, the proficient cell lines (U87 and U343) were clustered apart from each other (Fig.1).

#### 4.1.2 Differentially expressed genes indicated by Significant Analysis of Microarrays (SAM)

The statistical analysis performed by SAM indicated that MT TP53 cell lines showed 29 down-regulated and 68 up-regulated genes, compared with WT TP53 cells, for FDR  $\leq 0.68\%$ . For this small list of highly significant differentially expressed genes, the magnitude of fold-changes ranged from -1.68 to +1.93 by comparing MT *versus* WT TP53 (Supp. Table 1).

For the list of differentially expressed genes, biological gene functions were studied by the DAVID-NIH bioinformatic tool (Dennis et al., 2003; Huang da et al., 2009). Out of 97 modulated genes, 73 were suitable for functional grouping procedure, since 10 genes were not grouped and 14 I.D. clones were still unknown. The most relevant categories (represented by a variable number of genes) were related to neurological system process (11%), regulation of apoptosis (10%), cellular response to stress (8%), regulation of cell proliferation (8%), cell-cell adhesion (5%), DNA repair (5%), response to ionizing radiation (4%), histone modification (4%), cell division (4%), etc. (Fig.2.). For discussion, we selected 36 genes on the basis of biological functions that can be possibly related to responses to genotoxic agents (Table-2), in order to find out clues for understanding the mechanisms underlying the sensitivity or resistance to anticancer therapies. Some of candidate genes that may participate in chemo- and/or radioresistance are involved in stress responses (*RUVBL2*, *ASNS*, *RNF8*, *LIG4* and *CAV1*) and cell adhesion (*CDH8*, *CDH13*, *CD93* and *ITGA5*), and other important categories, such as regulation of cell proliferation (*IGF1R*, *CDH13*, *CAV1*, *DUSP22*, *ADAMTS1*, *LIG4*) and apoptosis (*IGF1R*, *CDH13*, *IFT57*, *CRH*, *HSPB1*, *ASNS* and *LIG4*.

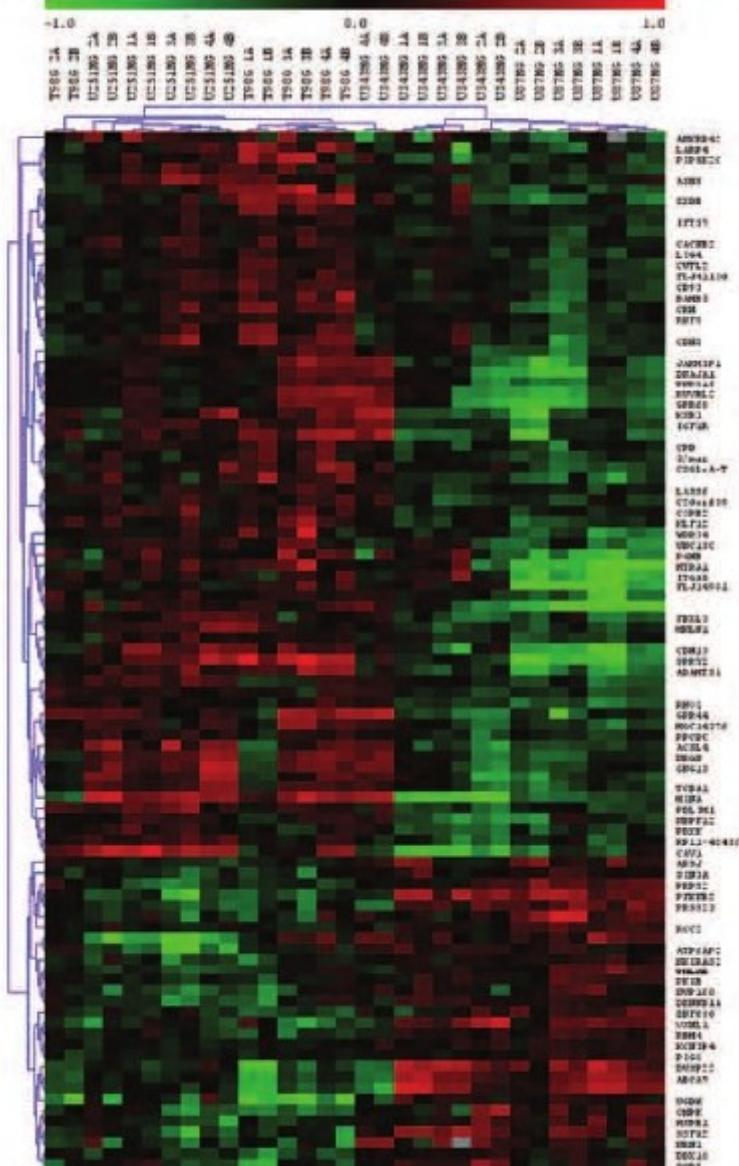


Fig. 1. Hierarchical clustering obtained for a gene set previously selected by the SAM method ( $FDR \leq 0.68\%$ ) for the results displayed by four GBM cell lines (T98G, U251MG, U343MG-a e U87MG), under normal proliferation in culture. The data set was provided by 4 experiments in duplicate. Experiments are represented by numbers (1-4) and the replicates are represented by letters (A and B). The expression level of each gene is represented according to the scale at the top (red indicates induction; green means repression; grey color represents data loss).

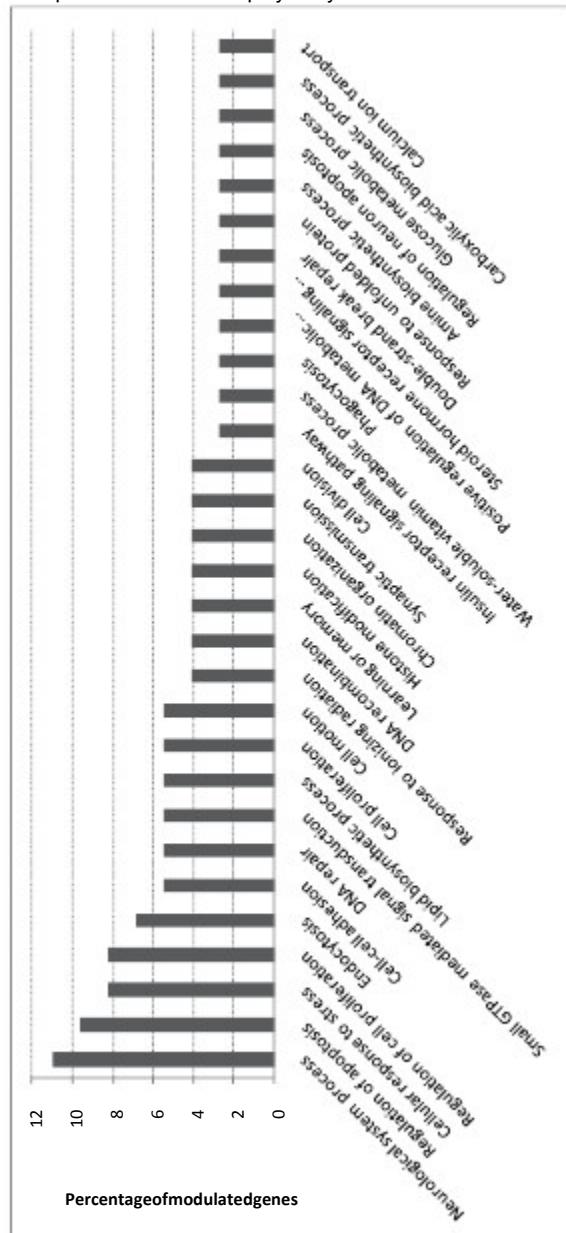


Fig. 2. Main Biological functions associated to the list of differentially expressed genes (out of 97 genes, 73 genes were recognized by the system) when comparing MT and WT TP53 GBM cell lines. The results were analyzed by DAVID-NIH (Dennis et al., 2003; Huang da et al., 2009) as a bioinformatic tool to group differentially expressed genes according to their functions.

A comparative analysis of differentially expressed genes (obtained by SAM) was carried out with previously identified genes with *TP53* binding sites using ChIP-PET and ChIP-on-chip analysis (Smeenk et al., 2008; Wei et al., 2006). When comparing with ChIP- PET gene lists, we observed only one common gene (*LASS6*), while the comparison involving the gene list of our work with the ChIP-on-chip list, we found five common genes (*ARSJ*, *RCC2*, *CDH8*, *CDH13* and *HTRA1*).

## 5. Discussion

Expression profiles displayed by GBM cells provided results to compare these cells with other tumor types (Castells et al., 2010; Castells et al., 2009; Dreyfuss et al., 2009; Marucci et al., 2008; Reddy et al., 2008), normal tissues (Sallinen et al., 2000), or even regions in the same tumor (Mehrian Shai et al., 2005). However, there is no data in the literature comparing transcript profiles of GBM cell lines presenting similar genetic background. While T98G and U251MG harbor mutations for *TP53*, *CDKN2A*, and *PTEN*, U343MG-a and U87MG cell lines differ from others by the presence of a known WT *TP53* (Ishii et al., 1999). Expression profiles displayed by GBM cell lines were studied in the absence of any treatment. The hierarchical clustering analysis compared WT and MT *TP53* GBM cells regarding transcript profiles using a set of highly significant differentially expressed genes previously selected by SAM (FDR ≤ 0.68%). The results showed distinct expression profiles for WT *TP53* and MT *TP53* cells, whose patterns separate the mutant from WT cells. The mutant cell lines (T98G and U251MG) were not completely separated from each other within the cluster, indicating similarity of transcript patterns between the two cell lines. In contrast, *TP53* proficient cell lines (U87MG and U343MG-a) were clustered apart from each other. These results indicate the potential of the DNA microarray analysis to discriminate molecular profiles displayed by GBM cell lines presenting similar mutational background for *CDKN2A* and *PTEN* genes, but with different *TP53* status.

The statistical analysis performed by SAM (FDR ≤ 0.68%) indicated that MT *TP53* cell lines showed 28 down-regulated and 66 up-regulated genes, when compared to WT *TP53* cells (Table. 2). For the list of differentially expressed genes, biological gene functions were studied by the DAVID-NIH bioinformatic tool (Dennis et al., 2003; Huang da et al., 2009), and several biological processes were associated to the list of significant differentially expressed genes, such as: metabolism, response to ionizing radiation, cell adhesion, cell motion, apoptosis, DNA repair and transcription.

In addition, metabolic process was directly related with several biological functions as follow: insulin receptor signalling, water soluble vitamin metabolic process, steroid hormone receptor signalling, cellular response to nutrient levels, amine biosynthetic process, lipid biosynthetic process, calcium ion transport, lipid transport, glucose metabolic process, carboxylic acid biosynthetic process, and cellular amino acid derivative metabolic process. Other gene functions related to learning/memory, regulation of neuron apoptosis, synaptic transmission, and neurological system processes are intrinsic to the neural nature of GBM cells. DNA and RNA metabolism/regulation were also associated to several differentially expressed genes (Table. 2).

Three genes (*RNF8*, *CAV1* and *LIG4*) playing roles in ionizing radiation responses were found up-regulated in MT *TP53* cells, and this feature may influence the responsiveness to radiotherapy. It is already known that ionizing radiation causes DNA double-strand breaks (DSBs) that are highly cytotoxic lesions. Cells have a complex DNA-damage response that

Portrait of Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines 273

Symbol	CloneID	Biological Process	Fold change	q-value (%)
SPRY2	40262	cell-cell signaling, development, organogenesis, regulation of signal transduction	1.93	0.00
CAV1	24651	cellular calcium ion homeostasis, cholesterol efflux, response to gamma radiation, regulation of apoptosis,	1.86	0.00
CDH13	31093	cell adhesion, homophilic cell adhesion	1.61	0.00
HTRA1	132044	proteolysis and peptidolysis, regulation of cell growth	1.55	0.00
ADAMTS1	34684	integrin-mediated signaling pathway, negative regulation of cell proliferation, heart trabecula formation, kidney development, ovulation from ovarian follicle, proteolysis	1.54	0.00
ITGA5	135671	cell-matrix adhesion, integrin-mediated signaling pathway	1.35	0.75
GPR68	22652	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, inflammatory response, signal transduction	1.34	0.00
GPR44	25625	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, immune response, calcium-mediated signaling, chemotaxis	1.34	0.75
RUVBL2	22267	chromatin modification, DNA recombination, DNA repair, regulation of growth, regulation of transcription	1.33	0.00
MKLN1	33715	cell motility, cell-matrix adhesion, signal transduction	1.31	0.00
KSR1	220655	Ras protein signal transduction, intracellular signaling cascade, protein amino acid phosphorylation	1.31	0.75
GNG13	178213	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transduction	1.30	0.75
CDH8	38939	cell adhesion, homophilic cell adhesion	1.30	0.00
DNAJA1	24473	protein folding, response to unfolded protein	1.28	0.75
RHOQ	131061	small GTPase mediated signal transduction	1.26	0.00
FBXL3	25778	protein ubiquitination	1.26	0.00
CRH	34671	immune response, learning and/or memory, pregnancy, signal transduction, synaptic transmission	1.24	0.00
IGF1R	21519	axonogenesis, brain development, exocrine pancreas development, male sex determination, regulation of apoptosis	1.24	0.00
ASNS	27208	amino acid biosynthesis	1.23	0.90
CD93	35503	cell-cell adhesion, macrophage activation, phagocytosis	1.19	0.00
COPB2	24627	intracellular protein transport, vesicle-mediated transport	1.18	0.00
CACNB2	34651	Synaptic transmission, ion transport	1.16	0.71
LASS6	35147	lipid biosynthetic process, regulation of transcription, DNA-dependent	1.15	0.75
LIG4	39274	single strand break repair	1.14	0.75
RNF8	39161	protein ubiquitination	1.14	0.00

Symbol	CloneID	Biological Process	Fold change	q-value (%)
KCNIP4	21478	ion transport	-1.13	0.00
RCC2	136887	cell cycle, cell division, mitosis	-1.14	0.90
RBM4	141446	DNA recombination, DNA repair, DNA replication, estrogen receptor signaling pathway, glucocorticoid receptor signaling pathway, mRNA splicing	-1.19	0.00
DENND1A	21467	synaptic vesicle endocytosis	-1.21	0.74
HSPB1	23827	cell death, response to heat	-1.23	0.00
ARSJ	32854	Unknown	-1.24	0.00
ATP6AP2	131821	angiotensin maturation, positive regulation of transforming growth factor-beta1 production, regulation of MAPKK cascade	-1.29	0.00
UGDH	139835	UDP-glucose metabolism, electron transport	-1.41	0.00
DUSP22	182999	apoptosis, cell proliferation, development, inactivation of MAPK, protein amino acid dephosphorylation	-1.55	0.00
PFKFB2	53158	glucose catabolic process, positive regulation of insulin secretion, pyruvate metabolic process	-1.68	0.00

Table 2. List of highly significant differentially expressed genes provided by SAM (FDR ≤0.68%), comparing MT and WT TP53 GBM cell lines. Positive fold-change value means up-regulation, while negative fold-change value means down-regulation in MT TP53 cells, compared to WT TP53 cells.

includes the spatial reorganization of DSB repair and signalling proteins into subnuclear structures surrounding DSB sites (Bartek and Lukas, 2007; Maser et al., 1997). In this context, RNF8 protein is an important component of the DNA damage response; it can be recruited to the DNA damage sites, thus triggering the formation of ubiquitin conjugates, promoting the recruitment of important proteins to DSB sites, thereby enhancing DNA-damage checkpoint events (G2/M) and guaranteeing cell survival (Kolas et al., 2007). There is also evidence that RNF8 participates in histone ubiquitylation and protects the genome integrity by licensing the DSB-flanking chromatin to concentrate repair factors near the DNA lesions (Mailand et al., 2007). LIG4 is also a key protein playing role in DSB repair by non-homologous end joining (NHEJ) pathway (Helleday et al., 2007), while CAV1 presents a tumor suppressor function in non-neoplastic tissue, being down-regulated upon transformation, but re-expressed upon progression in metastatic and multidrug-resistant tumors (Burgermeister et al., 2008). CAV1 was also associated with multidrug resistance (Belanger et al., 2004; Belanger et al., 2003), and radioresistance (Barzan et al., 2010; Cordes et al., 2007; Li et al., 2005).

In MT TP53 cells, other stress response genes (*RUVBL2* and *ASNS*) were up-regulated, while *RBM4* was down-regulated. *RUVBL2* participates in chromatin-remodelling (Lee et al., 2010), which could also let the lesion available to DNA repair genes. *ASNS* is a gene whose response elements function as an enhancer to mediate the transcriptional activation of the gene, either by the amino acid response (AAR) or the unfolded protein response (UPR pathway), triggered by amino acid limitation or endoplasmic reticulum stress (Siu et al.,

2002), respectively. These pathways initiate a wide array of adaptive mechanisms and ultimately, if necessary, programmed cell death (Harding et al., 2003; Zinszner et al., 1998); The role of *RBM4* in response to stress stimulus is the activation of internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation, promoting the expression of stress-response genes; therefore, the down-regulation of *RBM4* in MT *TP53* cells might compromise the translational regulation of stress-associated mRNAs (Markus and Morris, 2009).

Several genes playing roles in cell adhesion were also differentially expressed in GBM cell lines, and this result is in accordance with the association of these genes in acquired chemo- and radioresistance (Kraus et al., 2002). In the present work, three cadherins (*CDH8*, *CDH13* and *CD93*), and one integrin *ITGA5* were found up-regulated in MT *TP53* cells, relatively to WT counterparts. Cadherins are integral membrane proteins that mediate calcium-dependent cell-cell adhesion. They may play an important role in the development and maintenance of tissues, and possibly are involved in the invasion and metastasis of malignant tumors. While *CDH8* participates in neural circuitry, *CD93* is involved in phagocytosis (Bohlson et al., 2005), *CDH13* play a role in apoptosis (Chan et al., 2008), and *ITGA5* in cell spreading (Fang et al., 2010).

A comparative analysis of differentially expressed genes (provided by SAM) was performed with previously identified genes with *TP53* binding sites; this comparison was possible by using ChIP-PET and ChIP-on-chip analyses (Smeenk et al., 2008; Wei et al., 2006). For the ChIP-PET gene lists, we observed only one common gene (*LASS6*), which was up-regulated in MT *TP53* cells. *LASS6* is a ceramide sintase, producing ceramides that have antiproliferative and pro-apoptotic effects (Ruvolo, 2003). This gene plays a role in apoptosis induction in colon cancer cells (Schiffmann et al., 2010), and enhanced tumor development and growth *in vivo* in human head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) (Senkal et al., 2010).

In addition, the comparison involving our modulated gene list, comparing MT and WT *TP53* GBM cells, using the ChIP-on-chip list, provided five common genes: *ARSJ*, *RCC2*, *CDH8*, *CDH13* and *HTRA1*). While *CDH8*, *CDH13* and *HTRA1* were up-regulated, *ARSJ* and *RCC2* were down-regulated in MT *TP53* cells. *CDH8* and *CDH13* are cadherins and were already discussed as possible targets to chemo- and radioresistance (Kraus et al., 2002). *HTRA1* is a tumor suppressor-like factor when overexpressed in cancer cell lines. (Baldi et al., 2002; Chien et al., 2004). This gene was also associated to cisplatin therapy responses in various cancer types (Catalano et al., 2011; Chien et al., 2006; Komatsu et al., 2006). These genes cannot be transactivated by *TP53*, according to the *TP53* status in T98G and U251MG cells. However, the majority of the genome-wide *TP53* target sites can also be bounded by overexpressed p63 and p73 *in vivo*, suggesting that they may possibly play an important role at *TP53* binding sites (Smeenk et al., 2008). *ARSJ* and *RCC2* genes were not described to be related with stress responses or cancer, and were up-regulated in WT *TP53* GBM cells, compared to MT, and probably, they can be associated to transactivation properties of *TP53*.

Thus, in the present work, most genes involved in stress responses (*RUVBL2*, *ASNS*, *RNF8*, *LIG4* and *CAV1*), cell adhesion (*CDH8*, *CDH13*, *CD93* and *ITGA5*), and genes associated to p63 and p73 binding sites (*LASS6* and *HTRA1*) were up-regulated in MT *TP53* cells. At least some of them may have the potential to be directly involved in radio- or chemoresistance. Therefore, the loss of *TP53* function may compromise cellular responses to anticancer agents.

It is already known that mechanisms underlying the cellular radiosensitivity seem to vary among different cell lineages, but at what extent the radiosensitivity depends on *TP53* function is a matter of investigation since long time ago. Several authors demonstrated that the loss of *TP53* function decreases the sensitivity of GBM cells to irradiation (Bartussek et al., 1999; McIlwraith et al., 1994; Roy et al., 2006; Yount et al., 1996), and the same was observed for other tumor types (Fan et al., 1994; Komarova et al., 1997; Merritt et al., 1994). However, in primary gliomas, the *TP53* mutation confers an improved prognosis in adult glioma patients due to a better response to radiation therapy (Tada et al., 1998). This is consistent with the results obtained in *in vitro* studies, in which glioma cells lacking WT *TP53* function were more susceptible to radiation-induced apoptosis than their isogenic counterparts expressing WT *TP53* (Hara et al., 2004).

It is important to emphasize that all these articles in the literature took into account the *TP53* status, but not other mutations inherent to GBM. In the present work, we studied four GBM cell lines with different *TP53* status; T98G and U251MG are mutated and U343MG-a and U87MG are wild-type for *TP53* gene, but they are similar regarding the fact that they harbor mutations for *CDKN2A* and *PTEN*, according to Ishi et al. (1999). In experiments on cell survival performed by the clonogenic survival assay, the results provided by several authors indicated that MT *TP53* cells were, in general, more radioresistant than WT *TP53* cells (Bassi et al., 2008; Chautard et al., 2010; de la Pena et al., 2006; Lee et al., 2006; Roy et al., 2006).

