

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Raiana Gaiardo Girardi

**ESTUDO DA CO-LOCALIZAÇÃO DE HP1ALPHA E 53BP1 EM CÉLULAS ÚNICAS
DE GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre

2024

Raiana Gaiardo Girardi

**ESTUDO DA CO-LOCALIZAÇÃO DE HP1ALPHA E 53BP1 EM CÉLULAS ÚNICAS
DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dr. Guido Lenz

Coorientador(a): Me. Daphne Tórgo

Porto Alegre

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

Girardi, Raiana Gaiardo

Estudo da co-localização de HP1alpha e 53bp1 em células únicas de glioblastoma / Raiana Gaiardo Girardi. -- 2024.

66 f.

Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Daphne Tórgo Lemos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Heterocromatina. 2. Dano ao DNA. 3. Single-cell. 4. Epigenética. 5. Heterogeneidade tumoral. I. Lenz, Guido, orient. II. Lemos, Daphne Tórgo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Raiana Gaiardo Girardi

**ESTUDO DA CO-LOCALIZAÇÃO DE HP1ALPHA E 53BP1 EM CÉLULAS ÚNICAS
DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Bruno César Feltes - UFRGS

Luana Sueling Lenz - UFCSPA

Daphne Tórgo - UFRGS (co-orientadora)

Guido Lenz - UFRGS (orientador)

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe, pelo altruísmo de uma vida dedicada à felicidade dos filhos. Por ser a maior apoiadora dos meus sonhos e nunca ter dito que eu não poderia ser o que eu quisesse ser.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**.

A minha segunda família, **Carol, Garren e Duda**, pelo incentivo constante, por lutarem ao meu lado e serem suporte para os dias difíceis. Vocês foram essenciais nesta jornada.

Ao **Angelo**, um conterrâneo que me permitiu ter um pedacinho de casa na capital, e se demonstrou um amigo companheiro e empático, dono das perguntas científicas mais interessantes e das melhores barras de progresso.

Aos colegas de laboratório, em especial, ao **Juliano** e a **Luiza**, pelas discussões intelectuais, pelos conselhos de vida.

Aos professores que de alguma maneira me incentivaram durante esses 5 anos de curso e que foram inspiração para mim. Em especial, ao professor **Adriano de Araujo Gomes**, a professora **Silvana Schneider** e a professora **Karen L. Haag**, que me estenderam a mão em momentos delicados e conseguiram enxergar minha capacidade.

Ao professor **Guido**, por ter enxergado meu potencial, pela confiança que depositou em mim, pelo otimismo e inspiração durante o desenvolvimento deste trabalho, e por ter sido um orientador presente e paciente nestes 3 anos em que convivemos. Foi um prazer poder trabalhar com uma das pessoas que mais admiro.

A **Daphne**, que dedicou seu tempo a me ensinar e transformou uma aluna de biomedicina em uma biomédica, capaz de exercer com autonomia seus projetos de pesquisa e sua profissão. Sem ela, este trabalho não seria possível.

Aos amigos feitos durante a faculdade, pela escuta e companheirismo.
Aos amigos de Farroupilha, pelo incentivo e apoio, principalmente durante a pandemia.

A minha família, por mostrar que o amor supera distância, saudade e a falta diária.

A minha melhor amiga, minha mãe, **Nete**, pelos incansáveis esforços para me ver feliz, pelo exemplo de caráter e bondade. Por encher nossa casa com amor e alegria.

A minha irmã, **Raíssa**, por ter sido uma boa amiga, e ter abdicado de coisas importantes para que eu pudesse chegar até aqui.

A meu pai, **Delavi**, pelo incentivo, por ser um exemplo de humildade e honestidade.
Por se fazer presente.

Obrigada, sem vocês nada disso seria possível.

RESUMO

As proteínas 1 de heterocromatina (HP1) são uma família de proteínas envolvidas no empacotamento da cromatina. HP1alpha é uma proteína envolvida tanto na modulação de heterocromatina constitutiva quanto na heterocromatina epigenética. Estudos recentes demonstraram que as HP1 são recrutadas para regiões de dano ao DNA e são componentes essenciais do sistema de resposta ao dano, formando regiões de foco de localização desta proteína (*foci*). Além disso, o recrutamento de HP1alpha para regiões de dano ao DNA independe da ativação de vias de reparo. A proteína de ligação a p53 (53bp1) é uma proteína que exerce a função de reconhecimento da quebra da dupla fita de DNA, dentre outras funções, podendo ser utilizada como marcador da quebra da dupla fita. Sua interação com HP1alpha foi previamente descrita, mostrando que a ligação entre estas proteínas ocorre por domínios de interação diferentes dos de reconhecimento de quebra da fita dupla. A ligação entre HP1alpha e 53bp1 está associada à manutenção da estrutura da heterocromatina e proteção contra danos e senescência induzidos por estresse. Considerando que células tumorais possuem maquinaria de reconhecimento e reparo de dano ao DNA deficiente, o recrutamento de HP1 para regiões de quebra na fita dupla pode constituir um mecanismo alternativo ao reparo e contribuir para a resistência tumoral. Além disso, a conservação da ligação entre HP1alpha e 53bp1 pode contribuir para a aptidão de células tumorais, impedindo a perda da estrutura da heterocromatina e o desencadeamento do fenótipo senescente. Essa hipótese foi testada a partir da observação da co-localização de *foci* de HP1alpha e 53bp1, caracterizando o fenótipo celular individual e o impacto deste na sobrevivência celular. Resultados preliminares mostram que uma maior área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1 e, uma maior proporção dos *foci* de HP1alpha co-localizado com 53bp1 prévios a adição de temozolomida está associada a maior sobrevivência e tolerância. Uma maior área de sobreposição de HP1alpha e 53b1 e uma maior proporção de HP1alpha co-localizado a 53bp1 pode ter auxiliado as células a sobreviverem às quebras na fita dupla induzidas pelo TMZ, pela conservação da estrutura da heterocromatina, ainda que a maquinaria de reparo esteja deficiente. Estes dados precisam ser confirmados a partir de um maior N amostral e pela utilização de outras metodologias de engenharia genética.