As described above, several differentially expressed genes provided by the comparison between MT *versus* WT *TP53* GBM cells are involved in the mechanism of resistance to ionizing radiation and/or multidrug resistance. In general, cytotoxicity of DNA damaging agents correlates with the induction of DSB, which can be produced directly or indirectly into the DNA molecule. Whereas ionizing radiation induces DSB directly, the drug TMZ generates DSB only after two or more cycles of DNA replication, as a secondary effect (Caporali et al., 2004). Therefore, *TP53* mutation has the potential to change the sensitivity of GBM cells to anticancer agents currently used in therapy, and probably, the changes in the expression profiles exhibited by several genes acting down-stream in the signalling cascade of damage responses may compromise the outcome of drug- and radio- therapies. In order to understand these alterations in terms of transcript profiles, we are currently studying at what extent *TP53* status influences gene expression profiles in irradiated GBM cells (*manuscript in preparation*); we found several differentially expressed genes in irradiated MT *TP53* cells that are probably implicated in tumor resistance; among them, we can mention *CLSTN2*, *ROBO2*, and *BMPR1B* (with role in cell-cell adhesion), *BTRC*, *CYP26B1*, and *ANLN* (cell cycle regulators).

However, the data in the literature regarding the role of *TP53* in mediating sensitivity to anticancer agents still present controversies. It has been reported that the absence of a functional *TP53* increases TMZ sensitivity in glioma cell lines, an effect that is independent of MGMT status (Blough et al., 2011). Glioma cell lines that did not express a functional *TP53* were significantly more sensitive to TMZ than cell lines that were functionally intact for *TP53* expression (Blough et al., 2011). An example of this inconsistency comes from the results obtained with T98G cell line (MT *TP53*), in with the role of MGMT in mediating TMZ resistance was confirmed by the co-exposure to the MGMT inhibitor O6-BG, causing a reduction in the EC50, as evaluated by the clonogenic survival assay (Hermisson et al.,

2006). Nevertheless, the roles of *TP53* in terms of its influence on drug sensitivity are difficult to elucidate, since the dependence on the cell type, and the kind of antitumor agent used(Fukushima et al., 2009). In addition, the genetic background is also critical, since GBM cells often harbor other mutations for cell cycle regulator genes, and other tumor suppressor genes, as already mentioned for the four GBM cell lines studied in the present work, which carry two other mutations (*CDKN2A* and *PTEN*).

The control of cell proliferation is very critical in the tumor development, and may also be influenced by the *TP53* status (Facoetti et al., 2008). Several genes playing roles in the regulation of cell proliferation were found differentially expressed in MT *TP53* cells, relatively to WT: *IGFR1*, *CDH13*, *DUSP22*, *ADAMTS1*, *CAV1*, and *LIG4*. These last two genes also play a role in stress responses, as mentioned before.

Tumor growth also depends on the rate of apoptosis (Amirlak and Couldwell, 2003), and apoptosis is directly involved in gliomagenesis and resistance towards classical genotoxic approaches in cancer therapy. It has been reported that GBM cells are virtually resistant to different apoptotic stimuli (Adamson et al., 2009; Eisele and Weller, 2011), but the mechanisms underlying these responses are still unclear, and may depend on several treatment conditions and type of genotoxic agent. In the present work, the list of differentially expressed genes also indicated several genes implicated in apoptosis. Those genes, such as *IGF1R*, *CDH13*, *IFT57*, *CRH*, *HSPB1* and *ASNS*, were up-regulated in MT *TP53* GBM cells, relatively to WT cells. *IGF1R* participates in cell proliferation and protection of cell death (Trojan et al., 2007), while *CDH13*, *IFT57*, *CRH* and *ASNS* participates in apoptosis induction (Andreeva and Kutuzov, 2010; Chan et al., 2008; Gdynia et al., 2008; Gervais et al., 2002; Minas et al., 2007; Siu et al., 2002). Considering that the ability of cells to undergo apoptosis is dependent of a complex signaling cascade involving pro- and anti-apoptotic genes, among other gene classes, the up-regulation of several apoptosis related genes in MT *TP53* cells might influence responses of GBM cells submitted to anticancer agents.

In this work, we showed some distinct transcript profiles for MT and WT *TP53* GBM cells, pointing out several genes that might influence cell sensitivity to chemo- and/or radiotherapy.

## 6. Conclusions

The present data comparing transcript profiles displayed by GBM cell lines with different *TP53* status showed that several biological processes were associated to the list of highly significant differentially expressed genes. Gene classes associated with those genes (stress response, DNA repair, proliferation, cell division, cell adhesion, apoptosis, etc) provided a picture on transcript profiles under normal conditions of cell proliferation in cultured GBM cell lines. However, these gene classes reflect wide amplitude of cellular processes that might be involved in cellular defense mechanisms under conditions of cell injury provoked by irradiation or drug treatment. These results support the hypothesis that MT *TP53* cells might be more resistant than WT *TP53* cells to some genotoxic stresses, such as ionizing radiation and TMZ. While this hypothesis still should be tested, altogether, the information obtained in this work provides a relevant basic contribution towards the understanding of GBM responses to therapies, and for designing novel therapeutic strategies for patients with GBM, based on their *TP53* status, but also considering other gene mutations.

**7. Supplementary data**

Symbol	Gene Name	CloneID	Fold change	q-value (%)
SPRY2	Sprouty homolog 2 (Drosophila)	40262	1.93	0.00
CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	24651	1.86	0.00
MINA	MYC induced nuclear antigen	139217	1.79	0.00
	Clone 25220 mRNA sequence	25220	1.63	0.00
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)	31093	1.61	0.00
HTRA1	HtrA serine peptidase 1	132044	1.55	0.00
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	34684	1.54	0.00
MPND	MPN domain containing	24532	1.39	0.00
ARRB1	Arrestin, beta 1	21814	1.38	0.00
ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	133988	1.36	0.00
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	135671	1.35	0.75
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	132702	1.34	0.00
GPR68	G protein-coupled receptor 68	22652	1.34	0.00
GPR44	G protein-coupled receptor 44	25625	1.34	0.75
PDLM1	PDZ and LIM domain 1	135689	1.33	0.00
RUVBL2	RuvB-like 2 (E. coli)	22267	1.33	0.00
	In multiple ClusterIDs	261714	1.32	0.00
	Unknown	134004	1.32	0.00
ZXDB	Zinc finger, X-linked, duplicated B	38972	1.31	0.90
MKLN1	Muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	33715	1.31	0.00
LARP4	La ribonucleoprotein domain family, member 4	41347	1.31	0.71
KSR1	Kinase suppressor of ras 1	220655	1.31	0.75
JAKMIP1	Janus kinase and microtubule interacting protein 1	32109	1.30	0.00

Portrait of Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines 279

GNG13	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13	178213	1.30	0.75
ANKRD42	mRNA; cDNA DKFZp761C0524 (from clone DKFZp761C0524)	30094	1.30	0.00
CDH8	cadherin 8, type 2	38939	1.30	0.00
NRGN	Neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	178825	1.30	0.75
USP53	Ubiquitin specific peptidase 53	142468	1.30	0.69
PIP5K2C	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma	133173	1.30	0.75
WDR34	WD repeat domain 34	133474	1.29	0.00
TCBA1	Na+/K+ transporting ATPase interacting 2	41427	1.29	0.00
MGC14376	Chromosome 17 open reading frame 91	24659	1.28	0.00
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	24473	1.28	0.75
KLF12	Kruppel-like factor 12	34367	1.28	0.00
UNC13C	unc-13 homolog C ( <i>C. elegans</i> )	22137	1.27	0.00
RHOQ	Ras homolog gene family, member Q	131061	1.26	0.00
FBXL3	F-box and leucine-rich repeat protein 3	25778	1.26	0.00
RP11-484I6.3	Chromosome 13 open reading frame 27	24463	1.25	0.00
	Unknown	132487	1.25	0.75
CRH	Corticotropin releasing hormone	34671	1.24	0.00
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	21519	1.24	0.00
ASNS	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	27208	1.23	0.90
CSGlcA-T	Chondroitin polymerizing factor 2	39955	1.23	0.75
NBPF12	Neuroblastoma breakpoint family, member 1	24976	1.23	0.90
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	41406	1.22	0.00
PDXK	Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	25360	1.22	0.00
	Transcribed locus	136399	1.21	0.75
TNRC15	Transcribed locus	37482	1.21	0.75

280

## Molecular Targets of CNS Tumors

	Calneuron 1	39092	1.20	0.75
3-Mar	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	24707	1.20	0.00
	Unknown	39306	1.19	0.69
CD93	CD93 molecule	35503	1.19	0.00
C20orf39	Transmembrane protein 90B	35704	1.19	0.00
	In multiple ClusterIDs	41186	1.19	0.71
	CXXC finger protein 5	136782	1.18	0.00
PPCDC	Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	135984	1.18	0.00
COPB2	Clone 24627 mRNA sequence	24627	1.18	0.00
	CDNA FLJ34038 fis, clone FCBBF2005645	38618	1.18	0.00
FLJ41130	hypothetical LOC401113	40009	1.18	0.00
CPD	Carboxypeptidase D	40521	1.18	0.75
	Unknown	34967	1.16	0.90
CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	34651	1.16	0.71
CUTL2	Cut-like homeobox 2	41354	1.16	0.90
	Unknown	34966	1.15	0.00
LASS6	LAG1 homolog, ceramide synthase 6	35147	1.15	0.75
LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent	39274	1.14	0.75
RNF8	Ring finger protein 8	39161	1.14	0.00
IFT57	Intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)	34942	1.12	0.00
PIGO	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	21678	-1.12	0.71
KCNIP4	Kv channel interacting protein 4	21478	-1.13	0.00
RCC2	Regulator of chromosome condensation 2	136887	-1.16	0.90
PKIB	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	152289	-1.17	0.00
DDX18	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	149416	-1.17	0.00
SIN3A	SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)	26455	-1.18	0.00

## Portrait of Transcriptional Expression Profiles Displayed by Different Glioblastoma Cell Lines 281

RBM4	RNA binding motif protein 4	141446	-1.19	0.00
NKIRAS2	NFKB inhibitor interacting Ras-like 2	137971	-1.20	0.00
DENND1A	DENN/MADD domain containing 1A	21467	-1.21	0.74
TMLHE	Trimethyllysine hydroxylase, epsilon	21457	-1.22	0.00
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	23827	-1.23	0.00
ZNF630	Zinc finger protein 630	141069	-1.24	0.00
ARSJ	Arylsulfatase family, member J	32854	-1.24	0.00
NUP160	Nucleoporin 160kDa	33299	-1.25	0.00
SCP2	Sterol carrier protein 2	137004	-1.26	0.68
NRN1	Neuritin 1	140197	-1.28	0.00
ATP6AP2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 2	131821	-1.29	0.00
PRPS2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	146194	-1.32	0.00
	Transcribed locus, weakly similar to XP_933787.2 PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	53331	-1.34	0.00
PRSS23	Protease, serine, 23	143887	-1.35	0.00
CMPK	Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	140570	-1.36	0.00
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	139835	-1.41	0.00
VSNL1	Visinin-like 1	26570	-1.42	0.00
	Transcribed locus	139645	-1.44	0.00
SSFA2	Sperm specific antigen 2	140589	-1.45	0.00
ABCA7	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	182933	-1.45	0.00
	Unknown	181796	-1.54	0.00
DUSP22	Dual specificity phosphatase 22	182999	-1.55	0.00
PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	53158	-1.68	0.00

Table 1. List of significantly modulated genes provided by the statistical analysis by SAM (FDR ≤0.68%), comparing MT versus WT TP53 GBM cell lines.

## 8. Acknowledgment

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo), proc. nº: 04/15611-6, 06/01947-8 and 01953-8/06; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior); and FAEPA - HC FMRP/USP (Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência).

## 9. References

- Adamson, C., Kanu, O. O., Mehta, A. I., Di, C., Lin, N., Mattox, A. K., and Bigner, D. D. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 18, 1061-1083.
- Amirlak, B., and Couldwell, W. T. (2003). Apoptosis in glioma cells: review and analysis of techniques used for study with focus on the laser scanning cytometer. *J Neurooncol* 63, 129-145.
- Andreeva, A. V., and Kutuzov, M. A. (2010). Cadherin 13 in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 775-790.
- Avgeropoulos, N. G., and Batchelor, T. T. (1999). New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 4, 209-224.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D. M., Albini, A., et al. (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21, 6684-6688.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 238-245.
- Bartussek, C., Naumann, U., and Weller, M. (1999). Accumulation of mutant p53(V143A) modulates the growth, clonogenicity, and radiochemosensitivity of malignant glioma cells independent of endogenous p53 status. *Exp Cell Res* 253, 432-439.
- Barzan, D., Maier, P., Zeller, W. J., Wenz, F., and Herskind, C. (2010). Overexpression of caveolin-1 in lymphoblastoid TK6 cells enhances proliferation after irradiation with clinically relevant doses. *Strahlenther Onkol* 186, 99-106.
- Bassi, C., Mello, S., Cardoso, R., Godoy, P., Fachin, A., Junta, C., Sandrin-Garcia, P., Carlotti, C., Falcao, R., Donadi, E., et al. (2008). Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol* 27, 919-929.
- Batista, L. F., Roos, W. P., Christmann, M., Menck, C. F., and Kaina, B. (2007). Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 67, 11886-11895.
- Batista, L. F., Roos, W. P., Kaina, B., and Menck, C. F. (2009). p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res* 7, 237-246.
- Belanger, M. M., Gaudreau, M., Roussel, E., and Couet, J. (2004). Role of caveolin-1 in etoposide resistance development in A549 lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 3, 954-959.

- Belanger, M. M., Roussel, E., and Couet, J. (2003). Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells. *Anticancer Drugs* 14, 281-287.
- Blough, M. D., Beauchamp, D. C., Westgate, M. R., Kelly, J. J., and Cairncross, J. G. (2011). Effect of aberrant p53 function on temozolomide sensitivity of glioma cell lines and brain tumor initiating cells from glioblastoma. *J Neurooncol* 102, 1-7.
- Bohlson, S. S., Zhang, M., Ortiz, C. E., and Tenner, A. J. (2005). CD93 interacts with the PDZ domain-containing adaptor protein GIPC: implications in the modulation of phagocytosis. *J Leukoc Biol* 77, 80-89.
- Burgermeister, E., Liscovitch, M., Rocken, C., Schmid, R. M., and Ebert, M. P. (2008). Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett* 268, 187-201.
- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M. T., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'Atri, S. (2004). DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol* 66, 478-491.
- Castells, X., Acebes, J. J., Boluda, S., Moreno-Torres, A., Pujol, J., Julia-Sape, M., Candiota, A. P., Arino, J., Barcelo, A., and Arus, C. (2010). Development of a predictor for human brain tumors based on gene expression values obtained from two types of microarray technologies. *OMICS* 14, 157-164.
- Castells, X., Garcia-Gomez, J. M., Navarro, A., Acebes, J. J., Godino, O., Boluda, S., Barcelo, A., Robles, M., Arino, J., and Arus, C. (2009). Automated brain tumor biopsy prediction using single-labeling cDNA microarrays-based gene expression profiling. *Diagn Mol Pathol* 18, 206-218.
- Catalano, V., Mellone, P., d'Avino, A., Shridhar, V., Staccioli, M. P., Graziano, F., Giordani, P., Rossi, D., Baldelli, A. M., Alessandroni, P., et al. (2011). HtrA1, a potential predictor of response to cisplatin-based combination chemotherapy in gastric cancer. *Histopathology*.
- Chan, D. W., Lee, J. M., Chan, P. C., and Ng, I. O. (2008). Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 123, 1043-1052.
- Chautard, E., Loubeau, G., Tchirkov, A., Chassagne, J., Vermot-Desroches, C., Morel, L., and Verrelle, P. (2010). Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro Oncol* 12, 434-443.
- Chien, J., Aletti, G., Baldi, A., Catalano, V., Muretto, P., Keeney, G. L., Kalli, K. R., Staub, J., Ehrmann, M., Cliby, W. A., et al. (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 116, 1994-2004.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S. I., Erickson-Johnson, M. R., Couch, F. J., Smith, D. I., Crowl, R. M., Kaufmann, S. H., and Shridhar, V. (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636-1644.
- Cordes, N., Frick, S., Brunner, T. B., Pilarsky, C., Grutzmann, R., Sipos, B., Kloppel, G., McKenna, W. G., and Bernhard, E. J. (2007). Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene* 26, 6851-6862.
- de la Pena, L., Burgan, W. E., Carter, D. J., Hollingshead, M. G., Satyamitra, M., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2006). Inhibition of Akt by the alkylphospholipid perifosine does not enhance the radiosensitivity of human glioma cells. *Mol Cancer Ther* 5, 1504-1510.

- Dreyfuss, J. M., Johnson, M. D., and Park, P. J. (2009). Meta-analysis of glioblastoma multiforme versus anaplastic astrocytoma identifies robust gene markers. *Mol Cancer* 8, 71.
- Eisele, G., and Weller, M. (2011). Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. *Cancer Lett.*
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8, 345-357.
- Facoetti, A., Ranza, E., and Nano, R. (2008). Proliferation and programmed cell death: role of p53 protein in high and low grade astrocytoma. *Anticancer Res* 28, 15-19.
- Fan, S., el-Deiry, W. S., Bae, I., Freeman, J., Jondle, D., Bhatia, K., Fornace, A. J., Jr., Magrath, I., Kohn, K. W., and O'Connor, P. M. (1994). p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 54, 5824-5830.
- Fang, Z., Yao, W., Xiong, Y., Zhang, J., Liu, L., Li, J., Zhang, C., and Wan, J. (2010). Functional elucidation and methylation-mediated downregulation of ITGA5 gene in breast cancer cell line MDA-MB-468. *J Cell Biochem* 110, 1130-1141.
- Fukushima, T., Takeshima, H., and Kataoka, H. (2009). Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer Res* 29, 4845-4854.
- Gdynia, G., Lehmann-Koch, J., Sieber, S., Tagscherer, K. E., Fassl, A., Zentgraf, H., Matsuzawa, S., Reed, J. C., and Roth, W. (2008). BLOC1S2 interacts with the HIPPI protein and sensitizes NCH89 glioblastoma cells to apoptosis. *Apoptosis* 13, 437-447.
- Gervais, F. G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Metzler, M., Hackam, A. S., Tam, J., Vaillancourt, J. P., Houtzager, V., et al. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* 4, 95-105.
- Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. (2004). p53-Independent ceramide formation in human glioma cells during gamma-radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11, 853-861.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.
- Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C., and Engelward, B. P. (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6, 923-935.
- Hermission, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., and Weller, M. (2006). O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status

- predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* 96, 766-776.
- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A. J., and Ott, J. (2002). The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8467-8472.
- Horn, H. F., and Vousden, K. H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306-1316.
- Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318, 1637-1640.
- Komarova, E. A., Chernov, M. V., Franks, R., Wang, K., Armin, G., Zelnick, C. R., Chin, D. M., Bacus, S. S., Stark, G. R., and Gudkov, A. V. (1997). Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *Embo J* 16, 1391-1400.
- Komatsu, M., Hiyama, K., Tanimoto, K., Yunokawa, M., Otani, K., Ohtaki, M., Hiyama, E., Kigawa, J., Ohwada, M., Suzuki, M., et al. (2006). Prediction of individual response to platinum/paclitaxel combination using novel marker genes in ovarian cancers. *Mol Cancer Ther* 5, 767-775.
- Kraus, A. C., Ferber, I., Bachmann, S. O., Specht, H., Wimmel, A., Gross, M. W., Schlegel, J., Suske, G., and Schuermann, M. (2002). In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 21, 8683-8695.
- Laptenko, O., and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13, 951-961.
- Lee, J. S., Kim, Y., Kim, I. S., Kim, B., Choi, H. J., Lee, J. M., Shin, H. J., Kim, J. H., Kim, J. Y., Seo, S. B., et al. (2010). Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Mol Cell* 39, 71-85.
- Lee, Y. J., Chung, D. Y., Lee, S. J., Ja Jhon, G., and Lee, Y. S. (2006). Enhanced radiosensitization of p53 mutant cells by oleamide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 1466-1474.
- Li, J., Hassan, G. S., Williams, T. M., Minetti, C., Pestell, R. G., Tanowitz, H. B., Frank, P. G., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2005). Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. *Cell Cycle* 4, 1817-1825.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887-900.
- Markus, M. A., and Morris, B. J. (2009). RBM4: a multifunctional RNA-binding protein. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 740-743.
- Marucci, G., Morandi, L., Magrini, E., Farnedi, A., Franceschi, E., Miglio, R., Calo, D., Pession, A., Foschini, M. P., and Eusebi, V. (2008). Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20. *Virchows Arch* 453, 599-609.

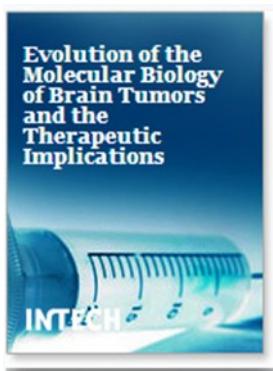
- Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E., and Petrini, J. H. (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double strand breaks. *Mol Cell Biol* 17, 6087-6096.
- McIlwraith, A. J., Vasey, P. A., Ross, G. M., and Brown, R. (1994). Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 54, 3718-3722.
- Mehrian Shai, R., Reichardt, J. K., Ya-Hsuan, H., Kremen, T. J., Liau, L. M., Cloughesy, T. F., Mischel, P. S., and Nelson, S. F. (2005). Robustness of gene expression profiling in glioma specimen samplings and derived cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 136, 99-103.
- Merritt, A. J., Potten, C. S., Kemp, C. J., Hickman, J. A., Balmain, A., Lane, D. P., and Hall, P. A. (1994). The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 54, 614-617.
- Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S. N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaidis, E. A., Fountzilas, G., Chroulos, G. P., et al. (2007). Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br J Cancer* 97, 637-645.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 479-489.
- Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M., and Held, K. D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 6, 520-528.
- Reddy, S. P., Britto, R., Vinnakota, K., Aparna, H., Sreepathi, H. K., Thota, B., Kumari, A., Shilpa, B. M., Vrinda, M., Umesh, S., et al. (2008). Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res* 14, 2978-2987.
- Roos, W. P., Batista, L. F., Naumann, S. C., Wick, W., Weller, M., Menck, C. F., and Kaina, B. (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 26, 186-197.
- Roy, K., Wang, L., Makrigiorgos, G. M., and Price, B. D. (2006). Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 821-826.
- Ruvolo, P. P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47, 383-392.
- Sallinen, S. L., Sallinen, P. K., Haapasalo, H. K., Helin, H. J., Helen, P. T., Schraml, P., Kallioniemi, O. P., and Kononen, J. (2000). Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 60, 6617-6622.
- Sbisa, E., Catalano, D., Grillo, G., Licciulli, F., Turi, A., Liuni, S., Pesole, G., De Grassi, A., Caratozzolo, M. F., D'Erchia, A. M., et al. (2007). p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data. *BMC Bioinformatics* 8 Suppl 1, S20.
- Schiffmann, S., Ziebell, S., Sandner, J., Birod, K., Deckmann, K., Hartmann, D., Rode, S., Schmidt, H., Angioni, C., Geisslinger, G., and Grosch, S. (2010). Activation of

- ceramide synthase 6 by celecoxib leads to a selective induction of C16:0-ceramide. *Biochem Pharmacol* 80, 1632-1640.
- Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Bielawski, J., Hannun, Y. A., and Ogretmen, B. (2010). Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J* 24, 296-308.
- Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H., and Kilberg, M. S. (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 277, 24120-24127.
- Slichenmyer, W. J., Nelson, W. G., Slebos, R. J., and Kastan, M. B. (1993). Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 53, 4164-4168.
- Smeenk, L., van Heeringen, S. J., Koeppel, M., van Driel, M. A., Bartels, S. J., Akkers, R. C., Denissov, S., Stunnenberg, H. G., and Lohrum, M. (2008). Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Res* 36, 3639-3654.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053-1059.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gilbert, M. R., and Chakravarti, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25, 4127-4136.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
- Tada, M., Matsumoto, R., Iggo, R. D., Onimaru, R., Shirato, H., Sawamura, Y., and Shinohe, Y. (1998). Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring p53 mutations. *Cancer Res* 58, 1793-1797.
- Trojan, J., Cloix, J. F., Ardourel, M. Y., Chatel, M., and Anthony, D. D. (2007). Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience* 145, 795-811.
- Veprintsev, D. B., and Fersht, A. R. (2008). Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Res* 36, 1589-1598.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wei, C. L., Wu, Q., Vega, V. B., Chiu, K. P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H. C., Fu, Y., Weng, Z., et al. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124, 207-219.
- Yount, G. L., Haas-Kogan, D. A., Vidair, C. A., Haas, M., Dewey, W. C., and Israel, M. A. (1996). Cell cycle synchrony unmasks the influence of p53 function on radiosensitivity of human glioblastoma cells. *Cancer Res* 56, 500-506.

- Zhang, J., Stevens, M. F., Laughton, C. A., Madhusudan, S., and Bradshaw, T. D. (2010). Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology* 78, 103-114.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12, 982-995.

**ANEXO 3 – Capítulo de livro (*in press*):**

*In silico* Analysis of Transcription Factors Associated to Differentially Expressed Genes in  
Irradiated Glioblastoma Cell Lines



EVOLUTION OF THE MOLECULAR BIOLOGY OF BRAIN TUMORS AND THE  
THERAPEUTIC IMPLICATIONS

ISBN 978-953-51-0989-1

Book edited by:

Dr. Terry Lichtor

# ***In silico analysis of transcription factors associated to differentially expressed genes in irradiated Glioblastoma cell lines***

Godoy, P. R. D. V

*Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

Mello, S. S.

*Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

Donaires, F. S.

*Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

Donadi, E. A.

*Department of Medic Clinic, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

Passos, G. A. S

*Department of Genetics, Faculty of Medicine and Faculty of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

and Sakamoto-Hojo E. T.

*Department of Genetics, Faculty of Medicine and <sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters-USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

**Keywords:** Glioblastoma-derived cell lines, ionizing radiation, transcription factors and radioresistance

## 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most frequent tumors in the central nervous system and the most malignant tumor among gliomas. In the past two decades, cytogenetic and molecular genetic studies have identified a number of recurrent chromosomal abnormalities and genetic alterations in malignant gliomas, particularly in GBM [1]. It was already described that GBM harbors combinations of the following genetic alterations: loss of heterozygosity of 10q, EGFR amplification, TP53 mutations, p16<sup>INK4a</sup> deletion and PTEN mutations [2]. New integrative genomics studies provided a comprehensive view of the complicated genomic landscape of GBM, revealing a set of core signaling pathways commonly activated in GBM involving TP53, RB, and RTK (receptor tyrosine kinase) pathways [3, 4]. The majority of GBM tumors present genetic alterations in all three pathways, which helps to stimulate cell proliferation and enhance cell survival while allowing tumor cells to escape from cell-cycle checkpoints, senescence, and apoptosis. This approach also identified previously unknown genetic alterations in IDH1/2, NF1, ERBB2, and NFKBIA genes [1].

The current GBM treatment involves aggressive management including surgery, adjuvant temozolomide-based chemotherapy, and radiotherapy [5], but GBM patients still present a dismal prognosis, and the median survival is 14.6 months from diagnosis [6]. Although radiotherapy has been found to significantly prolong survival rates for GBM patients, radioresistance is a typical characteristic of this tumor [7].

Current genome-wide studies and the molecular characterization of GBM have allowed the identification of potential new targets, development of novel therapeutic small molecules and monoclonal antibodies and initiation of clinical trials with these targets [6, 8-10]. However, there is a wide molecular diversity and heterogeneity associated with the aberrantly GBM signaling pathways, culminating in the relative lack of success of these new approaches [10]. Recently, an alternative strategy involves the selective targeting of GBM stem cells, which are resistant to chemo- and radiotherapy. But still, almost all small-molecule inhibitors designed to target these cells failed to demonstrate the effectiveness of this strategy, compared with the conventional therapy [11].

Considering that most of the treatment protocols are still ineffective, novel approaches are needed towards killing of GBM cells. Transcription machinery, as well as its regulatory elements is also a feasible new target for the application of molecular therapies. Transcription of DNA is dependent on the spatially and temporally coordinated interaction between transcriptional machinery involving RNA polymerase II, transcription factors (TFs)) and transcriptional regulatory components (promoter elements, enhancers, silencers and locus control regions) [12, 13]. The low level of transcription, directed by the general transcription factors associated to RNA polymerase core enzyme, is known as basal transcription [14]. However, there is a rapidly expanding number of ‘context-dependent’ transcription factors that bind DNA and these TFs are capable of positively or negatively regulating the transcription process depending on the context of their binding sites, the complement of protein interactions and other environmental influences [15].

Postgenomic analyses of major transcription factor families, in both malignant and nonmalignant cell types, have opened new discussions about TF function. The mechanisms by which TFs act in cancer cell systems appear to exhibit a restricted repertoire of skills and plasticity displayed by normal cell systems [16]. The evolution of a restricted malignant transcriptome can be seen clearly in the nuclear receptor superfamily, but is also apparent in the MYC and AP-1 networks [17]. Oncogenic transcriptional rigidity reflects the simultaneous deregulation of target loci such that proliferative and survival signals are enhanced and antimitotic inputs are either limited or lost. Co-repressor proteins significantly contributes with the disruption of these processes [16]. Therefore, understanding mechanisms involved in gene regulation and transcriptional network may lead to a better knowledge about the crucial functions of TFs, providing information to explore possibilities of their application as molecular targets in cancer therapy [18].

A valuable tool to study the transcription machinery is the DNA microarray technology [19], which measures the transcript expression of thousands of genes to identify changes in expression profiles at different biological conditions [20-24], thus allowing to compare different cell types under diverse treatment conditions. The influence of TP53 status on transcriptional profiles was previously described in tumor cell lines [25, 26]. Expression signatures of irradiated GBM cells were already performed for cell lines that are proficient and deficient for TP53 [27, 28].

Recently, information on the regulation of gene expression can also be used within the context of functional enrichment tests, and different databases containing TFs binding sites and other regulatory motifs are available, allowing to scan promoter regions of genes to detect the presence of target motifs [29]. This information allows to determine whether a set of pre-selected genes is under control of TFs. FatiGO+ [30] is a web-based tool capable of associating TFs that are common to a gene set used as parameters. This TF prediction method was already applied to a GBM dataset obtained from public

repositories of microarray experiments, and the up-regulation of two predicted TFs, E2F1 and E2F4, was validated for several GBM cell lines [31], demonstrating the suitability of this method.

In the current study, we aimed to identify TFs that could be predicted from significant differentially expressed genes (previously obtained in microarray experiments in irradiated GBM cells) using an *in silico* analysis.

We found few predicted TFs that were common between GBM cell lines, while several exclusive TFs were found for each cell line, indicating that the transcriptional response to ionizing radiation is very particular to each cell line examined in our microarray study, a fact that can be due to the genetic heterogeneity inherent to GBM cells. In spite of this, there was a convergence of biological functions among cell lines; the most relevant processes were related to apoptosis, cell proliferation, cell cycle, DNA repair, oxidative stress, among others. Furthermore, the present results also showed several TFs that were already reported as associated to cancer and stress responses.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Briefly characterization of the experiment that provided the statistically modulated genes used for TF prediction**

#### **2.1.1. Cell culture and irradiation**

Human GBM T98G and U87MG cell lines were supplied by the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA) and gently donated by Dr. Mari C. Sogayar (Universidade de São Paulo, Brazil). U343MG-a (U343), a cell line established from a primary malignant astrocytoma in an adult [32], was kindly donated by Dr. James T. Rutka (The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Center, Canada); U251MG cell lines was also purchased from the ATCC (Rockville, MD, USA) and gently donated by Dr. Guido Lenz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) [33]. All cell lines grown in the presence of DMEM + HAM F10 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) plus 10% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, Brazil), and kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, until they reach semiconfluence. Cells were sub-cultured and 1x10<sup>6</sup> cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks, being incubated at 37°C for 48 h, and irradiated with 8 Gy of gamma-rays (<sup>60</sup>Co source, dose rate of 2.0 Gy / min., Unit Gammatron S-80, Siemens, 1.25 MeV, HC-FMRP/USP).

#### **2.1.2. cDNA microarrays method and analysis**

Two experiments with irradiated and sham-irradiated GBM cells were carried out using a glass slide microarrays containing ~4300 clones of cDNA probe (in replicates) from the human IMAGE Consortium cDNA library [34]; kindly provided by Dr. Catherine Nguyen (INSERM-CNRS, Marseille, France)], and prepared according to the protocol described by Hegde et al [35]. Microarrays were spotted onto glass slides (Corning, Lowell, MA, USA) by using a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) according to the manufacturer's instructions.

Total RNA extraction was performed for all cell lines, 30 min. and 6 h after irradiation, using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to manufacturer's instructions. Each cDNA sample was spotted twice in the slide (duplicate spots). The cDNA complex probes were prepared using the CyScribe Post Labeling Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described [23]. Hybridizations were carried out using an automatic system (Automatic Slide Processor, Amersham Biosciences, UK) and signals were immediately captured after the final wash procedure, using a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences, UK). This array platform was already used in several studies [22-26, 36].

#### **2.1.3. Data acquisition and gene expression analysis**

The provided microarray data was filtered and normalized [25, 36]. Following the normalization procedure, microarray data was exported to tab-delimited tables in MEV format and analyzed in MEV (v. 3.1) software [37].

The gene set submitted to SAM (Significance Analysis of Microarray [20]) were previously obtained by a t-test ( $\alpha=5\%$ ) comparing irradiated (8 Gy) *versus* unirradiated (controls) T98G, U251MG, U343MG-a and U87MG cell lines, separately, considering two time points (30 min. and 6 h). The overall results are displayed in **Table 1**. The complete gene lists are available at <http://www.rge.fmrp.usp.br/passos/genesgbm01/>

The list of significantly modulated genes was obtained for a FDR < 5%. U343 cells showed 123 and 14 significantly differentially expressed genes at 30 min and 6 h after irradiation, respectively, whereas U87 showed 129 genes at 30 min

and 140 genes at 6 h; T98G cell line displayed 32 and 23 significantly up-regulated genes at 30 min. and 6 h, respectively, whereas U251 showed 81 genes at 30 min. and 37 genes at 6 h (**Table 2**).

**Table 1.** Overall quantitative results on significant differentially expressed genes obtained by the DNA microarray method, and analysis performed by SAM – Significance Analysis of Microarray (FDR < 5 %), for the comparison irradiated *versus* un-irradiated cells. RNA samples from U87, U343, T98 and U251 cells were collected at 30 min. and 6 h following irradiation with 8 Gy of gamma-rays. Fold-change (+) or (-) means up- and down-regulation in transcript expression, respectively.

Condition	Number of genes		Fold Change variation
	up-regulated	down-regulated	
U343MG-a (30 min.)	7	116	+1.53 to -2.42
U343MG-a (6 h)	3	11	+1.83 to -1.39
U87MG (30 min.)	56	73	+1.88 to -2.95
U87MG (6 h)	86	54	+1.68 to -1.95
T98G (30 min)	32	0	+2.26 to +1.13
T98G (6 h)	16	7	+2.70 to -1.63
U251MG (30 min.)	12	69	+1.85 to -1.40
U251MG (6 h)	17	20	+2.28 to -2.18

## 2.2. Transcriptional factor analysis

The analysis of TFs related to the significant differentially expressed genes (SAM) was performed by applying the FatiGO + [30]. This program uses the TRANSFAC [38], and CisRed [39] transcription factors database, including their respective binding sites and regulated genes.

FatiGO+ analyzes if the pre-selected set of genes (provided after SAM analysis), are under control of the same TF, and search for significant enrichments to each TF that is associated to the gene list compared to the complete reference list, containing ~4300 clones that were spotted onto the microarray slide[29].

The p values obtained in the analysis of regulatory elements have been established by the program using the Fisher's exact test for multiple comparisons (unadjusted p-value). The Enrichment Index (EI) calculated for each TF corresponds to the increment obtained regarding the number of genes (%) statistically modulated (SAM) that are associated to a specific TF (List #1) divided by the total number of genes (%) in the array set that were predicted as targets for the same TF (List #2):

$$EI = \% \text{ gene List } \#1 / \% \text{ gene list } \#2$$

The TFs were selected according to unadjusted p-values < 0.05. The genes were submitted to FatiGO+ v3.2, using the Gene symbol identifier and the selected gene distance of 10 kb. After selecting the TFs associated to modulated genes (SAM), a search was conducted in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) looking for biological functions of those TFs.

## 2.3. Quantitative real-time PCR (qPCR)

We analyzed the transcript expression of HEB, a predict TF that was found associated to 57.7% of up-regulated genes in U87 cells, 30 min. after IR. The reverse transcription step was carried out in the remaining RNA samples from microarray experiments, with the Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA), according to manufacturer's instructions. The integrity of cDNA samples was validated by the amplification of the endogenous B2M gene and visualization in agarose gel electrophoresis. qPCR was carried out using SYBR green master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) and the expression levels were estimated by the Relative Expression Software Tool (REST) [49], using 10000 interactions as setup parameter. All primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) were designed in Primer3 software [50] and are displayed on **Table 2**. The reactions were carried out in the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) equipment, using primer sets with an annealing temperature near 60°C and an amplicon of 100–120 bp. The PCR cycle was the following: pre-heating at 50°C for 2 min., 10 min. at 95°C (denaturation step), followed by

40 cycles at 95°C for 15 sec., and at 60°C for 60 sec. The dissociation curves were set up as following: 95°C for 15 sec., 60°C for 20 sec. and 95°C for 15 sec.

**Table 2.** Primer sequences used in Real Time qPCR; the housekeeping B2M gene was used as internal control.

Primer	Sequence	PCR product size (pb)
<b>B2M – forward</b> <b>B2M – reverse</b>	5' - AGGCTATCCAGCGTACTCCA - 3' 5' - TCAATGTCGGATGGATGAAA - 3'	112
<b>HEB – forward</b> <b>HEB – reverse</b>	5' - CCGCTTGAGTTATCCTCCAC - 3' 5' - GTGAGGCAGCAACGTAAGGT - 3'	116

#### 2.4. Western Blot (WB)

Protein extraction was performed with the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad-USA) according to the manufacturer's instructions, using the same samples for RNA extraction. These samples were obtained from U87 cells collected at 30 min. post-irradiation. The expression of HEB was analyzed by Western blot, using ACTB as internal control. Samples were prepared with 30 µg of total protein. After electrophoresis, proteins were transferred from the gel to the membrane Invitrolon PVDF using the XCell IITM Blot Module system (Invitrogen, Carlsbad - USA). The immunodetection and protein visualization were conducted with the WesternBreeze Chromogenic kit (Invitrogen, Carlsbad - USA). The antibodies used in this study were anti-HEB (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), and anti-ACTB (Cell Signaling, Danvers, USA), dilution of 1:1000.

We performed densitometric analysis of WB bands using the GelPro Analyzer (MediaCybernetics, Rockville, USA) 4.0, and the relative expression of HEB was calculated relatively to ACTB.

### 3. Results

In the FatiGO + analysis, the lists of statistically modulated genes (SAM) were up-loaded in order to find TFs that were significantly associated with up-regulated and down-regulated genes for non-adjusted p-values < 0.05 (**Table 3**).

A Venn diagram was constructed based on the numbers of predicted TFs from data set previously obtained for each cell line (microarray experiments) (**Fig. 1**). TFs predicted for 30 min and 6 h were pooled together. Each cell line showed a number of exclusive TFs, but we also observed common TFs between cell lines. Out of 18 exclusive TFs found for U87MG cell line, PEpb (p = 0.008), Bach2 (p = 0.007), Freac-4 (p = 0.003), HLV (p = 0.006), Evi-1 (p = 0.009) displayed the lowest p-values, while PPARG and SEF-1 displayed the highest EI (31.3). U343 presented 9 exclusive TFs; High values of EI were found for MAF (33.1), E2F:DP-1 (22.0), PR (45.5) and STAT3 (38.5), and ARP-1 was the TF presenting the lowest p-value (0.009). T98G cells displayed only 6 exclusive TFs: EBF, Pax, Pbx1b, C/EBP, Poly A downstream element and Pax-9; two of them, EBF and PolyA showed low p-values, 0.005 and 0.007, respectively. Regarding U251MG cells, 13 TFs were predicted, and only APOLYA presented a high EI (27.8) (**Table 3**).

**Table 3.** Transcription factors associated with statistically modulated genes (SAM, FDR ≤ 5 %), as predicted by the FATIGO+ v3.2., analysis performed for U343MG-a, U87MG, T98G and U251MG cell lines (30 min. and 6 h post-irradiation). We used gene lists that showed patterns of repression (↓) and induction (↑) in irradiated cells compared with mock-irradiated. The Enrichment Index (EI) calculated for each TF corresponds to the increment regarding the number of genes (%) statistically modulated (SAM) that are associated to a specific TF (List #1) divided by the total number of genes (%) in the array set that were predicted as targets for the same TF (List #2). The gene distance for the analysis of the TFs was 10 kb.