Palavras-chave: heterocromatina, dano ao DNA, *single-cell*, heterogeneidade tumoral.

ABSTRACT

Heterochromatin proteins 1 (HP1) are a family of proteins involved in chromatin packaging. HP1alpha is a protein involved in modulating both constitutive heterochromatin and epigenetic heterochromatin. Recent studies have demonstrated that HP1 are recruited to regions of DNA damage and are essential components of the damage response system, forming focus regions for the localization of this protein (foci). Furthermore, the recruitment of HP1alpha to regions of DNA damage is independent of the activation of repair pathways. The p53-binding protein (53bp1) is a protein that performs the function of recognizing DNA double-strand breaks, among other functions, and can be used as a marker of double-strand breaks. Its interaction with HP1alpha was previously described, showing that the connection between these proteins occurs through interaction domains other than those for double-strand break recognition. The link between HP1alpha and 53bp1 is associated with the maintenance of heterochromatin structure and protection against stress-induced damage and senescence. Considering that tumor cells have deficient DNA damage recognition and repair machinery, the recruitment of HP1 to double-strand break regions may constitute an alternative mechanism to repair and contribute to tumor resistance. Furthermore, the conservation of the link between HP1alpha and 53bp1 may contribute to the fitness of tumor cells, preventing the loss of heterochromatin structure and the triggering of the senescent phenotype. This hypothesis was tested by observing the co-localization of HP1alpha and 53bp1 foci, characterizing the individual cellular phenotype and its impact on cell survival. Preliminary results show that a greater area of overlap between HP1alpha and 53bp1 and a greater proportion of HP1alpha foci co-localized with 53bp1 prior to the addition of temozolomide is associated with greater survival and tolerance. A greater overlapping area of HP1alpha and 53bp1 and a greater proportion of HP1alpha co-localized to 53bp1 may have helped cells survive TMZ-induced double-strand breaks by conserving the heterochromatin structure, even though the repair machinery is impaired. deficient. These data need to be confirmed using a larger N sample and using other genetic engineering methodologies.

Keywords: heterochromatin; DNA damage, single-cell, tumor heterogeneity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sobreposição de HP1alpha e 53bp1	25
Figura 2 – Área total de <i>foci</i> de HP1alpha, 53bp1 e da sobreposição ao longo do tempo	27
Figura 3 – Impacto da área de sobreposição e do percentual de HP1alpha sobreposto no tempo de sobrevivência	29
Figura 4 – Média da área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1 em relação a área total de cada proteína para cada célula <i>versus</i> tempo de sobrevivência	31
Figura 5 – Mapa do plasmídeo GFP-HP1alpha e fotografias da transfecção em A172wt	34
Figura 6 – Quantificação da sobreposição de canais	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
GFP	Proteína fluorescente, do inglês <i>green fluorescent protein</i>
DMEM	Meio de cultura celular sintético para cultura de tecidos, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
SFB	Soro fetal bovino, suplemento para meios de cultura celular
PEI	Poliétilenoimina
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
LB	Sigla para <i>lysogeny broth</i> , meio de cultura bacteriano
HP1	Proteína 1 de heterocromatina
P53	Proteína 53
53bp1	Proteína 1 de ligação a p53
TMZ	Temozolomida
CO ₂	Dióxido de carbono
DSB	Quebra da dupla fita de DNA, do inglês <i>DNA double strand break</i>
BER	Reparo por excisão de bases, do inglês <i>Base excision repair</i>
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos, do inglês <i>Nucleotide excision repair</i>

SASP	Fenótipo secretor associado à senescência, do inglês <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
LLPS	Separação de fase líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid phase separation</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	HETEROGENEIDADE TUMORAL	13
1.2	ANÁLISE DE CÉLULAS ÚNICAS	14
1.3	HP1	15
1.4	P53 E 53BP1	16
1.5	HP1ALPHA E 53BP1	17
1.6	SENESCÊNCIA	18
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS GERAIS	20
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	ARTIGO CIENTÍFICO	21
	Co-localização de HP1alpha e 53bp1 em células únicas de células de glioblastoma	22
	Resumo	22
	Introdução	23
	Resultados	24
	Discussão	31
	Materiais e Métodos	33
	Referências	37
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	40
	REFERÊNCIAS DO TEXTO PRINCIPAL	41
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO JOURNAL OF CELL SCIENCE__	48

1 INTRODUÇÃO

As *hallmarks* do câncer são um compilado de características necessárias para que uma célula normal e saudável se torne uma célula neoplásica (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Em 2022 foram adicionadas quatro novas dimensões: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (HANAHAN, 2022). Essas novas características somam-se às dez já existentes e ampliam o conhecimento sobre a complexidade do câncer.

Duas das quatro novas dimensões - reprogramação epigenética não mutacional e microbiomas polimórficos - são consideradas características habilitantes, ou seja, facilitam o desenvolvimento das outras capacidades funcionais essenciais para a progressão tumoral. A reprogramação epigenética não mutacional, em especial, reforça o impacto da modulação da cromatina, para o silenciamento ou superexpressão de genes na carcinogênese. A nível de fenótipo, essa modulação pode ser refletida como uma diversidade fenotípica intratumoral, onde células irmãs, com genótipos iguais, apresentam fenótipos e aptidão diferentes, levando a falha e resistência aos tratamentos quimioterápicos (NEBBIOSO et al., 2018; FURTADO et al., 2019; LENZ et al., 2021).

Desse modo, o estudo da regulação epigenética em tumores pode nos auxiliar a compreender a heterogeneidade fenotípica intratumoral, bem como sua influência no desfecho das células.

1.1 HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL

Heterogeneidade intratumoral é a presença de subpopulações celulares com característica fenotípicas distinguíveis em um mesmo tumor. Diferentes fenótipos encontrados em células que pertencem a um mesmo tumor podem resultar em diferentes níveis de tolerância, sobrevivência e aptidão frente ao tratamento quimioterápico, de modo que algumas células deste tumor sobreviverão (resultado do processo de morte fracionada), e repovoarão o tumor, levando a recidiva da doença (LENZ et. al., 2022; REYES e LAHAV, 2018).