U343MG-a					
Collection time	Transcription factor	% of genes	% of genes	EI	p-value

		(List 1)	(List 2)		
30 min. (↓)	ARP-1	14.8	6.7	2.2	0.009
	TEF	37.5	25.3	1.5	0.013
	VBP	19.3	10.4	1.9	0.013
	Imperfect Hogness/Goldberg BOX	2.3	0.2	14.2	0.016
	Muscle initiator sequence-20	20.5	12.2	1.7	0.031
	Elk-1	44.3	33.1	1.3	0.038
	Sox-5	4.6	1.5	3.1	0.048
	ACAAT	12.5	6.7	1.9	0.049
6 h (↑)	MAF	50.0	1.5	33.1	0.031
	E2F-4:DP-1	50.0	2.3	22.0	0.046
6 h (↓)	ICSBP	40.0	3.7	10.9	0.013
	PR	20.0	0.4	45.5	0.024
	STAT3	20.0	0.5	38.5	0.028
	ARP-1	40.0	6.7	6.0	0.040

**U87 MG**

Collection time	Transcription factor	% of genes (List 1)	% of genes (List 2)	EI	p-value
30 min. (↑)	C/EBPgamma	85.0	64.4	1.3	0.007
	AP-1	80.0	61.1	1.3	0.014
	HEB	57.5	38.5	1.5	0.021
	SREBP-1	97.5	84.5	1.2	0.024
	FOXP3	87.5	72.0	1.2	0.032
	PPARG	2.5	0.1	31.3	0.046
	SEF-1	2.5	0.1	31.3	0.046
30 min. (↓)	Bach2	63.5	43.9	1.4	0.007
	PEBP	28.9	14.4	2.0	0.008
	COUP-TF:HNF-4	11.5	3.7	3.1	0.014
	MEF-3	5.8	1.2	5.0	0.026
	FOX	78.9	64.8	1.2	0.039
6 h (↑)	DEC	45.6	31.9	1.4	0.032
	STAT3	3.5	0.5	6.8	0.042
6 h (↓)	Freac-4	10.5	1.6	6.8	0.003
	HLF	50.0	28.2	1.8	0.006
	Evi-1	97.4	81.6	1.2	0.009
	VBP	23.7	10.4	2.3	0.015
	TCF-4	55.3	37.2	1.5	0.028
	AP-1	79.0	61.1	1.3	0.028
	Gfi-1	10.5	3.1	3.4	0.031
	CRE-BP1	15.8	6.6	2.4	0.039
	HNF-4alpha	29.0	16.4	1.8	0.047

**T98G**

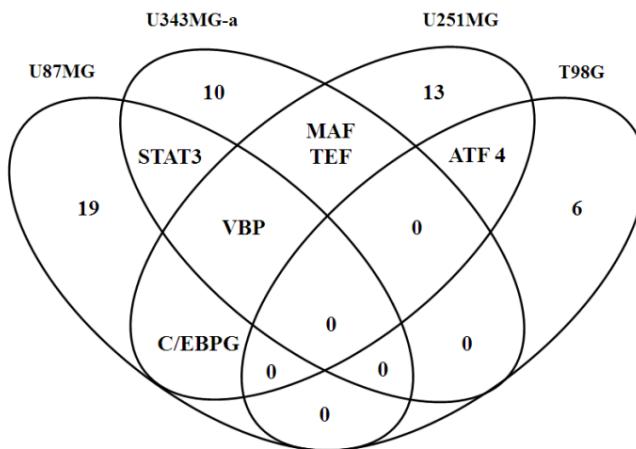
Collection time	Transcription factor	% of genes (List 1)	% of genes (List 2)	EI	p-value
30 min. (↑)	EBF	29.6	10.5	2.8	0.005
	ATF4	22.2	8.4	2.6	0.023

	Pax	92.6	75.3	1.2	0.041
6 h (↑)	Pbx1b	14.3	1.8	8.2	0.026
	C/EBP	100.0	20.0	5.0	0.002
	Poly A downstream element	75.0	12.6	6.0	0.007
	Pax-9	75.0	23.8	3.2	0.045
<b>U251MG</b>					
Collection time	Transcription factor	% of genes (List 1)	% of genes (List 2)	EI	p-value
30 min. (↑)	SMAD-4	40.0	10.4	3.9	0.015
	PTF1-beta	20.0	2.7	7.4	0.030
	APOLYA	10.0	0.4	27.8	0.039
30 min. (↓)	VBP	21.7	10.4	2.1	0.025
	HNF-6	6.5	1.4	4.7	0.030
	E2F	52.2	36.0	1.4	0.030
	TEF	39.1	25.3	1.5	0.040
	TTF1	23.9	13.3	1.8	0.047
	CDP CR1	54.4	39.7	1.4	0.049
	POU1F1	54.4	39.7	1.4	0.049
6 h (↑)	MAF	15.4	1.5	10.2	0.017
	CREB	46.2	17.8	2.6	0.018
	ATF4	30.8	8.4	3.7	0.020
	MEIS1B:HOXA9	15.4	1.9	8.2	0.025
	C/EBPgamma	92.3	64.4	1.4	0.041
6 h (↓)	HES1	45.5	15.6	2.9	0.019
	Lmo2 complex	27.3	6.0	4.5	0.026
	ATATA	18.2	2.9	6.2	0.041

Interestingly, STAT3 was the common TF found for TP53 wild-type cells; however, this TF was associated with up-regulated genes in U87, and with down-regulated genes in U343. Only one TF (VBP) was common among three cell lines (U87, U343 and U251), being associated with down-regulated genes. Among the TP53 mutant cell lines, ATF4 was common between T98 and U251, associated with up-regulated genes (30 min. and 6 h). Two TFs were found common between U343 and U251, TEF (associated to down-regulated genes, 30 min.) and MAF (associated to up-regulated, 6 h). Finally, C/BPGamma was commonly predicted for up-regulated genes in U87 (30 min.) and U251 (6 h) cell lines (**Fig. 1**).

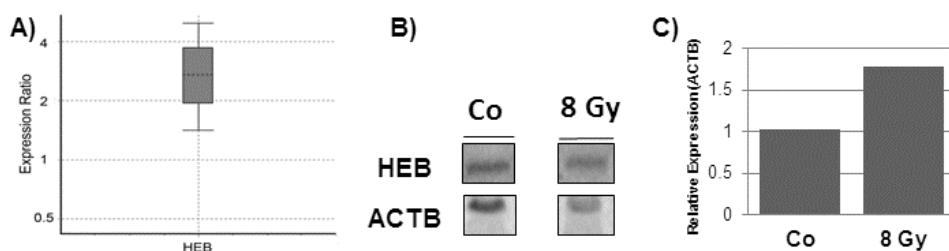
Therefore, our results showed that most of the predicted TFs were exclusive to each cell line and few TFs were common among the GBM cell lines; these results indicate that the transcriptional response to ionizing radiation is very particular to each cell line, and most probably this can be due to the genetic heterogeneity of GBM cells.

By using the real time qPCR method, we confirmed the expression of HEB to validate the *in silico* prediction for this TF. By using the REST 2009 software, we found that HEB was statistically up-regulated (+2.6) when comparing irradiated and sham-irradiated U87 cell lines (30 min.) (**Fig. 2A**). Primer efficiency was also determined for B2M (0.9615) and HEB (0.9652).



**Fig. 1.** Venn diagram showing predicted TFs associated with significant differentially expressed genes (from microarray experiments) selected for four GBM cell lines, comparing irradiated *versus* sham-irradiated cells, collected at 30 min. and 6h following irradiation. TF prediction was carried out using FatiGO+ v3.2.

We also look for HEB protein expression by Western Blot; both ACTB and HEB antibodies were used for irradiated and sham-irradiated U87, 30 min after irradiation (**Fig.2B**). The relative expression values calculated by densitometric analysis showed that HEB expression was 1.7 higher in irradiated (8 Gy) cells, relatively to the control value (**Fig. 2C**).



**Fig.2.** HEB expression. A) HEB expression levels obtained by the qPCR method. This TF was found associated with up-regulated genes in U87 cells, 30 min. after irradiation. Boxes represent the interquartile range; the dotted line represents the median value; whiskers represent the minimum and maximum observations. B) Protein expression analyzed by Western Blot using antibodies for HEB (Santa Cruz) and ACTB (Cell Signalling) as endogenous control. C) Densitometric analysis of Western Blot bands using the Gel Pro Analyzer 4.0 software displayed for HEB expression relatively to ACTB.

#### 4. Discussion

Recently, genome wide technologies, such as DNA microarrays, provide a huge amount of information about gene expression, but require additional bioinformatics analyses for data interpretation. In order to reduce complex signatures to a small number of activated transcriptional elements, new bioinformatics tools have been developed. To date, genome-wide TF-binding regions and sites were identified using a variety of indirect methods and data sets, revealing abundant binding sites for different TFs in mammalian cells [40-43]. Using lists of differentially expressed genes that were generated by microarray experiments, it is possible to predict TFs that can target common binding sites to a gene set. In the current study, we performed an *in silico* analysis (FatiGO+ v3.2.) to identify TFs from a list of significant differentially expressed genes selected for irradiated GBM cell lines in microarray experiments. Only few predicted TFs were common to GBM cell lines, while several TFs were exclusive to each cell line, indicating that the transcriptional response to ionizing radiation is very peculiar to each cell line examined in our microarray study. The most relevant predicted TFs are discussed below. While few predicted TFs were shared between different cell lines, several TFs were found exclusive to each cell line, except U251.

##### 4.1. Commonly predicted TFs for two or three GBM cell lines

We found few TFs that were predicted for more than one cell line: MAF, TEF, ATF4, STAT3, VBP and C/EBPGamma. Most of these TFs (STAT3, TEF and VBP) are related to apoptosis, while other biological classes were also found, such as oxidative stress (ATF4), differentiation (MAF) and nucleotide excision repair (C/EBPGamma).

STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3* (acute-phase response factor), is part of the STAT family of cytoplasmic latent transcription factors, and was predicted for the TP53 wild type cells, U87 (up-regulated genes, 6 h) and U343 (down-regulated genes, 6 h). Phosphorylated STAT3 leads to transcriptional activation of downstream genes involved in processes such as cell proliferation, suppression of apoptosis, and angiogenesis [44, 45]. It was demonstrated that STAT3 is constitutively activated and overexpressed in human gliomas; STAT3 activation correlates with malignancy [46, 47], while STAT3 inhibition reduces the lethality of GBM tumors *in vivo* [48], and its inhibition have been tested in phase 0 trial in head and neck cancers [49].

Thyrotroph embryonic factor (TEF) and human hepatic leukemia factor (HLF) are members of the PAR (*proline and acidic amino acid-rich*) subfamily of basic region/leucine zipper (bZIP) transcription factors. The chicken vitellogenin gene-binding protein (VBP) is also a bZIP TF member and is considered as the chicken homologue of TEF. TEF was predicted from down-regulated genes in U343 and U251 (30 min.), and its homolog, VBP, from down-regulated genes in U87 (6 h), U343 (30 min.) and U251 (30 min.). PAR bZIP proteins have recently been shown to be involved in amino acid and neurotransmitter metabolism in both liver and brain [50]. PAR bZIP proteins are also able to transactivate the promoter of bcl-gS which is directly involved in apoptosis induction. Consistently, transfection of TEF induces the expression of endogenous bcl-gS in cancer cells, independently on TP53 [51].

Activating transcription factor 4 (*tax-responsive enhancer element B67*); activating transcription factor 4C (ATF4) belongs to the large ATF/CREB family of transcription factors [52] and was predicted from up-regulated genes in T98 (30 min) and U251 (6 h). Up-regulation of ATF4 is directly involved in the endoplasmic reticulum (ER) stress through induction of CHOP in GBM treated with Nelfinavir (protease inhibitor class of drugs) [53] or in concert with PERK, GADD34 and EIF2alpha in Hela cells submitted to hypoxia [54]. Therefore, activation of ATF4 was already reported in GBM treated cells.

MAF, the v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian) is a unique subclass of bZIP proteins and was predicted from up-regulated genes in U343 and U251 at 6 h. Depending on the binding site and binding partner, the encoded protein can be a transcriptional activator or repressor. Members of the MAF family appear to play important roles in the regulation of differentiation [55]. MAF was found up-regulated in various cancers, such as colon cancer (but only in tumors that presented high levels of COX-2 expression) [56], a small subset of myelomas, hairy cell leukemia, T- and NK-cell neoplasms and small cell lymphomas [57].

C/EBPGamma, a member of the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcription factors was predicted from up-regulated genes in U87 (30 min.) and U251 (6 h). This TF regulates the expression of ERCC5 [58], and is a participant of DNA repair [59], particularly in the nucleotide excision repair [60].

The predicted TFs represent the overall GBM response to irradiation, since they were selected for more than one cell line, and as mentioned above, their functions are directly associated with stress responses involving apoptosis, DNA repair and ER stress. Moreover, as an example of STAT3, which is in clinical trial [49], predicted TFs may constitute potential targets to be investigated and validated in cancer treatment.

## 4.2. Exclusively predicted TFs for irradiated U343 cell line

Few predicted TFs (PR, E2F4:DP-1, and ARP-1) associated with statistically significant modulated genes in irradiated U343 cells were found exclusive to this cell line. The functions of these TFs are mainly associated with cell cycle/tumor growth, being involved in various types of cancer. The overexpression of E2F4 and its binding partner DP-1 revealed a dual function of E2F4, which acts as an activator as well as a repressor, being implicated in positive regulation of the cell cycle [61]. In a previous work, the up-regulation of E2F4 was confirmed for several GBM cell lines [31], demonstrating the potential of this TF as molecular target in cancer therapy.

Progesterone receptor (PR), a nuclear receptor transcription factor was associated with down-regulated genes in U343 cells (6 h). Steroid hormones participate in several physiological and pathological processes in the brain, including the regulation of tumor cell growth [62-64]. Progesterone exerts many of its effects by the interaction with specific intracellular receptors [62, 65].

ARP-1, also known as orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII) is a member of the steroid/thyroid nuclear hormone receptor superfamily [66] and can act as transcriptional repressor or activator. ARP-1 plays critical roles in organogenesis [67-70], and is a major angiogenesis regulator within the tumor microenvironment during pancreatic tumor progression and metastasis [71]. Besides, ARP-1 was associated with therapy

response in oligodendroglial tumors with 1p/19q loss [72]. In the present study, this TF was predicted from down-regulated genes (30 min. and 6 h), indicating its possible involvement in radiation responses restricted to U343 cell line.

#### **4.3. Exclusively predicted TFs for irradiated U87 cell line**

A high number of TFs with low p-value (Bach2, PEBP, Freac-4, HLF and Evi-1) and high EI (PPARG and SEF-1) was associated with significant expressed genes in U87 cell line.

PPARG is a member of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) family, a subfamily of the nuclear receptor superfamily [73]. The protein level of this receptor has been recently identified as a significant prognostic marker [74]. Interestingly, recent studies have shown that PPARG is expressed in normal and malignant human brain, and the treatment with PPARG agonists induces growth arrest and apoptosis in brain tumor cells *in vitro* and in animal models *in vivo* [75-77]. Recent findings show that PPARG agonists regulate growth and expansion of brain tumor stem cells [78] and also altered the expression of stemness genes [79]. Unfortunately, clinical trials also failed to demonstrate the effectiveness of such agonists as a monotherapy for cancer treatment, a fact which stimulates the search for combination treatments to enhance their effects [80].

Basic leucine zipper transcription factor 2 (Bach2) is an evolutionarily related member of the BTB-basic region leucine zipper transcription factor family. Bach2 can function as transcriptional activator and repressor [81]. This TF down-regulates cell proliferation of the neuroblastoma cell line N1E-115 and negatively affects their potential to differentiate, being considered as gatekeeper of the differentiated status [82]. Bach2 presents high frequency of loss of heterozygosity of the Bach2 gene in human B cell lymphomas [83]. Consistent with its putative role as a tumor suppressor, Bach2 enhances apoptosis in response to oxidative stress [84, 85].

The transcription Factor PEBP, also called Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a member of the phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) family. RKIP plays a pivotal modulatory role in several protein kinase signaling cascades. RKIP regulates the activity of the Raf/MEK/ERK, which is responsible for proliferation and differentiation of diverse cell types [86]. It has been reported that RKIP was poorly expressed in primary tumors, being absent in various metastatic cancers; its induction sensitizes resistant tumor cells to apoptosis by various chemo- and immunotherapeutic drugs, as well as inhibitors of metastasis [87]. The absence of RKIP is also associated with highly malignant behavior and poor survival of patients [88].

The forkhead domain is a monomeric DNA binding motif that defines a rapidly growing family of eukaryotic transcriptional regulators. We found Freac-4, also known as Forkhead Box D1 (FOXD1) associated with down-regulated genes in U87 cells (6 h). This gene was found repressed in chemoresistant tumors, as analyzed by microarrays [89]. However, FOXD1 and FOXD2 were highly expressed in prostate cancer and lymph node metastases, among various cancer types [90]. In another study, using kidney-derived cell lines, it was suggested that FOXD1 may be regulated by TP53, WTAR (a mutated form of WT1) and WT1[91].

As already mentioned, HLF is a member of PAR bZIP transcription factors, and was associated with down-regulated genes, 6 h after irradiation in U87. PAR bZIP proteins are also involved in apoptosis induction [51]. The fused gene E2A-HLF was responsible for the development of lymphoid malignancies in 60 % of the transgenic mice [92].

Activator protein one (AP1) transcription factors are a family of jun and fos proteins, whose subunits present diverse pro/anti-cancer effects, like inhibition or increase in proliferation, inhibition of apoptosis and angiogenesis [93, 94]. AP-1 is one of the genes early activated after radiation in primary human B cells [95]. The inhibition of AP-1 blocks the proliferation of breast tumor cells by suppressing the growth factor signaling [96]. The modulation of AP-1 activity may be a new attempt to reduce the malignant transformation. However, only the function involved with malignancy should be targeted [97], since AP-1 presents oncogenic and anti-oncogenic properties. This TF was associated to U87 cells (up-regulated genes, 30 min.) and (down-regulated genes, 6h).

The EVI1 gene encodes a zinc finger transcription factor with important roles in normal development and leukemogenesis. Reports in animal model and findings in *in vitro* studies showed that EVI1 affected cellular proliferation, differentiation, and apoptosis [98]. Evi-1 was also found overexpressed in infratentorial ependymomas, it can promote proliferation of ependymal tumor cells, and its expression indicates an unfavorable prognosis [99].

U87 cell line presented several predicted TFs with significant p values and higher enrichment index than other cell lines. Most of the predicted TFs are related to apoptosis (PPARG, Batch2, PEBP, HLF, AP1 and EVI1), but they were associated with up- or down-regulated genes. Overall, the biological functions of these TFs are related to cell proliferation,

differentiation and tumor growth, indicating the relevance of their deregulation in cancer development and malignancy, and possibly, in tumor responses to anti-cancer therapies.

#### **4.4. Exclusively predicted TFs for irradiated T98G cell line**

Only two TFs were predicted for T98G cells: EBF and C/EBP. The early B-cell factors (EBF) are a family of four highly conserved DNA-binding transcription factors with an atypical zinc-finger and helix-loop-helix motif. Zardo and colleagues found that the EBF3 locus on the human chromosome 10q is deleted or methylated in brain tumors [100]. Functional studies revealed that EBF3 activates genes involved in cell cycle arrest and apoptosis, while in opposite, it represses genes involved in cell survival and proliferation [101]. Therefore, EBFs represent novel tumor suppressors whose inactivation blocks normal development and contributes to tumorigenesis of diverse types of human cancer [102].

CEBP is also known as basic leucine zipper transcription factor, CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA), which directly interacts with CDK2 and CDK4 and arrests cell proliferation by inhibition of these kinases [103]. CEBPA is crucial for normal granulopoiesis, and dominant-negative mutations of CEBPA gene were found in patients with myeloblastic subtypes (M1 and M2) of acute myeloid leukemia [104]. CEBPA also plays a role in DNA damage response dependent on TP53, as observed in keratinocytes [105]. C/EBPA was found silenced in human squamous cell carcinoma (SCC), and loss of C/EBPA confers susceptibility to UVB-induced skin SCCs involving defective cell cycle arrest in response to UVB [106]. Interestingly, these findings indicate the role of CEBP in DNA damage responses, and possibly, the potential of this TF to be explored as therapeutic molecular target.

#### **4.5. Validation of TF prediction**

As a predicted TF associated with up-regulated genes, HEB (p-value = 0.021 and EI = 1.5) was chosen to be studied in terms of expression levels, aiming to validate the *in silico* analysis, although for a single TF. Interestingly, we showed that HEB transcript expression was up-regulated (+2.6) in irradiated U87 cell line, 30 min. after irradiation, while HEB protein expression analyzed by Western blot was 1.7 higher in irradiated (8 Gy) cells, relatively to un-exposed controls.

HEB is a member of the class A basic helix-loop-helix (bHLH) family that participates in the nervous system development [107, 108]. According to O'Neil et al. [109], the repression of E47/HEB has been associated with the induction of leukemia in mice. In another study, it was demonstrated the induction of HEB in gliomas compared with non-neoplastic brain tissue [110]. Moreover, HEB seems to be involved in cell proliferation control of neural stem cells and also progenitor cells, being important to sustain their undifferentiated state during embryonic and adult neurogenesis [108]. Although HEB expression has not yet been correlated with radiation responses in GBM cells, in the present study, we found its association with significant differentially expressed genes at 30 min. following irradiation in U87 cell line; interestingly, we also showed that HEB transcript and protein expression was induced in irradiated U87 cell line, 30 min. after irradiation. This finding, although restrict to one TF, indicates the validity of the TF prediction by *in silico* analysis.

#### **5. Conclusions: Lessons from TF prediction in irradiated GBM cells**

The present findings about prediction of TFs associated to differentially expressed genes in GBM cell lines showed that few TFs were shared among different GBM cell lines, while several TFs were found exclusive to each cell line, indicating that the transcriptional response to ionizing radiation is very particular to each cell line, probably due to the genetic heterogeneity, which is characteristic of GBM cell lines. In spite of this observation, several biological functions were similar among cell lines, such as apoptosis, cell proliferation, cell cycle control, DNA repair, ER stress, and differentiation. Furthermore, most of the predicted TFs were already reported as differentially expressed, deleted or mutated in cancer, including GBM. However, apart the similarity of biological functions, different pathways seems to be associated to the predicted TFs. Interestingly, we could not find TP53 as a TF associated to the data set (List #1) analyzed in the present study, even for the GBM cells that were wild-type for *TP53* gene, and even considering the presence of *TP53* cDNA clone in the microarray slide. It is possible that the TP53 protein could not be activated in GBM cells, impairing its action as transcription factor, as previously suggested by other authors [111].