A falha do tratamento quimioterápico e a recidiva de diversos tipos de cânceres têm sido explicadas pela heterogeneidade intratumoral (SHENG et al.,

2024; CHMIELIK et al., 2018). Essas descobertas foram relevantes para o que chamamos de “medicina personalizada”, uma área que busca adaptar o tratamento às individualidades de cada paciente e cada tumor (ROULOT et al., 2016; SOUSA e LINA, 2018).

Em alguns tipos de cânceres a heterogeneidade intratumoral é mais determinante para o desfecho e eficácia do tratamento que outros. Por exemplo, a taxa de sobrevivência em 5 anos de pacientes com câncer de mama, na melhor das hipóteses (câncer localizado), chega a 99% com aplicação dos tratamentos padrões, enquanto para outros cânceres, como o glioblastoma (um tumor cerebral de células da glia), essa taxa cai para 22% de sobrevivência em 5 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020, 2024). Esta diferença na sobrevivência é explicada em partes, pela alta heterogeneidade de células de glioblastoma. E de fato, a pesquisa atual em glioblastoma, têm dedicado seus esforços para entender os mecanismos de geração de heterogeneidade tumoral (OSTROM, et al., 2021).

Por muito tempo, acreditou-se que a geração de heterogeneidade tumoral era produto de mutações no DNA das células, levando-as a apresentarem fenótipos diferentes. A genotipagem de células de um mesmo tumor mostrou que as mutações no genoma não são exclusivamente responsáveis pelos diferentes fenótipos encontrados (PATEL et al., 2014; YI et al., 2017; SADIDA et al., 2023). Portanto, a modulação epigenética pode ser a responsável pelas diferenças encontradas entre células de um mesmo tumor (SHEFFIELD et al., 2017; PAN et al., 2015).

Desse modo, compreender o papel da regulação epigenética na geração da heterogeneidade tumoral, pode nos fornecer alvos moleculares específicos para o desenvolvimento de homogeneizadores de fenótipo, melhorando a resposta ao tratamento e levando à morte de todas as células do tumor. Para tanto, a análise de cada célula que compõem um tumor parece imprescindível à caracterização das diferenças que levam a fenótipos celulares de tolerância e resistência à quimioterapia.

1.2 ANÁLISE DE CÉLULAS ÚNICAS

Considerando a heterogeneidade tumoral, métricas oriundas da análise populacional de tumores podem não representar de forma adequada fenótipos celulares que sobreviveriam ao tratamento e poderiam causar a recidiva tumoral. O

emprego da análise de células únicas em outros estudos já mostrou que correlações a nível populacional não representou a interdependência direta a nível de células únicas (FILIPPI-CHIELA et al., 2015). Desse modo, a análise de cada célula que compõem uma massa tumoral nos fornece informações mais precisas da relação entre heterogeneidade fenotípica, aptidão e sobrevivência. Apesar de imprescindível, cabe ressaltar que a análise de células únicas é um processo moroso e custoso, que carece de automatização (CASADO-PELAEZ, 2022).

1.3 HP1

As alterações epigenéticas, hereditárias ou não, e que levam à heterogeneidade fenotípica tumoral, podem acontecer em decorrência de estímulos endógenos e exógenos que alteram a estrutura da cromatina, levando à expressão (cromatina ativa - eucromatina) ou à repressão (cromatina inativa - heterocromatina) de genes. Essas alterações na cromatina podem ser reguladas pela metilação de DNA e histonas (NEBBIOSO et al., 2018).

Nas regiões de heterocromatina, associadas às histonas, estão as proteínas 1 de heterocromatina (HP1). HP1 é uma família de proteínas envolvidas na formação e empacotamento de heterocromatina, dentre outras funções (MAISON e ALMOUZNI, 2004). Em especial, a HP1alpha é uma proteína que reconhece tanto regiões de heterocromatina constitucional, como os centrômeros e telômeros, quanto regiões de metilação de DNA e histonas, como a metilação H3K9me2/3. Esse tipo de metilação corresponde a uma modificação epigenética na qual a histona 3 é di ou trimetilada na posição lisina 9, levando a repressão transcricional de genes (BANNISTER et.al., 2001; SCHOELZ e RIDDLE, 2022).

Além do reconhecimento e ligação a regiões de heterocromatina, outras funções das HP1 têm sido estudadas. Recentemente foi demonstrado que todas isoformas de HP1 são recrutadas para regiões de dano ao DNA e são componentes essenciais do sistema de resposta ao dano, que leva a ativação de vias de reparo da fita simples de DNA, como reparo por excisão de bases (BER) ou nucleotídeos (NER) (DINANT e LUIJSTERBURG, 2023). Entretanto, neste estudo não foi incluída a observação do recrutamento das HP1 para regiões de quebra da dupla fita de DNA, e não houve completa elucidação das vias de sinalização de recrutamento e interação das HP1 com regiões de dano ao DNA.

O estudo do recrutamento e interação das HP1 em regiões de quebra da fita dupla se faz necessário visto que a quebra da dupla fita de DNA é um mecanismo de geração de instabilidade genômica, e pode desencadear mutações e processos de apoptose e senescência celular (LI, ZIMMERMAN e WEYEMI, 2021). A instabilidade genômica é uma das *Hallmarks* do câncer, e a manutenção dela permite que células tumorais estejam mais suscetíveis a novas mutações do DNA (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Em uma célula saudável, o recrutamento de HP1 para regiões de dano ao DNA pode ser justificado com a finalidade de bloquear a transcrição dos genes envolvidos (UI, CHIBA e YASUI, 2020). Entretanto, em células tumorais, o recrutamento de HP1 e a permanência da heterocromatinização em regiões de quebra da dupla fita pode ser um mecanismo de geração da instabilidade genômica, uma vez que impede o acesso da maquinaria de reparo pelo persistente envelhecimento do DNA.