The most intriguing finding refers to apoptotic related TFs. Probably, predicted TFs related to apoptosis control, and found associated with expressed genes at early time (30 minutes) following irradiation, are related to survival in GBM cells; this is supported by reports showing that in general, these cells are very resistant to undergo apoptosis, even under

conditions of drug treatment or radiation exposure [112-114]. In fact, GBM cells seem to be capable of activating several pathways to escaping from cell killing by anticancer therapies.

Even considering the relevance of our findings, some methodological limitations should be mentioned regarding *in silico* prediction of TFs. Despite the great advancement in terms of DNA binding sites detection, it is hard to determine which sites are functional regulatory elements that influence transcription. It is possible that a considerable fraction of these binding sites are nonfunctional and may constitute biological noise [115]. Other choices, such as ChIP experiments, may overcome this concern by detecting indirect TF-DNA interactions through protein/protein interaction [116].

In spite of the limitation mentioned above, in a previous study, we validated the expression of E2F [31] and the HEB expression was confirmed in the present study, both of them in GBM cell lines. In addition, we selected predicted TFs that were associated with stress response genes, and importantly, the TFs were reported as deregulated or mutated in different cancer types, thus indicating the relevance of further studies to better exploring the role of TFs in the context of therapeutic strategies based on molecular targets.

## 6. References

1. Chen, J, RM McKay, and LF Parada, Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*, 2012. 149(1): p. 36-47.
2. Ohgaki, H, Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, 2005. 25(1): p. 1-7.
3. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 2008. 455(7216): p. 1061-8.
4. Parsons, DW, et al., An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008. 321(5897): p. 1807-12.
5. Stupp, R, et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005. 352(10): p. 987-96.
6. Ohka, F, A Natsume, and T Wakabayashi, Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*, 2012. 2012: p. 878425.
7. Stupp, R, et al., Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol*, 2007. 25(26): p. 4127-36.
8. Sathornsumetee, S, et al., Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*, 2007. 110(1): p. 13-24.
9. Perry, J, et al., Novel therapies in glioblastoma. *Neurol Res Int*, 2012. 2012: p. 428565.
10. Polivka, J, Jr., et al., New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Anticancer Res*, 2012. 32(7): p. 2935-46.
11. Natsume, A, et al., Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol*, 2011. 28(1): p. 1-12.
12. Thomas, MC and CM Chiang, The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2006. 41(3): p. 105-78.
13. Maston, GA, SK Evans, and MR Green, Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006. 7: p. 29-59.
14. Hampsey, M, Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(2): p. 465-503.
15. Gaston, K and PS Jayaraman, Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(4): p. 721-41.
16. Battaglia, S, O Maguire, and MJ Campbell, Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Int J Cancer*, 2010. 126(11): p. 2511-9.
17. Thorne, JL, MJ Campbell, and BM Turner, Transcription factors, chromatin and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. 41(1): p. 164-75.
18. Mees, C, J Nemunaitis, and N Senzer, Transcription factors: their potential as targets for an individualized therapeutic approach to cancer. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(2): p. 103-12.
19. Kel, A, et al., Beyond microarrays: find key transcription factors controlling signal transduction pathways. *BMC Bioinformatics*, 2006. 7 Suppl 2: p. S13.

20. Tusher, VG, R Tibshirani, and G Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(9): p. 5116-21.
21. Sakamoto-Hojo, ET, et al., Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat Res*, 2003. 544(2 3): p. 403-13.
22. Fachin, AL, et al., Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays. *Radiat Res*, 2007. 168(6): p. 650-65.
23. Fachin, AL, et al., Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2009. 50(1): p. 61-71.
24. Carminati, PO, et al., Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line. *Genet Mol Biol*, 2010. 33(1): p. 159-68.
25. Godoy, PRDV, et al. Portrait of transcriptional expression profiles displayed by different glioblastoma cell lines. in: M Garami. (ed.) *Molecular Targets of CNS Tumors*. Rijeka: InTech; 2011. p. 277-300.
26. da Silva, GN, et al., Expression of genes related to apoptosis, cell cycle and signaling pathways are independent of TP53 status in urinary bladder cancer cells. *Mol Biol Rep*, 2011. 38(6): p. 4159-70.
27. Otomo, T, et al., Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004. 45(1): p. 53-60.
28. Godoy, PRDV, et al., Glioblastoma cell lines differing in TP53 status (mutant or wild-type) display different molecular signaling responses to gamma-irradiation Submitted, 2012.
29. Al-Shahrour, F, et al., FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W91-6.
30. Al-Shahrour, F, et al., BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue): p. W460-4.
31. Donaires, FS, et al., Transcriptional factors associated to over-expressed genes in glioblastoma multiforme, as predicted by in silico analysis on publicly microarray dataset Submitted, 2012.
32. Dirks, PB, et al., Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells. *Oncogene*, 1997. 15(17): p. 2037-48.
33. Filippi-Chiela, EC, et al., Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS ONE*, 2011. 6(6): p. e20849.
34. Lennon, G, et al., The I.M.A.G.E. Consortium: An Integrated Molecular Analysis of Genomes and Their Expression. *Genomics*, 1996. 33(1): p. 151-152.
35. Hegde, P, et al., A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*, 2000. 29(3): p. 548-50, 552-4, 556 passim.
36. Mello, SS, et al., Delayed effects of exposure to a moderate radiation dose on transcription profiles in human primary fibroblasts. *Environ Mol Mutagen*, 2011. 52(2): p. 117-29.
37. Saeed, AI, et al., TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 2003. 34(2): p. 374-8.
38. Wingender, E, et al., TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(1): p. 316-9.
39. Robertson, G, et al., cisRED: a database system for genome-scale computational discovery of regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(Database issue): p. D68-73.
40. Ferretti, V, et al., PReMod: a database of genome-wide mammalian cis-regulatory module predictions. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D122-6.
41. Bieda, M, et al., Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res*, 2006. 16(5): p. 595-605.
42. Birney, E, et al., Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 2007. 447(7146): p. 799-816.

43. Cawley, S, et al., Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*, 2004. 116(4): p. 499-509.
44. Bowman, T, et al., Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(13): p. 7319-24.
45. Brennan, C, et al., Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE*, 2009. 4(11): p. e7752.
46. Lo, HW, et al., Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(19): p. 6042-54.
47. Weissenberger, J, et al., IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, 2004. 23(19): p. 3308-16.
48. Doucette, TA, et al., Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma. *Neuro Oncol*, 2012.
49. Sen, M, et al., First-in-Human Trial of a STAT3 Decoy Oligonucleotide in Head and Neck Tumors: Implications for Cancer Therapy. *Cancer Discov*, 2012. 2(8): p. 694-705.
50. Gachon, F, et al., The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes Dev*, 2004. 18(12): p. 1397-412.
51. Benito, A, et al., A novel role for proline- and acid-rich basic region leucine zipper (PAR bZIP) proteins in the transcriptional regulation of a BH3-only proapoptotic gene. *J Biol Chem*, 2006. 281(50): p. 38351-7.
52. De Angelis, R, et al., Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett*, 2003. 547(1-3): p. 15-9.
53. Tian, X, et al., Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem*, 2011. 286(33): p. 29408-16.
54. Blais, JD, et al., Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(17): p. 7469-82.
55. Blank, V and NC Andrews, The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(11): p. 437-41.
56. Asting, AG, et al., COX-2 gene expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter methylation status. *BMC Cancer*, 2011. 11: p. 238.
57. Natkunam, Y, et al., Characterization of c-Maf transcription factor in normal and neoplastic hematolymphoid tissue and its relevance in plasma cell neoplasia. *Am J Clin Pathol*, 2009. 132(3): p. 361-71.
58. Crawford, EL, et al., CEBPG regulates ERCC5/XPG expression in human bronchial epithelial cells and this regulation is modified by E2F1/YY1 interactions. *Carcinogenesis*, 2007. 28(12): p. 2552-9.
59. Mullins, DN, et al., CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. *BMC Cancer*, 2005. 5: p. 141.
60. O'Donovan, A, et al., Isolation of active recombinant XPG protein, a human DNA repair endonuclease. *J Biol Chem*, 1994. 269(23): p. 15965-8.
61. Lee, BK, AA Bhinge, and VR Iyer, Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(9): p. 3558-73.
62. Graham, JD and CL Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 1997. 18(4): p. 502-19.
63. Grunberg, SM, et al., Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestrone agent mifepristone. *J Neurosurg*, 1991. 74(6): p. 861-6.
64. Schrell, UM, et al., Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 1: Female sex steroid receptors and their significance as specific markers for adjuvant medical therapy. *J Neurosurg*, 1990. 73(5): p. 743-9.

65. Mahesh, VB, DW Brann, and LB Hendry, Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996. 56(1-6 Spec No): p. 209-19.
66. Tsai, SY and MJ Tsai, Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev*, 1997. 18(2): p. 229-40.
67. Lee, CT, et al., The nuclear orphan receptor COUP-TFII is required for limb and skeletal muscle development. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(24): p. 10835-43.
68. Takamoto, N, et al., COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development*, 2005. 132(9): p. 2179-89.
69. You, LR, et al., Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*, 2005. 435(7038): p. 98-104.
70. You, LR, et al., Mouse lacking COUP-TFII as an animal model of Bochdalek-type congenital diaphragmatic hernia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(45): p. 16351-6.
71. Qin, J, et al., COUP-TFII regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(8): p. 3687-92.
72. Shaw, EJ, et al., Gene expression in oligodendroglial tumors. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011. 34(4): p. 355-67.
73. Issemann, I and S Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990. 347(6294): p. 645-50.
74. Robbins, GT and D Nie, PPAR gamma, bioactive lipids, and cancer progression. *Front Biosci*, 2012. 17: p. 1816-34.
75. Cellai, I, et al., Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells. *Br J Cancer*, 2006. 95(7): p. 879-88.
76. Grommes, C, et al., Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol Pharmacol*, 2006. 70(5): p. 1524-33.
77. Strakova, N, et al., Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors. *Neoplasma*, 2005. 52(2): p. 126-36.
78. Chearwae, W and JJ Bright, PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. *Br J Cancer*, 2008. 99(12): p. 2044-53.
79. Pestereva, E, S Kanakasabai, and JJ Bright, PPARgamma agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumour stem cells. *Br J Cancer*, 2012. 106(10): p. 1702-12.
80. Veliceasa, D, FT Schulze-Hoepfner, and OV Volpert, PPARgamma and Agonists against Cancer: Rational Design of Complementation Treatments. *PPAR Res*, 2008. 2008: p. 945275.
81. Oyake, T, et al., Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(11): p. 6083-95.
82. Shim, KS, et al., Bach2 is involved in neuronal differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*, 2006. 312(12): p. 2264-78.
83. Sasaki, S, et al., Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6q15. *Oncogene*, 2000. 19(33): p. 3739-49.
84. Hoshino, H, et al., Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. *J Biol Chem*, 2000. 275(20): p. 15370-6.
85. Muto, A, et al., Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *Embo J*, 1998. 17(19): p. 5734-43.
86. Yeung, K, et al., Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, 1999. 401(6749): p. 173-7.

87. Wu, K and B Bonavida, The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Crit Rev Immunol*, 2009. 29(3): p. 241-54.
88. Martinho, O, et al., Downregulation of RKIP is associated with poor outcome and malignant progression in gliomas. *PLoS ONE*, 2012. 7(1): p. e30769.
89. Ju, W, et al., Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays. *Oncol Res*, 2009. 18(2-3): p. 47-56.
90. van der Heul-Nieuwenhuijsen, L, NF Dits, and G Jenster, Gene expression of forkhead transcription factors in the normal and diseased human prostate. *BJU Int*, 2009. 103(11): p. 1574-80.
91. Pierrou, S, et al., Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *Embo J*, 1994. 13(20): p. 5002-12.
92. Smith, KS, et al., Disrupted differentiation and oncogenic transformation of lymphoid progenitors in E2A-HLF transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(6): p. 4443-51.
93. Shaulian, E and M Karin, AP 1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001. 20(19): p. 2390-400.
94. Schreiber, M, et al., Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 1999. 13(5): p. 607-19.
95. Wilson, RE, et al., Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells. *Oncogene*, 1993. 8(12): p. 3229-37.
96. Liu, Y, et al., Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene*, 2002. 21(50): p. 7680-9.
97. Libermann, TA and LF Zerbini, Targeting transcription factors for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2006. 6(1): p. 17-33.
98. Wieser, R, The oncogene and developmental regulator EVI1: expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene*, 2007. 396(2): p. 346-57.
99. Koos, B, et al., The transcription factor evi-1 is overexpressed, promotes proliferation, and is prognostically unfavorable in infratentorial ependymomas. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(11): p. 3631-7.
100. Zardo, G, et al., Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet*, 2002. 32(3): p. 453-8.
101. Zhao, LY, et al., An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9445-52.
102. Liao, D, Emerging roles of the EBF family of transcription factors in tumor suppression. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(12): p. 1893-901.
103. Wang, H, et al., C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*, 2001. 8(4): p. 817-28.
104. Pabst, T, et al., Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*, 2001. 27(3): p. 263-70.
105. Yoon, K and RC Smart, C/EBPalpha is a DNA damage-inducible p53-regulated mediator of the G1 checkpoint in keratinocytes. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(24): p. 10650-60.
106. Thompson, EA, et al., C/EBPalpha expression is downregulated in human nonmelanoma skin cancers and inactivation of C/EBPalpha confers susceptibility to UVB-induced skin squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol*, 2011. 131(6): p. 1339-46.
107. Ravanpay, AC and JM Olson, E protein dosage influences brain development more than family member identity. *J Neurosci Res*, 2008. 86(7): p. 1472-81.
108. Uittenbogaard, M and A Chiaramello, Expression of the bHLH transcription factor Tcf12 (ME1) gene is linked to the expansion of precursor cell populations during neurogenesis. *Brain Res Gene Expr Patterns*, 2002. 1(2): p. 115-21.
109. O'Neil, J, et al., TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell*, 2004. 5(6): p. 587-96.

110. Riemenschneider, MJ, TH Koy, and G Reifenberger, Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol*, 2004. 107(3): p. 277-82.
111. Shu, HK, et al., The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(24): p. 14453-8.
112. Rubel, A, et al., The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. *Radiat Oncol*, 2006. 1: p. 6.
113. Honda, N, et al., Radiosensitization by overexpression of the nonphosphorylation form of IkappaB-alpha in human glioma cells. *J Radiat Res*, 2002. 43(3): p. 283-92.
114. Yamagishi, N, J Miyakoshi, and H Takebe, Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol*, 1997. 72(2): p. 157-62.
115. Struhl, K, Gene regulation. A paradigm for precision. *Science*, 2001. 293(5532): p. 1054-5.
116. Chen, X, et al., Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells  
Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Cell*, 2008. 133(6): p. 1106-17.

**ANEXO 4 – Artigo submetido:**

Transcript profiles of gamma-irradiated glioblastoma cell lines that are mutant or wild-type for TP53



**Mutation Research - Genetic Toxicology  
and Environmental Mutagenesis**

A section of Mutation Research

**TRANSCRIPT PROFILES OF GAMMA-IRRADIATED GLIOBLASTOMA CELL  
LINES THAT ARE MUTANT OR WILD-TYPE FOR *TP53* GENE**

Godoy, PRDV<sup>1</sup>; Mello, SS<sup>1</sup>; Magalhães, DAR<sup>1</sup>; Donaires, FS<sup>1</sup>; Nicolucci, P<sup>2</sup>;  
Donadi, EA<sup>3</sup>; Passos, GA<sup>1,4</sup>; Sakamoto-Hojo, ET,<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto-FMRP-USP;

<sup>2</sup>Department of Physics and Mathematics-FFCLRP-USP; <sup>3</sup>Department of Medical

Clinic-FMRP-USP; <sup>4</sup>Faculty of Dentistry-FORP-USP, <sup>5</sup>Department of Biology,

Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto (FFCLRP-USP),

University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

**Corresponding author**

Elza Tiemi Sakamoto-Hojo, Department of Biology – Faculty of Philosophy,  
Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão  
Preto, SP; Av. Bandeirantes, 3900 – 14040-901 – Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55  
16 3602 3827 / Fax: +55 16 3602 0222. E-mail address: [etshojo@usp.br](mailto:etshojo@usp.br)

## ABSTRACT

The genetic heterogeneity presented by different cell lines derived from glioblastoma (GBM) seems to influence the responses to antitumoral agents. Although GBM tumors present several genomic alterations, it has been assumed that *TP53* gene, frequently mutated in GBM, may be to some extent responsible for differences in cellular responses to antitumor agents, but this is not clear yet. To test this hypothesis, we aimed to analyze how *TP53* status influence transcript profiles (DNA microarray method) displayed by irradiated (8 Gy of gamma-rays) GBM cell lines. We studied MT (T98G; U251MG) and WT (U343MG-a; U87MG) cell lines, which are mutant (MT) and wild-type (WT) for *TP53* gene, respectively. Transcript profiles displayed by cells analyzed at 30 min. and 6h after irradiation showed a higher number of significant (SAM; FDR ≤ 0.05) differentially expressed genes in WT (240 and 236, respectively), compared with MT cells (19 and 59, respectively). Transcription, intracellular signaling cascade and macromolecule metabolic process were biological classes preferentially affected in WT, but not in MT cells. However, most of the differentially expressed genes did not present the *TP53* binding site, suggesting that transcription factors downstream *TP53* should be acting in the regulation of gene expression, as well as other mechanisms of transcription regulation. By using the real time qPCR method, the expression analysis showed an up-regulation of *EIF2B5* and *DUSP22*, and a down-regulation of *RAD51LI*, *TRAP1*, *FANCG* and *CUGBP1*, relatively to control levels. As a whole, we showed that *TP53* mutation influences radiation responses measured as transcript profiles, although GBM cells are still capable of activating alternative pathways towards survival and maintenance of cell proliferation.

**Keywords:** Glioblastoma, ionizing radiation, *TP53*, DNA repair, DNA microarrays, DNA damage.

## 1 INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and fatal brain tumor, and despite aggressive surgery, radiation and chemotherapy, the median survival of patients with GBM remains only 12–15 months [1]. Although radiotherapy has been found to significantly prolong survival rates for GBM patients, radioresistance is a typical characteristic of GBM tumors [2]. The principle of radiotherapy resides on the fact that radiation induces DNA lesions, including single-strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs), which can lead to cell death, but repair of these lesions plays a critical role in tumor survival and proliferation [3]. Homologous Recombination Repair (HRR) and Non-Homologous End Joining (NHEJ) are very important mechanisms of DSBs repair in irradiated cells [4, 5]. Unrepaired DSBs can lead to cell cycle blockage, apoptosis and cellular senescence [4], and DSB repair has been intensively studied to clarify the mechanisms underlying radiation responses in several cell types.

Radiation induced DNA damage, among other types of cellular stresses, also interferes on the expression of TP53 proteins regulating target genes that induce cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism [6, 7]. TP53 acts as a tumor repressor, mainly by binding to target genes to regulate their expression [8]. Among numerous chromosomal and gene alterations, primary GBM presents *TP53* mutations in 31% of cases [9]. Data on the significance of *TP53* alterations as predictive factor for survival in GBM patients are contradictory. While some studies displayed no relationship between *TP53* status and the outcome of GBM patients [10-12], several reports showed that mutation on *TP53* gene is a favorable prognostic factor [9, 13, 14].

In order to improve the survival rate of GBM patients, a better insight into the molecular mechanisms underlying the development of these malignant tumors is needed [15], since GBMs are capable of activating several mechanisms, including signal transduction pathways that suppress apoptosis, as well as pathways that enhance proliferation and angiogenesis [16]. The use of microarrays technology could help to measure the transcript expression of thousands of genes to identify changes in expression between different biological conditions [17-21], being possible to compare cell lines exhibiting different genetic background and submitted to drug treatment or radiation exposure. This approach is interesting especially in case of GBM, since it is assumed that different combinations of mutated genes in these cells may result in different responses to antitumor therapies [22]. The influence of *TP53* status on transcriptional profiles was previously described in tumor cell lines [23, 24]. Although there is a report on GBM cell response to radiation [25], still

remains a lack of information regarding the signaling pathways affected by radiation exposure, and whether the *TP53* status may influence the transcriptional response of irradiated GBM cells.

In the current study, we tested the hypothesis that *TP53* mutation in GBM cells, at some extent, influence expression profiles in response to irradiation. We aimed to analyze the influence of *TP53* status on transcript profiles (using the cDNA microarray method) displayed by WT and MT *TP53* GBM cell lines exposed to ionizing radiation.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 GBM cell lines

Human GBM T98G (T98) and U87MG (U87) cell lines were supplied by the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) and gently donated by Dr. Mari C. Sogayar (Universidade de São Paulo, Brazil). U343MG-a (U343), a cell line established from a primary glioblastoma multiforme in an adult [26], was kindly donated by Dr. James T. Rutka (The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Center, Canada); U251MG (U251) cell lines was also purchased from the ATCC and gently donated by Dr. Guido Lenz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) [27]. T98G and U251MG cell lines harbor four mutations (*TP53*, *p16*, *PTEN* and *p14ARF*) while U343MG-a and U87MG cells are wild type (WT) for *TP53*, and mutant (MT) for *p16*, *PTEN* and *p14ARF* genes [28]. The *TP53* mutations in U251 and T98 cell lines are located at the codons 273 (Arg→ His homozygous) and 237 (Met→Ile), respectively [28].