1.4 P53 E 53BP1

A proteína 53 (p53) é uma fosfoproteína nuclear supressora tumoral que está envolvida no controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose (LEVINE, 1997). P53 é responsável pelo *check-point* de integridade do genoma na passagem de G1 para S, e quando detecta quebra na dupla fita, sua ativação leva ao aumento da transcrição de p21, inativação de ciclinas dependentes de cinase e bloqueio de E2F, levando ao bloqueio da divisão celular e parada do ciclo celular (NELSON e COX, 2019).

Erros durante a replicação ocorrem com certa frequência nas células, bem como danos ao DNA pela exposição a agentes estressores (MINCHOM et al. 2018; SANCAR et al. 2004). A existência de proteínas como a p53 visa o reconhecimento e reparo desses danos antes que eles sejam incorporados ao DNA das células-filhas e se acumulem ao longo das gerações. Entretanto, quando o dano ao DNA incide sobre genes codificadores destas proteínas de vigilância, as células podem passar a produzir proteínas defeituosas, incapazes de exercer sua função (ALBERT, et al., 2017).

Mutações em p53 estão intrinsecamente relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias, visto que p53 defeituosas não conseguem ativar a cascata de

sinalização para inibição da replicação celular, permitindo o acúmulo de mutações e a divisão celular descontrolada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2002). Estima-se que 50% dos cânceres possuem p53 defeituosa (NGUYEN et al., 1996).

A proteína 1 de ligação a p53 (53bp1) é responsável pelo reconhecimento da quebra da dupla fita de DNA e interage com p53 para o bloqueio da divisão celular e ativação dos sistema de resposta ao dano (GUPTA et al, 2013). 53bp1 tem sido extensivamente utilizada como um marcador de quebra na dupla fita de DNA no estudo de células tumorais. Já foram descritas na literatura muitas funções de 53bp1 na resposta ao dano ao DNA e escolha da via de reparo e, mais recentemente, foi descoberta outra função para ela em associação com a HP1alpha (PANIER e BOULTON, 2014; ZHANG et. al., 2022).

1.5 HP1ALPHA E 53BP1

Estudos recentes em nematódeos demonstraram que as HP1 são recrutadas para regiões de dano ao DNA e são componentes essenciais do sistema de resposta ao dano. Além disso, o recrutamento de HP1 para regiões de dano não depende de proteínas de reparação do DNA associadas às vias de BER e NER (DINANT e LUIJSTERBURG, 2023). O recrutamento de HP1 independente da ativação das vias de reparo da fita simples de DNA, abre a possibilidade de potencial homologia nos danos ao DNA que levam a quebra da dupla fita.

Fora do contexto de dano ao DNA, a relação de 53bp1 e HP1alpha foi descrita por Zhang et. al. (2022), que demonstrou que estas proteínas sofrem separação de fase líquido-líquido (LLPS) mutuamente dependentes. A ligação entre 53bp1 e HP1alpha ocorre por domínios diferentes dos envolvidos no reconhecimento de quebra da fita dupla, desse modo, células com 53bp1 com defeitos no reconhecimento de quebra da fita dupla de DNA podem ainda assim interagir com HP1alpha. No modelo dos autores, células que mantiveram ou recuperaram a capacidade de ligar 53bp1 e HP1alpha apresentaram resgate da capacidade de remodelação da heterocromatina e maior proteção contra danos e senescência induzidos por estresse.

Desse modo, conservar a ligação entre 53bp1 e HP1alpha contribui para manutenção da estrutura da heterocromatina, e seu estudo pode ser relevante no

contexto de células tumorais, uma vez que a perda da estrutura da heterocromatina está associada a fenótipos de senescência.

1.6 SENESCÊNCIA

Senescência é um processo de envelhecimento celular caracterizado pelo encurtamento dos telômeros, parada mitótica, aumento do tamanho celular e nuclear, secreção de beta-galactosidase, insensibilidade a ativadores de apoptose, e perda da estrutura da cromatina. O desencadeamento do fenótipo associado à senescência (SASP) pode ocorrer por uma lesão celular irreparável, mas que não leva a apoptose, pela exaustão mitótica ou até mesmo pela indução com agentes promotores de senescência (ROGER, TÓMAS e GIRE, 2021).

Senescência pode ser retratado como um estado celular oposto ao de células tumorais, visto que, enquanto as células tumorais dividem-se rápida e indefinidamente, as células senescentes cessam a divisão celular. Apesar de processos opostos, no microambiente tumoral, encontramos células senescentes, e estas contribuem para a progressão tumoral pelo secreção de moléculas (KIM e PARK, 2019; SCHMITT et al, 2022).

Recentemente, o emprego de indutores de senescência tem sido utilizado como adjuvante no tratamento do câncer em estudos *in vitro*. A indução de senescência, leva a redução da taxa proliferativa das células tumorais, permitindo a ação da quimioterapia e a posterior combinação com senolíticos, para remoção das células senescentes (WANG et al., 2022; CALCINOTTO et al., 2019; KIRKLAND e TCHKONIA, 2020).

Para impedir a transição para senescência e assim cessar a divisão mitótica, células tumorais precisam empregar mecanismos que impeçam a exaustão mitótica, o encurtamento dos telômeros, a perda da estrutura da heterocromatina, entre outros. Nesse contexto, a manutenção da ligação de HP1alpha e 53bp1 pode ser relevante na aptidão de células tumorais, uma vez que a conservação da ligação entre estas proteínas está relacionada a capacidade de manter ou recuperar a remodelação da heterocromatina, e a maior proteção contra danos e senescência induzidos por estresse, impedindo assim que as células tumorais entrem em senescência e cessem a divisão mitótica.

2 JUSTIFICATIVA

A HP1alpha é uma proteína encontrada tanto em heterocromatina constitucional, quanto heterocromatina epigenética, e o seu estudo é fundamental para elucidarmos se o comportamento heterogêneo de células de um mesmo tumor é reflexo da regulação epigenética. Já foi identificado que as HP1 são recrutadas para regiões de dano na fita simples de DNA independente da ativação de vias de reparo. Além disso, sua associação com 53bp1, ainda que deficiente no reconhecimento de dano ao DNA, está vinculada ao resgate da capacidade de remodelação da heterocromatina e maior proteção contra danos e senescência induzidos por estresse.