### 2.2 Cell culture and irradiation

All cell lines were kept frozen in liquid nitrogen, and for the experiments, they were grown in the presence of DMEM + HAM F10 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) plus 10% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), and kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, until they reach semiconfluency. Cells were sub-cultured and 1x10<sup>6</sup> cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks, being incubated at 37°C for 48 h, and irradiated with 8 Gy of gamma-rays (<sup>60</sup>Co source, dose rate of 2.0 Gy / min., Unit Gammatron S-80, Siemens, 1.25 MeV, HC-FMRP/USP). The irradiated cells and controls were harvested at different times, depending on the assay. Previously, we performed clonogenic survival assays for several radiation doses, from 2 to 16 Gy, and we found that for 8 Gy,

survival rates varied from 1 to 16% for all four cell lines tested in the present work. Similar results were obtained by other authors [29-31].

### **2.3 Total RNA extraction**

Total RNA extraction was performed for all cell lines, 30 min. and 6 h after irradiation, using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The quality of RNA samples was evaluated by denaturing agarose gel electrophoresis under standard conditions. To remove the contaminating DNA, RNA samples used in cDNA microarrays were treated with the Deoxyribonuclease I (Amplification Grade kit, Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

### **2.4 cDNA microarray method**

Two experiments with irradiated and sham-irradiated GBM cells were carried out using a glass slide microarrays containing 4500 clones of cDNA probe (in replicates) from the human IMAGE Consortium cDNA library [32]; kindly provided by Dr. Catherine Nguyen (INSERM-CNRS, Marseille, France)], and prepared according to the protocol described by Hegde *et al* [33].

Microarrays were spotted onto glass slides (Corning, Lowell, MA, USA) by using a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each cDNA sample was spotted twice in the slide (duplicate spots). The cDNA complex probes were prepared using the CyScribe Post Labeling Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described [22]. Hybridizations were carried out using an automatic system (Automatic Slide Processor, Amersham Biosciences) and signals were immediately captured after the final wash procedure, using a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences). This array platform was already used in several studies [19-21, 23, 24, 34].

### **2.5 Data acquisition and gene expression analysis**

Data filtering and normalization were performed using the R statistical environment [35] and functions of the microarray packages Limma [36], AROMA [37], Bioconductor [38], and KTH; according to KTH recommendations [39], with few modifications. The median pixel value in the background region (around the spot) plus two fold the standard deviation of the background pixels (determined by SPOT software) were subtracted from the expression value for each gene. Moreover, genes were filtered based on correlation between the mean and median of spots pixels, in addition to their size and the circularity of spots. Microarray data for samples for which the number of filtered

features was greater than 30% were not used in the analysis, due to their low correlation with other samples of the same batch. The raw data for the red (R) and green (G) channels were transformed into MA format before normalization, where  $M = \log_2(R/G)$  and  $A = 1/2 \times \log_2(R \times G)$ . This transformation was followed by within-array normalization and applied a print-tip lowess method, correcting a variety of spatial and intensity-dependent biases. Furthermore, data normalization was achieved by applying the re-scaling of M values, centering the M distribution on median absolute deviation value and correcting differences in the spread of intensity log ratios [40]. Following the normalization procedure, microarray data were exported to tab-delimited tables in MEV format and analyzed in MeV (MultiExperiment Viewer) (v. 3.1) software [41].

Briefly, two kinds of comparisons were performed. The gene set submitted to SAM - Significance Analysis of Microarray [17] was previously obtained by a t-test ( $\alpha=5\%$ ) comparing irradiated (8 Gy) versus unirradiated (controls) WT *TP53* cell lines and independently, *TP53* MT cell lines. This gene set was also submitted to hierarchical clustering analysis. Clustering analysis was performed according to the genes and samples, using the uncentered Pearson's correlation as distance metric and average linkage clustering as linkage method. Cluster analysis was performed using normalized values, and duplicate data (left and right sides of the slide) were used to improve the gene clustering. Only sample clustering will be displayed. Additional analysis was performed for each cell line (control x 8 Gy), using SAM (unshown data).

Every modulated gene was compared to a list of previously identified genes with TP53 binding sites using a genome wide tiling Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip approach [45] or (ChIP) with the paired-end ditag (PET) [42] aiming to point out genes that could be modulated by TP53 transactivation.

Information regarding biological functions were obtained at S.O.U.R.C.E. [43], and PubMed [44]. For each gene, functional groups were given by DAVID tool [45], choosing the *Homo sapiens* as current background, Gene Ontology: GOTERM\_BP\_FAT and OMIM\_Disease as parameters, as well as the Functional Annotation Chart as the analyzing tool. Therefore, we selected the main biological functions associated with the differentially expressed genes.

## 2.6 Quantitative real-time PCR (qPCR)

For four genes, we used the quantitative real-time PCR to confirm the expression profiles obtained for each cell line (irradiated *versus* sham-irradiated cells as follow: *CUGBP1* (U343, 30 min, Co x 8Gy), *FANCG* (U343, 30 min, Control x 8Gy), *RAD51L1* (U343, 30 min, Control x 8Gy), *TRAPI* (U87, 30 min, Control x 8Gy), *EIF2B5* (U87, 30 6h, Control x 8Gy) and *DUSP22* (U87, 6h,

Control x 8Gy). The reverse transcription step was carried out in the remaining RNA samples from microarray experiments, with the Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. The integrity of cDNA samples was validated by the amplification of the endogenous GAPDH gene and visualization in agarose gel electrophoresis. qPCR was carried out using SYBR green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the expression levels were estimated by the Relative Expression Software Tool (REST) [46]. All primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) were designed in Primer3 software [51] and are displayed on **Table 1**. The reactions were carried out in the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) equipment, using primer sets with an annealing temperature near 60°C and an amplicon of 100–120 bp. The PCR cycle was the following: pre-heating at 50°C for 2 min., 10 min. at 95°C (denaturation step), followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec., and at 60°C for 60 sec. The dissociation curves were set up as following: 95°C for 15 sec., 60°C for 20 sec. and 95°C for 15 sec.

### 3 RESULTS

The hierarchical clustering analysis allowed to compare irradiated and sham-irradiated WT and MT *TP53* GBM cells regarding transcript profiles obtained at 30 min. and 6 h following irradiation, using sets of significant differentially expressed genes previously selected by the t-test ( $\alpha=0.05$ ), and then submitted to SAM analysis, considering a FDR (False Discovery Rate)  $\leq 5\%$ . The results showed expression patterns that clearly distinguish irradiated from non-irradiated cells. In sham-irradiated cells, there was a separation between both cell lines in WT (U87 and U343) and MT (T98 and U251) in the cluster, except for WT *TP53* cells (30 min.). However, the same was not observed for irradiated cells, since samples of both cell lines, WT or MT, were clustered together, indicating similarities in the expression profiles, except for WT *TP53* cells (6 h) that presented a clear separation of irradiated cell lines (**Fig. 1**).

The statistical analysis performed by SAM indicated that WT *TP53* cell lines showed 240 significant differentially expressed genes (5 up-regulated and 235 down-regulated) at 30 min. after irradiation, while the MT *TP53* cells showed 19 genes (9 up-regulated and 10 down-regulated) at the same conditions. WT cells analyzed at 6 h post irradiation showed a list of 236 modulated genes (74 up-regulated and 162 down-regulated), while MT cells presented 59 modulated genes (16 up-regulated and 43 down-regulated). The magnitude of changes observed for differentially expressed

genes in MT *TP53* cells ranged from +2.2 to -1.41 (fold-change values) and from +1.56 to -1.89 in WT *TP53* cells (**Table 2**). We construct a Venn diagram to provide a quantitative representation of differences and similarities of expression profiles obtained for different cell lines based on the *TP53* status and harvesting time (30 min. and 6 h) following irradiation (**Fig. 2**). We found 206 and 204 exclusively modulated genes for WT *TP53* (30 min. and 6 h, respectively), and 17 and 47 genes for MT *TP53* (30 min. and 6 h, respectively). Only 25 genes were common between WT *TP53* cells analyzed at 30 min. and 6 h. Interestingly, *SLC6A1* was the unique gene that was found modulated at three conditions: MT and WT *TP53* at 6 h, and MT *TP53* cells at 30 min. Therefore, the analysis of expression profiles indicated that irradiated WT *TP53* cell lines, compared with MT cells, displayed higher numbers of exclusive differentially expressed genes, and they shared only few genes, thus indicating the importance and influence of *TP53* mutation. Common differentially expressed genes observed between two cell lines (MT or WT) analyzed at two collection times (30 min. and 6 h) were mostly found in WT (25 genes), but not in MT *TP53* cells; out of these genes, 21 (such as *MOBP*, *BASPI*, *PPP6C*, *ATP7B*, *DUSP4* and *BRCA1*) were down-regulated at both time-point analyzed (**Table 3**). Differently, eight genes (*IGSF1*, *CWC15*, *MBNL2*, *NPAS2*, *IMAGE 143028*, *IMAGE 144821* and *BTRC*) were down-regulated in WT cells (at early time, 30 min.), as well as in MT *TP53* cells (6h), suggesting a lack of their association with *TP53* mutation. Only one gene (*S100P*) was shared between irradiated WT and MT *TP53* cells (30 min.), and it was down-regulated and up-regulated, respectively. The *NNT* gene was up-regulated in MT *TP53* cells (30 min.) and down-regulated in WT *TP53* ones (6 h) while *GRIP1* and *NRN1* were down-regulated in WT and up-regulated in MT *TP53* cells at 6 h, and *AKAP11* was up-regulated in WT (6h) and down-regulated MT (6h) (**Table 3**).

For the list of differentially expressed genes, biological gene functions were studied by DAVID-NIH [52, 53], and several functions were found affected in GBM cell lines, such as DNA repair, transcription, apoptosis, metabolic process, cellular response to stress, cell-cell adhesion, cell cycle, cell differentiation, and cell motion/ locomotory behavior (**Table-4; Fig.3**). However, WT cells presented a great number of functions, compatible with the high amount of differentially expressed genes; the most representative class (number of genes > 20) was transcription, followed by other three classes (number of genes > 15): intracellular signaling cascade, macromolecule metabolic process, and cellular response to stress (**Fig.3**). Interestingly, DNA repair/stress response genes were not found in MT *TP53* cells after irradiation.

We also compared each differentially expressed gene (SAM) with lists of empirically identified genes that present TP53 binding-sites, provided by ChIP-PET and ChIP-on-chip analysis

[42, 47]. When comparing our gene lists with ChIP- PET gene lists, we observed only 5 common genes. *BCAS3*, *BCL2A1* and *FRMD4A* were down-regulated and *EEA1* was up-regulated in WT *TP53* GBM cells, while *GSTP1* was down-regulated in MT *TP53* cells. On the other hand, the comparison comprising the gene list of the present study with the ChIP-on-chip list generated a list of 22 common genes (**Table 5**). Among them, only two genes in MT *TP53* cells were also present in the ChIP-on-chip; these genes were *IFT74* (down-regulated) and *CYP26B1* (up-regulated). The remaining 20 genes found in WT *TP53* cells were also present in the ChIP-on-chip list. Among them, only *ME3* and *NTRK2* were up-regulated at 30 min., and the remaining 18 genes were down-regulated. Here, in general, we did not find an influence of *TP53* on its direct targets, and most of genes that presented *TP53* binding sites were down-regulated in WT *TP53* cells.

By using the real time qPCR method, we confirmed the expression levels of six genes *CUGBP1* (U343, 30 min, Control x 8Gy), *FANCG* (U343, 30 min, Control x 8Gy), *RAD51L1* (U343, 30 min, Control x 8Gy), *TRAPI* (U87, 30 min, Control x 8Gy), *EIF2B5* (U87, 30 6h, Control x 8Gy) and *DUSP22* (U87, 6h, Control x 8Gy), using the same RNA samples that were used in microarray experiments. The expression analysis showed an up-regulation of *EIF2B5* and *DUSP22*, and a down-regulation of *RAD51L1*, *TRAPI*, *FANCG* and *CUGBP1*, relatively to control levels (**Fig. 4**), thus indicating similar results between both methods of transcript expression analysis.

#### 4 DISCUSSION

Radiation therapy is still very important for patients with GBM, but there is still a lack of information on how the genetic background of GBM tumors can influence the cell response to irradiation. In the current study, we tested whether the *TP53* mutation in GBM cell lines is responsible for differences in transcript expression profiles in response to irradiation using the microarray method, respectively.

We performed the hierarchical clustering analysis to compare irradiated and sham-irradiated WT and MT *TP53* GBM cells regarding transcript profiles displayed by these cells. The clustering analysis showed a clear distinction between irradiated and non-irradiated cells, but an absence of cell line separation among irradiated samples in almost all situations, indicates similarities of expression profiles between cell lines that present the same *TP53* status (**Fig. 2**). In a previous work, using a set of genes previously selected by the SAM analysis [23], we showed that MT *TP53* cells were grouped

apart from the WT *TP53* cells, but while the mutant cell lines (T98G and U251) were not separated within a gene cluster, indicating more similarity in the basal transcription levels between cell lines, in contrast, the proficient cell lines (U87 and U343) were clustered apart from each other. These results also pointed the potential of the DNA microarray analysis to distinguish transcript profiles displayed by GBM cell lines presenting similar mutational background for *p14ARF*, *p16INK4a* and *PTEN* genes, but with different *TP53* status.

Analysis of expression profiles indicated that only a small percentage of genes were shared between irradiated GBM samples, either WT or MT *TP53* cells, as illustrated in the Venn diagram (**Fig. 3**). While the two WT *TP53* irradiated cells shared 25 common genes, with similar pattern of expression (down-regulation) at both analyzed time points. Among them, *BRCA1* was down-regulated only in irradiated WT cells; this gene plays critical roles in DNA repair, cell cycle checkpoint, and maintenance of genomic stability [61]; most probably, its expression can be affected by the *TP53* mutation in MT GBM cells. In contrast, *S100P* gene was found down-regulated in WT and up-regulated in MT *TP53* cells (30 min.), while three genes, *GRIP1*, *NRN1* and *NNT* were down-regulated in WT and up-regulated in MT *TP53* cells (30 min. or 6 h); on the opposite, only one gene (*AKAP11*) showed an up-regulation in WT and down-regulation in MT *TP53* cells (6h) (**Table 3**). These genes presenting opposite response in WT and MT *TP53* cells regarding transcript expression might reflect the influence of the *TP53* status, although other factors inherent to the genetic background of GBM cells should exist in the complex signaling cascade involving radiation responses.

In the present study, biological functions (DAVID-NIH) attributed to the differentially expressed genes showed differences between cell lines differing in *TP53* status, especially due to the high number of significant genes in WT, compared with MT *TP53* cells. The most representative classes found in WT cells were transcription and intracellular signaling cascade, followed by DNA repair, macromolecule metabolic process, and cellular response to stress and behavior (**Fig. 4**). According to the literature, it has been reported that in general, cell responses to ionizing radiation involve the participation of a cascade of genes acting in concert, whose products may play a role in a broad spectrum of activities, including DNA repair, cell cycle control, apoptosis, transcription, metabolic process, etc. [18, 29, 34, 48-50]. However, the present results indicate how the differentially expressed genes are distributed into biological classes in irradiated GBM cell lines, and pointed some classes that are preferentially affected in WT *TP53* cells; conversely, radiation responses displayed by MT *TP53* cells involve a small number of genes/biological classes, and DNA repair/stress response genes were not found as differentially expressed. The analysis performed in this

work shows the genes/ biological functions that are common to groups of cells (WT or MT TP53 cells), not individually.

The up-regulation of genes controlling transcription after irradiation was also reported in GBM cell lines [18-20, 25]. Most of the zinc finger genes that act as transcription factors were found down-regulated: *ZNF630*, *ZNF827* and *ZNF692* for WT *TP53* (30 min.) and *ZNF630* and *ZNF250*, for WT *TP53* (6h). Only *ZNF250* gene was up-regulated. *ZNF630* was commonly down-regulated in WT *TP53* 30 min. and 6h after IR; this gene is expressed in adult brain and during fetal development [51].

Interestingly, genes playing roles in DNA repair/recombination were modulated following irradiation, but only in WT *TP53* cells. Down-regulated repair genes (30 min.) are involved in HRR (*BRCA1*, *RAD51L1*, *RAD51API*, *RAD51L3*, *FANCG* and *RAD52*), DNA damage recognition (*ATM*), NHEJ (*XRCC4*) and NER (*XPA* and *ERCC5*). *RAD51L1* and *FANCG* were also found down-regulated by qPCR (Fig. 5). *RAD51* gene also plays an important role in the resistance of glioma to both gamma-irradiation and temozolomide, becoming a promising target for combined therapies [52]. After 6 h, *ERCC3* and *CHAF1B* (NER) and *NSMCE2*, and *BRCA1* (HRR) were down-regulated, while *CHAF1B* and *NSMCE2* were up-regulated.

Therefore, in general, several genes belonging to different repair pathways were down-regulated in irradiated GBM cell lines, with few exceptions. Other authors reported an up-regulation of NHEJ and HRR genes in WT *TP53* GBM cells observed at similar collection times [25, 29]. However, the lack of expression or the repression of DNA repair genes does not necessarily mean that cells are not sensitive to treatment [53], or the lack of involvement of DNA repair genes.

This conflicting picture mentioned above may be related to different experimental conditions and peculiar characteristics of each cell line tested; but it can also be due to the existence of several genes or gene products that act in the same pathway and may replace each other.

Fourteen cell cycle/DNA repair genes were also affected in WT *TP53* cells (30 min.). The down-regulated genes, *RAD52*, *RAD51L1* and *RAD51L3*, are involved in HRR, which is dependent on the S/G2 checkpoint [54]. *ANLN* gene, involved in cytokinesis [55] and overexpressed in many tumors [56], was up-regulated in MT *TP53* cells (6 h). In the current study, thirteen differentially expressed genes were related to apoptosis in WT *TP53* cells (30 min.) (Table 4). Some down-regulated genes are related to FAS mediated apoptotic pathway, such as *FAS* and *DAPK2* [57, 58], and apoptosis resistance in GBM cells, represented by *NFKB1* [59, 60]. *BCL2A1*, a pro-survival gene that is a direct transcriptional target of NFKB and plays a role in oncogenesis and resistance to therapy [61], was down-regulated, as well as other six genes (*VAV3*, *PAK2*, *MADD*, *TNFRSF12A*,

*BCL2A1*, *MAGEH1* and *BRCA1*) that are also involved in apoptosis in WT *TP53* cells (6 h); most probably, genes related to apoptosis control presented early response to irradiation, mainly to guarantee survival in GBM cells, since it is known that, in general, these cells are very resistant to undergo apoptosis, even under conditions of drug treatment or radiation exposure [59, 60, 62].

Another important biological function that presented significant modulated genes was cell adhesion, and this process can be associated with acquired chemo- and radioresistance [63]. Both WT and MT *TP53* cells (6 h) presented modulated genes involved with cell adhesion, such as *ROBO1* (WT cells) and *BMPRI1* (MT cells). If cell adhesion is compromised, cancer cells have the opportunity to metastasize and invade other areas of the body.

GBM does not commonly metastasize outside of the central nervous system [64], but are highly proliferative and invasive within the brain [65, 66]. Interestingly, cell motion/ locomotory behavior were functions associated to modulated genes in WT and MT *TP53* irradiated cells. *FER* and *VAV3*, both up-regulated in WT *TP53* cells (6 h), and *TLN1*, up-regulated in MT *TP53* (30 min.) were already reported to be involved in cell migration and invasion [67-69]. *S100P* gene was down-regulated in WT *TP53* and up-regulated in MT *TP53* cells (30 min.). This gene is functionally involved in invasion and metastasis, and was found expressed in different tumors [24, 58, 70-72].

Many *TP53* targets have been described [49, 50, 73, 74], and some of them have been computationally predicted by the analysis of their binding sites [47, 75, 76]. We compared every differentially expressed gene (SAM) with lists of empirically identified genes that present *TP53* binding-sites, provided by ChIP-PET and ChIP-on-chip analysis [42, 47]. When comparing our gene lists with ChIP- PET gene lists, we observed only 5 common genes, while the comparison with the ChIP-on-chip gene lists, there were 22 common genes (**Table 5**). Most of the common genes to ChIP-on-chip and ChIP-PET gene lists was related to irradiated WT *TP53* cells (16 down-regulated and 2 up-regulated), while only 4 genes were related to irradiated MT *TP53* cells (3 down-regulated and 1 up-regulated). Even down-regulated genes could be influenced by the *TP53* transcription factor, as already reported [77]. The number of common genes between our gene list and the predicted genes with *TP53* binding-sites was smaller than expected. Besides we did not find modulation of *TP53* gene itself in WT cells after irradiation, suggesting that other kind of interference may block the signaling pathways due to the existence of other mutations in these cell lines.

The majority of genome-wide *TP53* target sites can also be bound by overexpressed p63 and p73 *in vivo*, suggesting that these genes may possibly play an important role related to *TP53* binding sites [47], and this should also be considered to explain the results.

It was already demonstrated that MT TP53 protein has a gain of function property reaching specific DNA targets, either through protein-protein interactions with other transcription factors, or via p63/p73-guided interactions [78-80]. However, it is not clear if the *TP53* mutations on T98 and U251 are associated with MT TP53 gain of function, since we found just few expressed genes that present TP53 binding sites. Most probably, most of the differentially expressed genes in WT TP53 cells are not directly involved with the function of TP53 as a transcription factor. However, TP53 could act at level of other transcription factors, thus regulating the expression of a series of genes.