Podemos estudar se o recrutamento de HP1 para regiões de dano na fita simples de DNA também ocorre em regiões de quebra da dupla fita e, se uma maior ligação entre HP1alpha e 53bp1 fornece proteção contra danos ao DNA e senescência em células tumorais.

Essa hipótese pode ser testada com utilização de quimioterápicos alquilantes, como a temozolomida (TMZ), tratamento farmacológico padrão ouro para glioblastomas (TOMAR, et al., 2021). A ação da TMZ se dá pela adição de grupos alquilo no DNA, levando ao pareamento errôneo de nucleotídeos. Eventualmente, ciclos de tentativa de reparo podem levar a quebra da dupla fita (ZHANG, STEVES, BRADSHAW, 2012).

Aplicando esse tratamento em células tumorais duplo marcadas para HP1alpha e 53bp1, podemos identificar a quebra da fita dupla de DNA induzida pela TMZ e observar o recrutamento de HP1 para estas regiões, mensurando a interação destas proteínas pela co-localização e identificando fenótipos de resistência ao quimioterápico.

Portanto, neste estudo, pretendemos observar o recrutamento de HP1alpha para regiões de quebra na fita dupla de DNA em células de glioblastoma submetidas ao tratamento com temozolomida. E assim, determinar o impacto da co-localização de HP1alpha e 53bp1 na tolerância à terapia.

3 OBJETIVO GERAL

Observar a co-localização de HP1alpha e 53bp1 e o recrutamento de HP1alpha para regiões de quebra da dupla fita de DNA, determinando sua influência na tolerância à terapia de células de glioblastoma da linhagem A172.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se há co-localização de HP1alpha e 53bp1 em células da linhagem A172 mantidas em condições basais;
- Caracterizar a co-localização de HP1alpha e 53bp1 em células da linhagem A172 frente ao tratamento com TMZ;
- Avaliar o impacto da co-localização de HP1alpha e 53bp1 na sobrevivência de células da linhagem A172 submetida a TMZ;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Co-localização de HP1alpha e 53bp1 em células únicas de células de glioblastoma” foi formatado conforme normas de publicação requeridas pelo periódico Journal of Cell Science.

CO-LOCALIZAÇÃO DE HP1ALPHA E 53BP1 EM CÉLULAS ÚNICAS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Raiana Gaiardo Girardi¹, Daphne Torgo de Lemos^{1,2}, Guido Lenz^{1,2,*}

¹ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS, Brasil.

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS, Brasil.

*Autor correspondente: gulenz@gmail.com

Palavras-chave: heterocromatina; dano ao DNA, *single-cell*, epigenética, heterogeneidade tumoral.

Mapa recapitulativo

Estudo preliminar aponta que a conservação da estrutura da heterocromatina impacta a tolerância à terapia com temozolomida de células glioblastoma.

Resumo

Estudos recentes demonstraram que as HP1 são recrutadas para regiões de dano a fita simples de DNA. Também foi demonstrado que a HP1alpha forma LLPS com 53bp1 por domínios diferentes do de reconhecimento de DSB e, sua associação contribui para a capacidade de reestruturação da heterocromatina. Considerando que células tumorais possuem deficiência no reparo de DNA e que a perda da estrutura da heterocromatina é relevante para indução de senescência, a co-localização de HP1alpha e 53bp1, bem como o recrutamento de HP1alpha para regiões de DSB pode refletir em fenótipos de resistência. Resultados preliminares da co-localização de *foci* de HP1alpha e 53bp1 em células únicas de glioblastoma mostraram que uma maior área de sobreposição e uma maior proporção dos *foci* de HP1alpha co-localizados com 53bp1 prévios a adição de TMZ estão associados a maior tolerância a quimioterapia. Esses achados indicam que a conservação da estrutura da heterocromatina pode ter auxiliado as células a sobreviverem a DSB induzidas pelo TMZ mesmo que a maquinaria de reparo esteja deficiente. Estes dados precisam ser confirmados pelo aumento do N amostral.

Introdução

As proteínas 1 de heterocromatina (HP1) são uma família de proteínas envolvidas no empacotamento da cromatina (MAISON e ALMOUZNI, 2004). Dentre as proteínas pertencentes a esta família, a HP1alpha é uma proteína envolvida tanto na formação de heterocromatina constitutiva quanto na heterocromatina epigenética, visto que reconhece especificamente a metilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9met2/3) (BANNISTER et.al., 2001; SCHOELZ e RIDDLE, 2022)..

A remodelação da cromatina leva à condensação e descondensação do DNA e ao silenciamento ou superexpressão de genes (NEBBIOSO et al., 2018). Essa modulação pode fornecer a adaptação necessária para que células tumorais apresentem diversidade fenotípica e sobrevivam à quimioterapia (SADIDA et al., 2023). Considerando que células tumorais possuem maquinaria de reparo de DNA deficiente por definição, a formação de heterocromatina pode ser um mecanismo alternativo de prevenção e reparo do dano ao DNA induzido por quimioterápicos alquilantes, como a temozolomida (TOMAR et al., 2021).

Podemos observar o dano ao DNA pelo recrutamento das proteínas 1 de ligação a p53 (53bp1), que estão associadas ao sistema de reconhecimento de quebra da dupla fita de DNA (GUPTA et al, 2013). 53bp1 tem sido uma proteína comumente utilizada como marcador de quebra da fita de DNA em estudo de célula neoplásica para o entendimento da progressão e resistência tumoral.

A relação de 53bp1 e HP1alpha foi definida por Zhang et. al. (2022), que demonstrou que estas proteínas sofrem separação de fase líquido-líquido mutuamente dependentes. O estudo também mostrou que os domínios de ligação entre 53bp1 e HP1alpha não são os mesmos envolvidos no reconhecimento de quebra da fita dupla. Desse modo, células com defeitos no reconhecimento de quebra da fita dupla de DNA podem ainda assim interagir com HP1alpha. No modelo dos autores, células que mantiveram ou recuperaram a capacidade de ligar 53bp1 a HP1alpha apresentaram resgate da capacidade de remodelação da heterocromatina e maior proteção contra danos e senescência induzidos por estresse. Assim, a conservação da ligação entre HP1alpha e 53bp1 garante a manutenção da estrutura da heterocromatina, e pode contribuir para a aptidão de células tumorais.

Desse modo, para compreender a influência do ligação entre HP1alpha e 53bp1 e o recrutamento de HP1alpha para regiões de quebras da dupla fita de DNA

induzidas por quimioterapia em células tumorais, nós analisamos a co-localização de HP1alpha e 53bp1 em uma linhagem de glioblastoma humano com marcação fluorescente para ambas proteínas, e associamos o fenótipo celular individual com a tolerância a terapia.

Resultados

FOCI DE HP1ALPHA E 53BP1 CO-LOCALIZAM EM CÉLULAS TUMORAIS

Para observarmos a existência de co-localização entre HP1alpha e 53bp1, sobrepomos fotografias de células A172 duplo marcadas nos canais verde (GFP-HP1alpha) e vermelho (Apple53BP1trunc) (Fig. 1A) e calculamos a área de sobreposição de *foci* de HP1alpha e 53bp1 para todas as células antes e durante o tratamento com TMZ. Ainda que nem todas células apresentassem sobreposições antes da adição de TMZ, todas células apresentaram sobreposição de HP1alpha e 53bp1 nos primeiros 30min de tratamento. Nos tempos seguintes, a célula cuja sobreposição era inicialmente nula, voltou a apresentar área de sobreposição zerada, bem como outras poucas células apresentaram área de sobreposição igual a 0 em algum momento do tratamento (Fig. 1B).

A célula 6, foi a única a morrer antes de completar 12h de tratamento, por isso vemos sua quantificação somente até as 3h após adição de TMZ (Fig. 1B). As células 9 e 10 não morreram durante o tempo de tratamento, entretanto, após 48h da adição de TMZ, a expressão de GFP-HP1alpha diminuiu, de modo que sua quantificação após este tempo não representava de fato a quantidade de HP1alpha expresso e co-localizado com 53bp1. Por isso sua quantificação foi feita até 46h após a adição de TMZ.

Ainda, avaliamos quanto da área total de *foci* de cada um dos marcadores estava presente em regiões sobrepostas (Fig. 1C, 1D). Observamos uma variabilidade de percentuais de sobreposição entre as células e oscilações durante o tratamento.