According to the literature data, there are controversial findings. *TP53* status may positive or negatively influences the cell radioresistance, as well as exerts no influence in cellular responses to therapies [71, 72, 81]. Da Silva et al., [24] did not observe influence of *TP53* status in bladder cancer cell lines. Here, we find a weak influence of TP53 on its direct targets, based on TP53 binding-sites; we also found few transcriptional signatures that were common between irradiated WT and MT *TP53* GBM cells, indicating that there are at least some pathways (associated to common genes) involving cellular responses to irradiation that are independent on *TP53* status. However, interestingly, our findings also indicate that there are several pathways in radiation responses of GBM cell lines that are dependent on the *TP53* status, since differences in transcriptional responses for some genes (*S100P*, *GRIP1*, *NRN1*, *NNT* and *AKAP11*) displayed by MT and WT *TP53* GBM cell lines may indicate an influence of *TP53* mutation in radiation responses. In addition, the higher number of differentially expressed genes in WT, compared with MT cells, strongly indicates the influence of *TP53* mutation in radiation responses in terms of gene expression profiles. Furthermore, some biological classes, such as transcription and intracellular signaling cascade, were preferentially affected in WT *TP53* cells, while radiation responses displayed by MT *TP53* cells involve a small number of genes/biological classes, and DNA repair/stress response genes were not found as differentially expressed in MT cells.

Altogether, the present results showed that WT *TP53* cells presented a high number of genes involved in transcription and intracellular signaling cascade, but other processes (apoptosis, DNA repair/stress response, metabolic process, cell cycle, cell adhesion) were represented by variable number of genes in WT and few genes in MT *TP53*, depending on the collection time. Our findings also indicate that there are some pathways in radiation responses of GBM cell lines that were modulated according to the *TP53* status, although only few common genes were found between our gene list and the predicted genes with TP53 binding-sites. In addition to the existence of other mechanisms of transcription regulation, we also should consider the influence of the genetic heterogeneity of GBM cells, which leads to a great complexity of transcriptional responses after

irradiation, and alternative signaling pathways conferring survival of GBM cells. The most intriguing fact is that, even so, a considerable proportion of cells (independent on the cell line) can escape to the lethal effects of ionizing radiation, by activating several alternative pathways towards survival and maintenance of cell proliferation.

### Funding

This work was supported by FAPESP - *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* [2006/01953-8, 2006/01947-8 and 2004/15611-6], CNPq - *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* and CAPES - *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*.

### Acknowledgements

We would like to thank Z. P. Simões and M.M.G. Bitondi for the support regarding the use of equipment facilities and S.A. Neves and L.A. Costa for routine technical assistance.

## 5 REFERENCES

- [1] H. Ohgaki, P. Kleihues, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *Am J Pathol*, 170 (2007) 1445-1453.
- [2] R. Stupp, M.E. Hegi, M.R. Gilbert, A. Chakravarti, Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions, *J Clin Oncol*, 25 (2007) 4127-4136.
- [3] M. Belli, O. Sapora, M.A. Tabocchini, Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection, *Journal of radiation research*, 43 Suppl (2002) S13-19.
- [4] J. Bartek, J. Lukas, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr Opin Cell Biol*, 19 (2007) 238-245.
- [5] A. Pastink, J.C. Eeken, P.H. Lohman, Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks, *Mutat Res*, 480-481 (2001) 37-50.
- [6] F. Toledo, G.M. Wahl, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas, *Nat Rev Cancer*, 6 (2006) 909-923.
- [7] K.H. Vousden, D.P. Lane, p53 in health and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2007) 275-283.
- [8] H. Zhao, H. Piwnica Worms, ATR mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1, *Mol Cell Biol*, 21 (2001) 4129-4139.
- [9] H. Ohgaki, Genetic pathways to glioblastomas, *Neuropathology*, 25 (2005) 1-7.
- [10] T.T. Batchelor, R.A. Betensky, J.M. Esposito, L.D. Pham, M.V. Dorfman, N. Piscatelli, S. Jhung, D. Rhee, D.N. Louis, Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma, *Clin Cancer Res*, 10 (2004) 228-233.
- [11] E.W. Newcomb, H. Cohen, S.R. Lee, S.K. Bhalla, J. Bloom, R.L. Hayes, D.C. Miller, M.L. Simmons, K.R. Lamborn, M. Takahashi, P. Chen, M.A. Israel, M.S. Berger, T. Godfrey, J. Nigro, M. Prados, S. Chang, F.G. Barker, 2nd, K. Aldape, Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes, *Brain Pathol*, 8 (1998) 655-667.
- [12] M.L. Simmons, K.R. Lamborn, M. Takahashi, P. Chen, M.A. Israel, M.S. Berger, T. Godfrey, J. Nigro, M. Prados, S. Chang, F.G. Barker, 2nd, K. Aldape, Analysis of complex relationships between

- age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients, *Cancer Res*, 61 (2001) 1122-1128.
- [13] J.S. Smith, I. Tachibana, S.M. Passe, B.K. Huntley, T.J. Borell, N. Iturria, J.R. O'Fallon, P.L. Schaefer, B.W. Scheithauer, C.D. James, J.C. Buckner, R.B. Jenkins, PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme, *J Natl Cancer Inst*, 93 (2001) 1246-1256.
- [14] V. Milinkovic, J. Bankovic, M. Rakic, N. Milosevic, T. Stankovic, M. Jokovic, Z. Milosevic, M. Skender-Gazibara, A. Podolski-Renic, M. Pesic, S. Ruzdijic, N. Tanic, Genomic instability and p53 alterations in patients with malignant glioma, *Experimental and molecular pathology*, 93 (2012) 200-206.
- [15] J. Perry, M. Okamoto, M. Guiou, K. Shirai, A. Errett, A. Chakravarti, Novel therapies in glioblastoma, *Neurology research international*, 2012 (2012) 428565.
- [16] E.A. Maher, F.B. Furnari, R.M. Bachoo, D.H. Rowitch, D.N. Louis, W.K. Cavenee, R.A. DePinho, Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter, *Genes Dev*, 15 (2001) 1311-1333.
- [17] V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 5116-5121.
- [18] E.T. Sakamoto-Hojo, S.S. Mello, E. Pereira, A.L. Fachin, R.S. Cardoso, C.M. Junta, P. Sandrin Garcia, E.A. Donadi, G.A.S. Passos, Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress, *Mutat Res*, 544 (2003) 403-413.
- [19] A.L. Fachin, S.S. Mello, P. Sandrin-Garcia, C.M. Junta, E.A. Donadi, G.A. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays, *Radiat Res*, 168 (2007) 650-665.
- [20] A.L. Fachin, S.S. Mello, P. Sandrin-Garcia, C.M. Junta, T. Ghilardi-Netto, E.A. Donadi, G.A. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation, *J Radiat Res (Tokyo)*, 50 (2009) 61-71.
- [21] P.O. Carminati, S.S. Mello, A.L. Fachin, C.M. Junta, P. Sandrin-Garcia, C.G. Carlotti, E.A. Donadi, G.A. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line, *Genet Mol Biol*, 33 (2010) 159-168.
- [22] J. Polivka, Jr., J. Polivka, V. Rohan, O. Topolcan, J. Ferda, New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme, *Anticancer Res*, 32 (2012) 2935-2946.
- [23] P.R.D.V. Godoy, S.S. Mello, D.A.R. Magalhães, F.S. Donaires, A.P. Montaldi, P. Nicolucci, E.A. Donadi, G.A.S. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Portrait of transcriptional expression profiles displayed by different glioblastoma cell lines, in: M. Garami (Ed.) *Molecular Targets of CNS Tumors*, InTech, Rijeka, 2011, pp. 277-300.
- [24] G.N. da Silva, A.F. Evangelista, D.A. Magalhaes, C. Macedo, M.C. Bufalo, E.T. Sakamoto-Hojo, G.A. Passos, D.M. Salvadori, Expression of genes related to apoptosis, cell cycle and signaling pathways are independent of TP53 status in urinary bladder cancer cells, *Mol Biol Rep*, 38 (2011) 4159-4170.
- [25] T. Otomo, M. Hishii, H. Arai, K. Sato, K. Sasai, Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes, *J Radiat Res (Tokyo)*, 45 (2004) 53-60.
- [26] M. Nister, C.H. Heldin, B. Westermark, Clonal variation in the production of a platelet-derived growth factor-like protein and expression of corresponding receptors in a human malignant glioma, *Cancer Res*, 46 (1986) 332-340.
- [27] E.C. Filippi-Chiela, E.S. Villodre, L.L. Zamin, G. Lenz, Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells, *PLoS ONE*, 6 (2011) e20849.

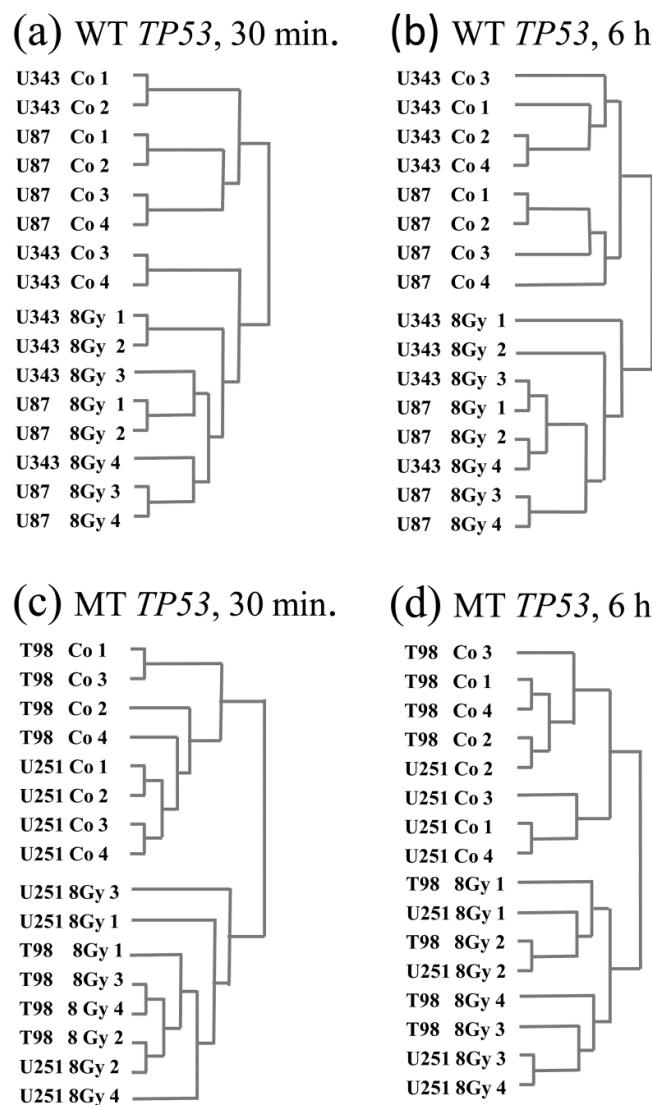
- [28] N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.C. Diserens, E.G. Van Meir, Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines, *Brain Pathol*, 9 (1999) 469-479.
- [29] C. Bassi, S. Mello, R. Cardoso, P. Godoy, A. Fachin, C. Junta, P. Sandrin-Garcia, C. Carlotti, R. Falcao, E. Donadi, G. Passos, E. Sakamoto-Hojo, Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation, *Hum Exp Toxicol*, 27 (2008) 919-929.
- [30] E. Chautard, G. Loubeau, A. Tchirkov, J. Chassagne, C. Vermot-Desroches, L. Morel, P. Verrelle, Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma, *Neuro Oncol*, 12 (2010) 434-443.
- [31] P.M. Chu, S.H. Chiou, T.L. Su, Y.J. Lee, L.H. Chen, Y.W. Chen, S.H. Yen, M.T. Chen, M.H. Chen, Y.H. Shih, P.H. Tu, H.I. Ma, Enhancement of radiosensitivity in human glioblastoma cells by the DNA N-mustard alkylating agent BO-1051 through augmented and sustained DNA damage response, *Radiat Oncol*, 6 (2011) 7.
- [32] G. Lennon, C. Auffray, M. Polymeropoulos, M.B. Soares, The I.M.A.G.E. Consortium: An Integrated Molecular Analysis of Genomes and Their Expression, *Genomics*, 33 (1996) 151-152.
- [33] P. Hegde, R. Qi, K. Abernathy, C. Gay, S. Dharap, R. Gaspard, J.E. Hughes, E. Snesrud, N. Lee, J. Quackenbush, A concise guide to cDNA microarray analysis, *Biotechniques*, 29 (2000) 548-550, 552-544, 556 passim.
- [34] S.S. Mello, A.L. Fachin, C.M. Junta, P. Sandrin-Garcia, E.A. Donadi, G.A. Passos, E.T. Sakamoto-Hojo, Delayed effects of exposure to a moderate radiation dose on transcription profiles in human primary fibroblasts, *Environ Mol Mutagen*, 52 (2011) 117-129.
- [35] T.R.P.f.S. Computing.
- [36] J.M. Wettenhall, G.K. Smyth, limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data, *Bioinformatics*, 20 (2004) 3705-3706.
- [37] H. Bengtsson, AROMA – An R-Object-oriented Microarray Analysis environment, Available at [http://www1.maths.lth.se/bioinformatics/publications/BengtssonH\\_2004-aroma.pdf](http://www1.maths.lth.se/bioinformatics/publications/BengtssonH_2004-aroma.pdf), (2004).
- [38] R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, J. Zhang, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol*, 5 (2004) R80.
- [39] V. Wirta, Lindberg, J. and Gry Björklund, M. , The kth-package for microarray data analysis, Available at <http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/>, (2004).
- [40] Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T.P. Speed, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) e15.
- [41] A.I. Saeed, V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Storn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, J. Quackenbush, TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis, *Biotechniques*, 34 (2003) 374-378.
- [42] C.L. Wei, Q. Wu, V.B. Vega, K.P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H.C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X.D. Zhao, J.L. Chew, Y.L. Lee, V.A. Kuznetsov, W.K. Sung, L.D. Miller, B. Lim, E.T. Liu, Q. Yu, H.H. Ng, Y. Ruan, A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome, *Cell*, 124 (2006) 207-219.
- [43] M. Diehn, G. Sherlock, G. Binkley, H. Jin, J.C. Matese, T. Hernandez-Boussard, C.A. Rees, J.M. Cherry, D. Botstein, P.O. Brown, A.A. Alizadeh, SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data, *Nucleic Acids Res*, 31 (2003) 219-223.
- [44] B.M.N.L.o.M. (US), PubMed

- [45] G. Dennis, Jr., B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, R.A. Lempicki, DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, *Genome Biol*, 4 (2003) P3.
- [46] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) e36.
- [47] L. Smeenk, S.J. van Heeringen, M. Koeppel, M.A. van Driel, S.J. Bartels, R.C. Akkers, S. Denissov, H.G. Stunnenberg, M. Lohrum, Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response, *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) 3639-3654.
- [48] E.T. Sakamoto-Hojo, S.S. Mello, C.L. Bassi, I.M. Merchi, P.O. Carminati, A.L. Fachin, E.A. Donadi, G.A.S. Passos, Genomic Instability:Signaling Pathways Orchestrating the Responses to Ionizing Radiation and Cisplatin, in: D.H. Lankenau (Ed.) *Genome Integrity: Facets and Perspectives*, Springer-Verlag Berlin / Heidelberg, Heidelberg, 2007, pp. 1861-3381.
- [49] H.F. Horn, K.H. Vousden, Coping with stress: multiple ways to activate p53, *Oncogene*, 26 (2007) 1306-1316.
- [50] O. Laptenko, C. Prives, Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities, *Cell Death Differ*, 13 (2006) 951-961.
- [51] D. Lugtenberg, L. Zangrande-Vieira, M. Kirchhoff, A.C. Whibley, A.R. Oudakker, S. Kjaergaard, A.M. Vianna-Morgante, T. Kleefstra, M. Ruiter, F.S. Jehee, R. Ullmann, C.E. Schwartz, M. Stratton, F.L. Raymond, J.A. Veltman, T. Vrijenhoek, R. Pfundt, J.H. Schuurs-Hoeijmakers, J.Y. Hehir-Kwa, G. Froyen, J. Chelly, H.H. Ropers, C. Moraine, J. Gecz, J. Knijnenburg, S.G. Kant, B.C. Hamel, C. Rosenberg, H. van Bokhoven, A.P. de Brouwer, Recurrent deletion of ZNF630 at Xp11.23 is not associated with mental retardation, *American journal of medical genetics. Part A*, 152A (2010) 638-645.
- [52] S.C. Short, S. Giampieri, M. Worku, M. Alcaide-German, G. Sioftanos, S. Bourne, K.I. Lio, M. Shaked-Rabi, C. Martindale, Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells, *Neuro Oncol*, 13 (2011) 487-499.
- [53] K.E. Rieger, G. Chu, Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells, *Nucleic Acids Res*, 32 (2004) 4786-4803.
- [54] L.H. Thompson, D. Schild, Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability, *Mutat Res*, 477 (2001) 131-153.
- [55] A.J. Piekny, M. Glotzer, Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis, *Curr Biol*, 18 (2008) 30-36.
- [56] P.A. Hall, C.B. Todd, P.L. Hyland, S.S. McDade, H. Grabsch, M. Dattani, K.J. Hillan, S.E. Russell, The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors, *Clin Cancer Res*, 11 (2005) 6780-6786.
- [57] N. Qian, D. Frank, D. O'Keefe, D. Dao, L. Zhao, L. Yuan, Q. Wang, M. Keating, C. Walsh, B. Tycko, The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis, *Hum Mol Genet*, 6 (1997) 2021-2029.
- [58] C. Choi, X. Xu, J.W. Oh, S.J. Lee, G.Y. Gillespie, H. Park, H. Jo, E.N. Benveniste, Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase, *Cancer Res*, 61 (2001) 3084-3091.
- [59] N. Honda, K. Yagi, G.R. Ding, J. Miyakoshi, Radiosensitization by overexpression of the nonphosphorylation form of IkappaB-alpha in human glioma cells, *Journal of radiation research*, 43 (2002) 283-292.
- [60] N. Yamagishi, J. Miyakoshi, H. Takebe, Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells, *Int J Radiat Biol*, 72 (1997) 157-162.
- [61] W.X. Zong, L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, C. Gelinas, The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis, *Genes Dev*, 13 (1999) 382-387.

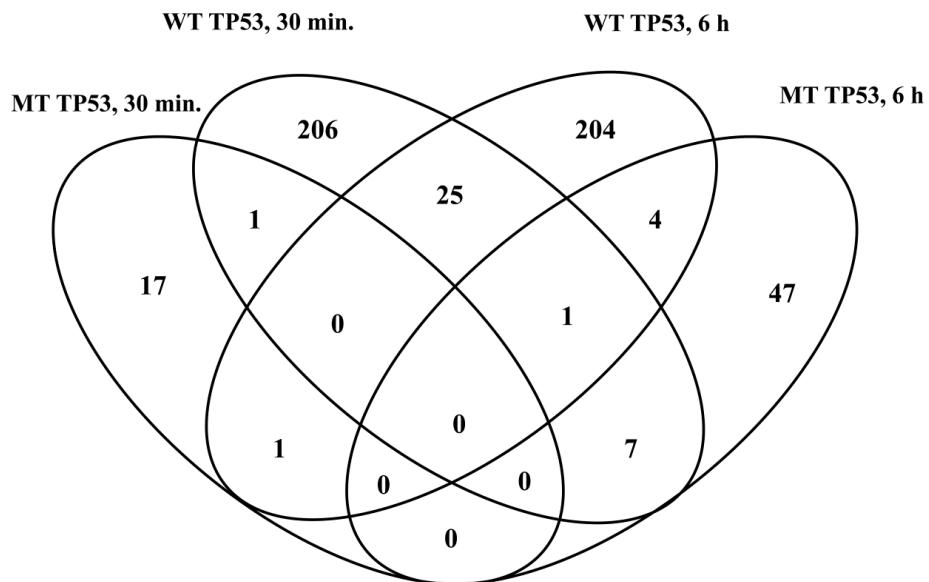
- [62] A. Rubel, R. Handrick, L.H. Lindner, M. Steiger, H. Eibl, W. Budach, C. Belka, V. Jendrossek, The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro, *Radiat Oncol*, 1 (2006) 6.
- [63] A.C. Kraus, I. Ferber, S.O. Bachmann, H. Specht, A. Wimmel, M.W. Gross, J. Schlegel, G. Suske, M. Schuermann, In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways, *Oncogene*, 21 (2002) 8683-8695.
- [64] T.S. Armstrong, S. Prabhu, K. Aldape, B. Hossan, S. Kang, A. Childress, L. Tolentino, M.R. Gilbert, A case of soft tissue metastasis from glioblastoma and review of the literature, *J Neurooncol*, 103 (2011) 167-172.
- [65] D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, E. Fourmaux, A. Bouchot, G. Wettstein, E. Solary, C. Garrido, Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor by Heat Shock Protein 90 via Toll-like Receptor 4 Contributes to the Migration of Glioblastoma Cells, *J Biol Chem*, 286 (2011) 3418-3428.
- [66] M. Onishi, T. Ichikawa, K. Kurozumi, I. Date, Angiogenesis and invasion in glioma, *Brain Tumor Pathol*, 28 (2011) 13-24.
- [67] A.W. Craig, P.A. Greer, Fer kinase is required for sustained p38 kinase activation and maximal chemotaxis of activated mast cells, *Mol Cell Biol*, 22 (2002) 6363-6374.
- [68] B. Salhia, N.L. Tran, A. Chan, A. Wolf, M. Nakada, F. Rutka, M. Ennis, W.S. McDonough, M.E. Berens, M. Symons, J.T. Rutka, The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma, *Am J Pathol*, 173 (2008) 1828-1838.
- [69] S. Sakamoto, R.O. McCann, R. Dhir, N. Kyprianou, Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance, *Cancer Res*, 70 (2010) 1885-1895.
- [70] Y. Zhao, X.Q. Chen, J.Z. Du, Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation, *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10 (2009) 404-410.
- [71] A.J. McIlwrath, P.A. Vasey, G.M. Ross, R. Brown, Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity, *Cancer Res*, 54 (1994) 3718-3722.
- [72] W.J. Slichenmyer, W.G. Nelson, R.J. Slebos, M.B. Kastan, Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage, *Cancer Res*, 53 (1993) 4164-4168.
- [73] W.S. el-Deiry, Regulation of p53 downstream genes, *Semin Cancer Biol*, 8 (1998) 345-357.
- [74] E. Sbisa, D. Catalano, G. Grillo, F. Licciulli, A. Turi, S. Liuni, G. Pesole, A. De Grassi, M.F. Caratozzolo, A.M. D'Erchia, B. Navarro, A. Tullo, C. Saccone, A. Gisel, p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data, *BMC Bioinformatics*, 8 Suppl 1 (2007) S20.
- [75] J. Hoh, S. Jin, T. Parrado, J. Edington, A.J. Levine, J. Ott, The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 8467-8472.
- [76] D.B. Veprinsev, A.R. Fersht, Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA, *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) 1589-1598.
- [77] Y. Sasaki, H. Negishi, M. Idogawa, I. Yokota, R. Koyama, M. Kusano, H. Suzuki, M. Fujita, R. Maruyama, M. Toyota, T. Saito, T. Tokino, p53 negatively regulates the hepatoma growth factor HDGF, *Cancer Res*, 71 (2011) 7038-7047.
- [78] M. Muller, T. Schilling, A.E. Sayan, A. Kairat, K. Lorenz, H. Schulze-Bergkamen, M. Oren, A. Koch, A. Tannapfel, W. Stremmel, G. Melino, P.H. Krammer, TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma, *Cell Death Differ*, 12 (2005) 1564-1577.
- [79] A.Y. Nikolaev, M. Li, N. Puskas, J. Qin, W. Gu, Parc: a cytoplasmic anchor for p53, *Cell*, 112 (2003) 29-40.