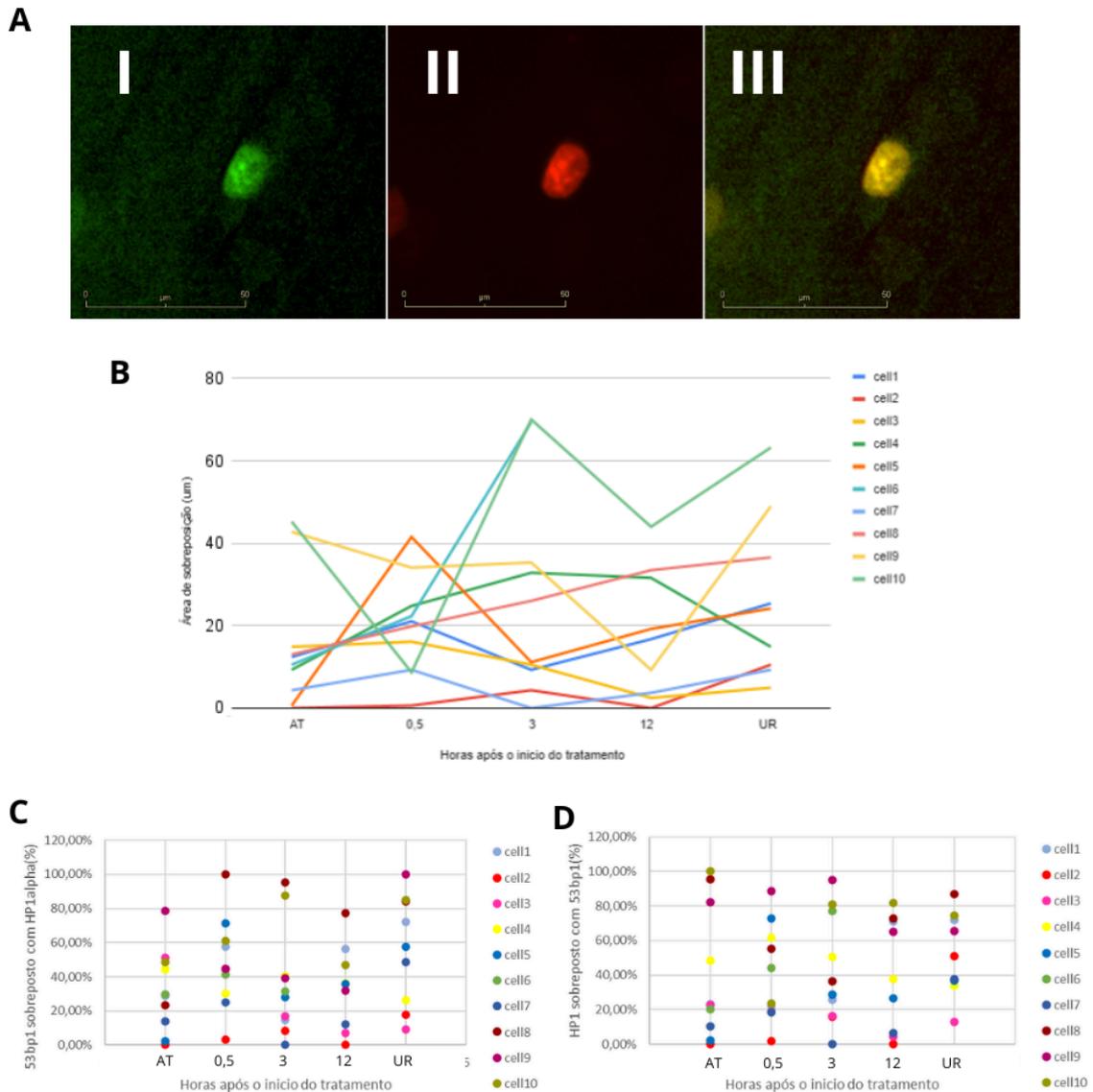


Figura 1. Sobreposição de HP1alpha e 53bp1. (A) Imagens de microscopia da linhagem A172 com dupla marcação para HP1alpha e 53bp1. (I) Imagem adquirida no canal verde, apresentando a expressão de GFP-HP1alpha. (II) Imagem adquirida no canal vermelho, apresentando a expressão de Apple53BP1trunc. (III) Sobreposição dos canais verde e vermelho. (B) Área de sobreposição de *foci* entre HP1alpha e 53bp1 para todas as células em 5 pontos temporais definidos. (C) Percentual de *foci* de 53bp1 sobreposto com *foci* de HP1alpha em relação ao total de área de *foci* de 53bp1 para cada célula. (D) Percentual de *foci* de HP1alpha sobreposto com *foci* de 53bp1 em relação ao total de área de *foci* de HP1alpha para cada célula. Para todos os gráficos, os tempos AT e UR significam, respectivamente, antes do tratamento e último registro aplicável.

HÁ RECRUTAMENTO DE HP1ALPHA PARA REGIÕES DE QUEBRA DA DUPLA FITA DE DNA

Após a adição de TMZ foi observado um aumento crescente da média da área total de *foci* de 53bp1, indicando quebra da fita dupla de DNA provocada pela ação da TMZ. Concomitantemente, ocorreu aumento da média da área total de HP1alpha e da sobreposição de 53bp1 e HP1alpha (Fig. 2A). Desse modo, estes resultados indicam que a quebra da dupla fita de DNA pode ter induzido o aumento da expressão de HP1alpha, e que estas novas proteínas produzidas foram recrutadas para as regiões de quebra da dupla fita.

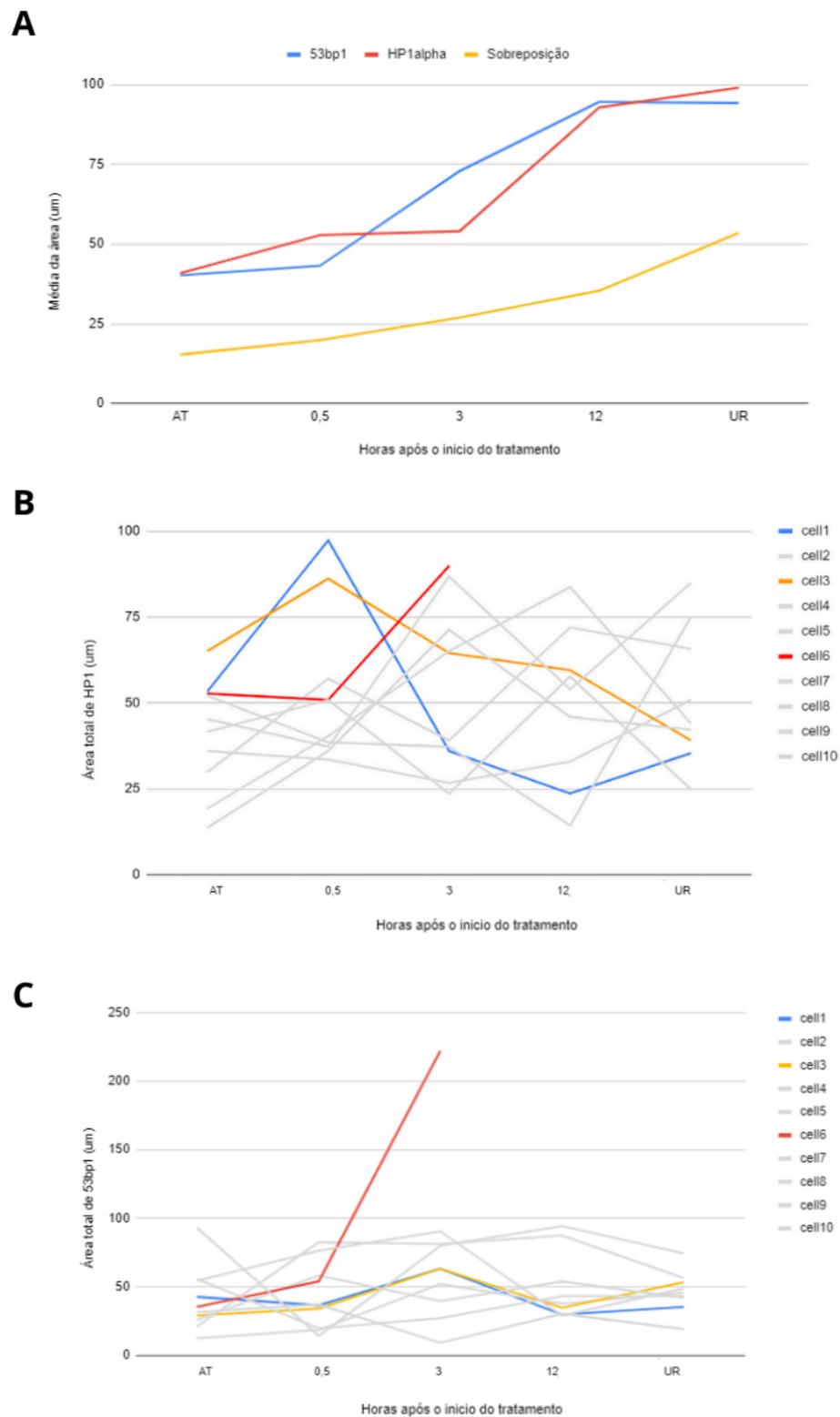


Figura 2. Área total de *foci* de HP1alpha, 53bp1 e da sobreposição ao longo do tempo. (A) Gráfico da média da área total de *foci* HP1alpha, de 53bp1 e da área de sobreposição entre as duas proteínas ao longo do tempo. Gráfico da área total de

foci de HP1alpha (B) e da área total de 53bp1 (C) destacando as células 1, 3 e 6, que apresentavam as maiores áreas de HP1alpha antes da adição de TMZ.