- [80] A.S. Jonason, S. Kunala, G.J. Price, R.J. Restifo, H.M. Spinelli, J.A. Persing, D.J. Leffell, R.E. Tarone, D.E. Brash, Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin, Proc Natl Acad Sci U S A, 93 (1996) 14025-14029.
- [81] M.L. Smith, I.T. Chen, Q. Zhan, P.M. O'Connor, A.J. Fornace, Jr., Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage, Oncogene, 10 (1995) 1053-1059.

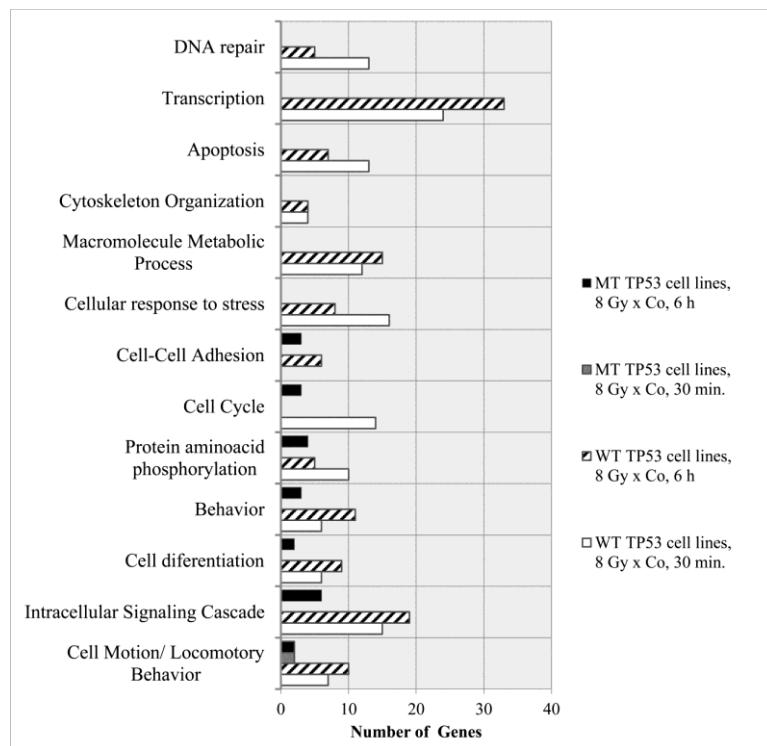
## Figures



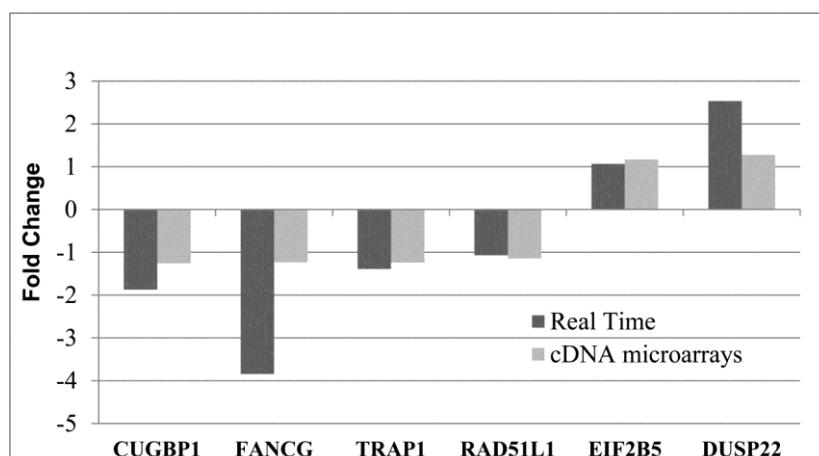
**Fig. 1.** Hierarchical clustering obtained for a gene set previously selected by the t-test ( $\alpha = 5\%$ ) and analyzed by SAM ( $FDR \leq 0.05$ ). The results are displayed comparing control *versus* irradiated group according to cell groups and harvesting times: (a) WT TP53 GBM cells (U343 and U87), 30 min. (b) WT TP53 cells, 6 h; (c) MT TP53 GBM cell lines (T98 and U251), 30 min; (d) MT TP53 GBM cell lines, 6h.



**Fig. 2.** Venn diagram representing quantitative results obtained for different groups of cell lines (WT and MT *TP53* cells) analyzed at two time-points (30 min. and 6 h) after irradiation, in terms of numbers of exclusively modulated genes obtained for each group, or common genes between two or more groups. The data on transcript expression levels were analyzed by the SAM method (FDR  $\leq 0.05$ ) applied to the microarray data.



**Fig. 3.** Selected biological functions associated to significant differentially expressed genes obtained from microarray data analysis (SAM; FDR  $\leq 0.05$ ) in experiments with GBM cell lines analyzed at 30 min. and 6 h after irradiation, as analyzed by DAVID-NIH [51, 52].



**Fig. 4.** Gene expression levels obtained by the DNA microarray and the real-time qPCR methods for six genes analyzed at different conditions: *CUGBP1* (U343, 30 min, Control x 8 Gy), *FANCG* (U343, 30 min, Control x 8 Gy), *RAD51L1* (U343, 30 min, Control x 8 Gy), *TRAP1* (U87, 30 min, Control x 8 Gy), *EIF2B5* (U87, 30 6h, Control x 8 Gy) and *DUSP22* (U87, 6h, Control x 8 Gy). The same RNA samples were used in both assays.

## Tables

**Table 1.** Primer sequences used in Real Time qPCR. The housekeeping *GAPDH* gene was used as internal control.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>CUGBPI</i>	5' – ATGGCTGCTTAAATGGTGG - 3'	5' – AGCATATTGCTGGATAACCG - 3'
<i>EIF2B5</i>	5' – TGATGCAGGTACTGAGCCAC - 3'	5' – AGGCCTTAGCAGAGGAAGC - 3'
<i>DUSP22</i>	5' – GGTCCATCAGTATCGGCAGT - 3'	5' – TCTTCTGAGAAAGGCCAGA - 3'
<i>RAD51L1</i>	5' – GCTGATCCTCCAGTACCT - 3'	5' – TTTCCATAGGCTTGAAGAACCC - 3'
<i>FANCG</i>	5' – CTGTTCTCCCTGGAGCTG - 3'	5' – TCTCTAGGCTCCGCTGGATA - 3'
<i>TRAPI</i>	5' – CTTGGAAAATGCGTCACA - 3'	5' – GATGGTGATGGTGCCTTCT - 3'
<i>GAPDH</i>	5' – CTCTGCTCCTCTGTTGAC - 3'	5' – ACGACCAAATCCGTTGACTC - 3'

**Table 2.** Overall quantitative results on significant differentially expressed genes obtained by the DNA microarray method and analysis performed by SAM – Significance Analysis of Microarray (FDR ≤ 5 %), comparing irradiated *versus* un-irradiated cells. RNA samples from WT and MT *TP53* cells were collected at 30 min. and 6 h following irradiation with 8 Gy of gamma-rays. Fold-change (+) or (-) means up- and down-regulation in transcript expression, respectively.

Condition	Number of genes		Fold Change (range)
	up-regulated	down-regulated	
WT 30 min.	5	235	+1.56 to -1.89
WT 6 h	74	162	
MT 30 min.	9	10	+2.2 to -1.41
MT 6 h	16	43	

**Table 3.** Common differentially expressed genes observed for irradiated WT and MT *TP53* GBM cell lines (relatively to un-irradiated cells) analyzed at 30 min. and 6 h following irradiation with 8 Gy, as represented in the Venn diagram (**Fig. 3**).

30= 30 min. after irradiation; 6= 6 h after irradiation; ↓= down-regulated; ↑= up-regulated.

Gene symbol	WT 30	WT 6	MT 30	MT 6
<i>ERI3, FAM172A, MOBP, IMAGE 33102, ENHO, ADD2, IMAGE 33814, IMAGE 34041, PCDH9, BASPI, DLL4, ZNF630, MACF1, MAML3, SNRNP27, C16orf74, SYT7, ATG14, DUSP4, IMAGE 143868, CNKSRI, ACP6, PPP6C, ATP7B, BRCA1</i>				
<i>SI100P</i>	↓		↑	
<i>GRIP1</i>		↓		↑
<i>AKAP11</i>		↑		↓
<i>NRNI</i>		↓		↑
<i>I40537</i>		↑		↑
<i>IMAGE 23826, IMAGE 24029</i>	↓			↑
<i>IGSF1, CWC15, MBNL2, IMAGE 144821, IMAGE 143028, NPAS2, BTRC</i>		↓		↓
<i>NNT</i>		↓	↑	
<i>SLC6A11</i>	↓	↓		↓

**Table 4.** Functional groups (biological functions) obtained for genes that were significantly modulated (up- or down-regulated) in microarray experiments performed in WT and MT *TP53* GBM cell lines, analyzed at two-time points (30 min. and 6 h) after gamma-irradiation, as analyzed by the DAVID-NIH analysis [52, 53].

<b>WT <i>TP53</i> cell lines, 8 Gy x Control (30 min.)</b>	
<b>Term</b>	<b>Genes</b>
DNA repair and recombination	<i>XRCC4, RAD51API, RAD52, ATM, BRCA1, ANKRD17, MNAT1, XPA, ERCC5, EYA2, RAD51L1, RAD51L3, FANCG</i>
cellular response to stress	<i>XRCC4, RAD51API, BMPR2, RAD52, ATM, BRCA1, ANKRD17, MNAT1, XPA, ERCC5, EYA2, RAD51L1, MAP3K9, FANCG, RAD51L3, MCTS1</i>
protein ubiquitination	<i>G2E3, TRIM33, FBXL5, FBXO4, BRCA1</i>
cell cycle	<i>TAF2, PPP6C, MAP2K1, BTRC, RAD52, ATM, BRCA1, MNAT1, SBDS, RCC2, MACF1, RAD51L1, RAD51L3, MCTS1</i>
protein amino acid phosphorylation	<i>FYB, PDIK1L, PRKCZ, MAP2K1, MAP3K9, DYRK1A, BMPR2, DAPK2, STK19, ATM</i>
positive regulation of macromolecule metabolic process	<i>TAF2, PPARA, MNAT1, NPAS2, MAP2K1, BTRC, BMPR2, FBXO4, NFKB1, MAML3, AFF1, BRCA1</i>
regulation of organelle organization	<i>SBDS, MACF1, ZZEF1, ADD2, ATM, BRCA1</i>
regulation of lipid biosynthetic process	<i>NFKB1, NR3C1, BRCA1</i>
regulation of apoptosis	<i>PRKCZ, XRCC4, AKAP13, NFKB1, NR3C1, DAPK2, ATM, BRCA1, MNAT1, XPA, ERCC5, G2E3, FAS</i>
hexose metabolic process	<i>PFKFB3, HK2, PDHA1, PC, CHST1</i>
proteolysis	<i>ADAMTS19, PEPD, BTRC, UBE2G2, MMP17, NFKB1, BRCA1, G2E3, TRIM33, PAPPA, BACE2, FBXL5, FBXO4, ADAM12, ASB6</i>
regulation of Ras protein signal transduction	<i>MAP2K1, KIAA1244, TBC1D5, AKAP13, TBC1D1</i>
regulation of cytoskeleton organization	<i>SBDS, MACF1, ADD2, BRCA1</i>
phosphorylation	<i>FYB, PDIK1L, PRKCZ, MAP2K1, MAP3K9, DYRK1A, HK2, BMPR2, DAPK2, STK19, ATM</i>
learning or memory	<i>PRKCZ, SBDS, S100P</i>
rhythmic process	<i>NPAS2, FANCG, ATP7B</i>
cell motion/locomotory behavior	<i>NPAS2, SBDS, MAP2K1, IL16, S100P, SOX1, MACF1</i>
Notch signaling pathway	<i>DLL4, MAML3</i>
intracellular signaling cascade	<i>FYB, PRKCZ, CNKSRI, MAP2K1, AKAP13, NR3C1, DAPK2, ATM, BRCA1, XPA, DUSP4, DOK5, MAP3K9, ASB6, RASA2</i>
cell differentiation	<i>PPARA, NFKB1, XRCC4, FAZ, MAP2K1, IL6</i>
behavior	<i>PRKCZ, NPAS2, SBDS, S100P, MAP2K1, IL16</i>
transcription	<i>DEAF1, TAF2, PPARA, LCORL, ZNF630, SOX1, IL16, BMPR2, ZNF827, TTLL5, CNOT1, NFKB1, NR3C1, FUBP1, MNAT1, NPAS2, EYA2, TRIM33, ZNF692, SND1, CASZ1, MAML3, MCTS1, GTF3C3</i>

<b>WT TP53 cell lines, 8 Gy x Control (6 h)</b>	
<b>Term</b>	<b>Genes</b>
behavior	<i>SLC1A2, ROBO1, NTRK2, NLGN4X, CHRNBI, KIT, NPY1R, FER, ZIC1, GDNF, CCL28</i>
protein amino acid autophosphorylation	<i>PAK2, NTRK2, TRIM24, KIT, FER</i>
membrane organization	<i>NRCAM, STX8, VAV3, USO1, EEA1, CHRNBI, SYT7, GDNF, GCA, ELMOD2</i>
ER-nuclear signaling pathway	<i>ATF6, CRIPAK, SCAP</i>
intracellular signaling cascade	<i>CNKSRI, RSUI, VAV3, GRIP1, MADD, ARID1A, KIT, NPY1R, AKAP11, FER, SHANK2, BRCA1, DUSP4, DOK5, P2RY2, TICAM2, ANP32A, PHLDB2, KNDC1</i>
regulation of transcription	<i>ZNF630, ZFP64, GRIP1, ZXDC, ZNF250, TCEAL8, GDNF, TARDBP, ANP32A, MLLT1, MAML3, ERCC3, CRY1, NKRF, TNFSF4, KHDRBS2, CREBBP, ZNF141, ARID1A, DACH1, TRIM24, ZNF497, BRCA1, ATF7IP2, SCAP, ATF6, DLX6, PHF21A, VGLL3, CHAF1B, RNF20, NFIA, RSC1A1</i>
ATP metabolic process	<i>LONP1, VPS4B, ERCC3, ATP7B</i>
intracellular transport	<i>STX8, MACF1, PGAPI, PEX16, VPS4B, USO1, ANP32A, VPS41, EEA1, THOC2, ATP7B</i>
steroid hormone receptor signaling pathway	<i>GRIP1, ARID1A, BRCA1</i>
cell differentiation	<i>NRCAM, ACVR2A, TNFRSF12A, ROBO1, KIT, BBP, PPHLNI, PPHLNI, ERCC3, NTRK2</i>
cell motion/ locomotory behavior	<i>ROBO1, NPY1R, FER, GDNF, CCL28, NRCAM, VAV3, MACF1, TNFRSF12A, KIT, ACVR2A,</i>
cell-cell adhesion	<i>CD84, NRCAM, DCHS2, FAT4, ROBO1, PCDH9</i>
regulation of cytoskeleton organization	<i>MACF1, CRIPAK, ADD2, BRCA1</i>
mRNA processing	<i>SFRS15, TARDBP, YTHDC1, THOC2, SNRNP27, SF3B5</i>
positive regulation of macromolecule metabolic process	<i>GRIP1, CREBBP, ZXDC, ARID1A, KIT, TRIM24, GDNF, BRCA1, SCAP, ATF6, ACVR2A, PSMA5, MAML3, ERCC3, RNF20</i>
ion homeostasis	<i>SLC8A1, P2RY2, CHRNBI, TRIM24, NPY1R, CCL28, ATP7B</i>
protein complex assembly	<i>STOM, LONP1, PAK2, CREBBP, TRIM24, ERCC3, CHAF1B, OLFM1</i>
protein folding	<i>ATF6, TOR3A, PFDN1, SLMAP</i>
cellular respiration	<i>ME3, NNT, UQCRB</i>
regulation of cytokine production	<i>MAVS, TNFSF4, ATP6AP2, TICAM2</i>
protein kinase cascade	<i>DUSP4, MADD, DOK5, TICAM2, KIT, AKAP11</i>
DNA repair	<i>NSMCE2, ERCC3, CRY1, CHAF1B, BRCA1</i>
cellular response to stress	<i>ATF6, LONP1, NSMCE2, ERCC3, CRY1, CHAF1B, BRCA1, SCAP</i>
regulation of secretion	<i>TNFSF4, NTRK2, NPY1R, GDNF</i>
DNA metabolic process	<i>LONP1, NSMCE2, ERCC3, CRY1, CHAF1B, NFIA, BRCA1</i>
regulation of synaptic transmission	<i>NTRK2, KIT, GDNF</i>
Notch signaling pathway	<i>DLL4, MAML3</i>

blood vessel development	<i>TNFRSF12A, ROBO1, DLL4, NTRK2</i>
chromatin organization	<i>CREBBP, PHF21A, ARID1A, CHAF1B, RNF20</i>
apoptosis	<i>VAV3, PAK2, MADD, TNFRSF12A, BCL2A1, MAGEH1, BRCA1</i>

**MT TP53 cell lines, 8 Gy x Control (30 min.)**

Term	Genes
cell motion/locomotory behavior	<i>TLN1, S100P</i>

**MT TP53 cell lines, 8 Gy x Control (6 h)**

Term	Genes
cell-cell adhesion	<i>CLSTN2, ROBO2, BMPR1B</i>
intracellular signaling cascade	<i>RAB37, GRIP1, OPRK1, CYP26B1, AKAP11, KIDINS220</i>
intracellular receptor-mediated signaling pathway	<i>GRIP1, CYP26B1</i>
protein amino acid phosphorylation behavior	<i>STK25, PASK, ROR1, BMPR1B, NPAS2, OPRK1, ROBO2</i>
cell cycle process	<i>BTRC, CYP26B1, ANLN</i>
cell differentiation	<i>ROBO2, BMPR1B</i>
cell surface receptor linked signal transduction	<i>LOC339047, OPRK1, BTRC, ROR1, BMPR1B, OPN3</i>
cell motion/ locomotory behavior	<i>NPAS2, ROBO2</i>

**Table 5.** Results of the comparative analysis of differentially expressed genes (obtained by SAM) carried out with previously identified genes with *TP53* binding sites using ChIP-on-chip (List 1) and ChIP-PET (List 2) [16, 47]. The gene modulation, up- (↑) or down (↓) regulation, was obtained from the SAM analysis (FDR ≤ 0.05) performed on the microarray data.

30= 30 min. following irradiation; 6= 6 h following irradiation.

Gene symbol	WT 30	WT 6	MT 30	MT 6	List 1	List 2
<i>ANKRD17, CASZ1, CSMD1, EYA2, FBLNI, FCHO2, NR3CI, PANK2,</i>	↓				x	
<i>RCC2, SOX1, TRAM2, UBE2G2</i>						
<i>IFT74</i>			↓		x	
<i>CYP26B1</i>			↑		x	
<i>SLC6A11</i>	↓	↓	↓		x	
<i>CCL28, FAM49A, GDNF</i>	↓				x	
<i>ME3, NTRK2</i>	↑				x	
<i>VPS41, ZFP64</i>	↓				x	
<i>BCL2A1</i>	↓				x	
<i>EEA1</i>	↑				x	
<i>FRMD4A</i>	↓				x	
<i>BCAS3</i>	↓				x	
<i>GSTP1</i>			↓		x	