UMA MAIOR ÁREA DE HETEROCROMATINA NÃO CONFERE MAIOR PROTEÇÃO A DANOS AO DNA INDUZIDO POR TMZ

As células que apresentaram maiores áreas de HP1alpha antes do tratamento (células 1, 3 e 6) não foram as células que apresentaram menores áreas de *foci* de 53bp1 em nenhum dos tempos avaliados (Fig. 2B, 2C). Considerando o aumento relativo, ou seja, o percentual de aumento da área de 53bp1 após a adição de TMZ em relação a área inicial de 53bp1, vimos que a célula 1 apresentou o segundo menor aumento da área total de 53bp1 em 12h após a adição de TMZ. Entretanto, não encontramos relação entre uma maior área de heterocromatina prévia com uma menor área de 53bp1 12h após a adição de TMZ (r de pearson = -0,39 e p -value = 0,3). Desse modo, uma maior área de heterocromatina prévia ao tratamento com TMZ não conferiu proteção às células contra as quebras da dupla fita de DNA induzidos por TMZ. Uma maior área de heterocromatina também não apresentou correlação com um maior tempo de sobrevivência (r de pearson = -0,16 e p -value = 0,66).

MAIOR ÁREA DE SOBREPOSIÇÃO E PERCENTUAL DE HP1 ALPHA SOBREPOSTO A 53BP1 PRÉ-TRATAMENTO INFLUENCIAM O TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Analisando o percentual de HP1alpha que se sobrepunha a 53bp1 previamente à adição de TMZ, vimos que as células cuja maior parte de HP1 estava em sobreposição com 53bp1, sobreviveram mais tempo (Fig. 3A). O coeficiente de pearson para amostras foi de 0,847 e o p -value de 0,00197, mostrando uma correlação positiva, forte e significativa entre estas variáveis .

Ainda, determinamos se uma maior área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1 antes do tratamento influenciou o tempo de sobrevivência. Obtivemos coeficiente de Pearson igual a 0,748 e p -value de 0,013, indicando uma forte correlação positiva entre as áreas de sobreposição pré-tratamento (Fig. 3B).

Para as células 9 e 10 foram assumidos como tempo de sobrevivência a última quantificação possível da expressão de HP1alpha, desse modo para estas células estes pontos não correspondem ao momento da morte celular - para as demais sim.

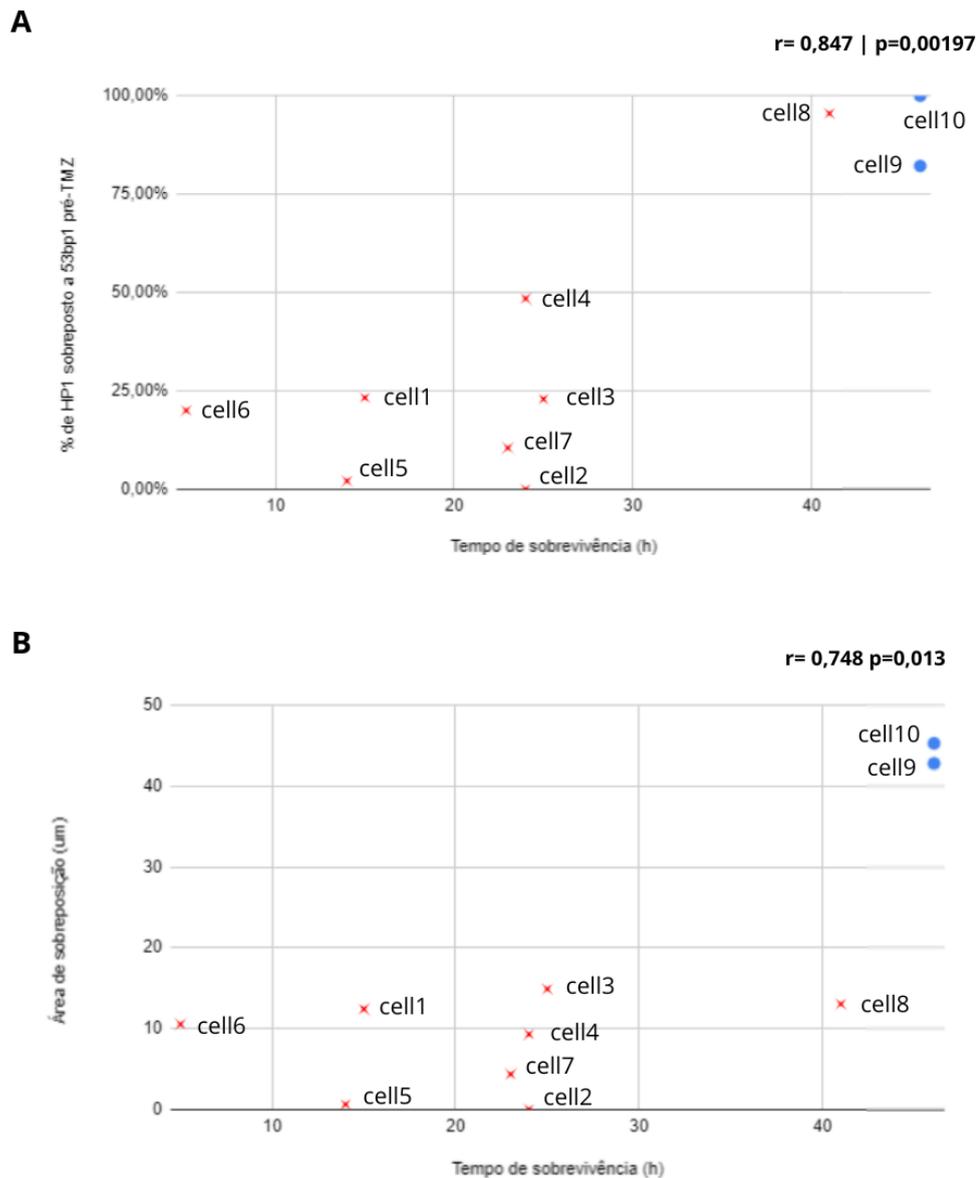


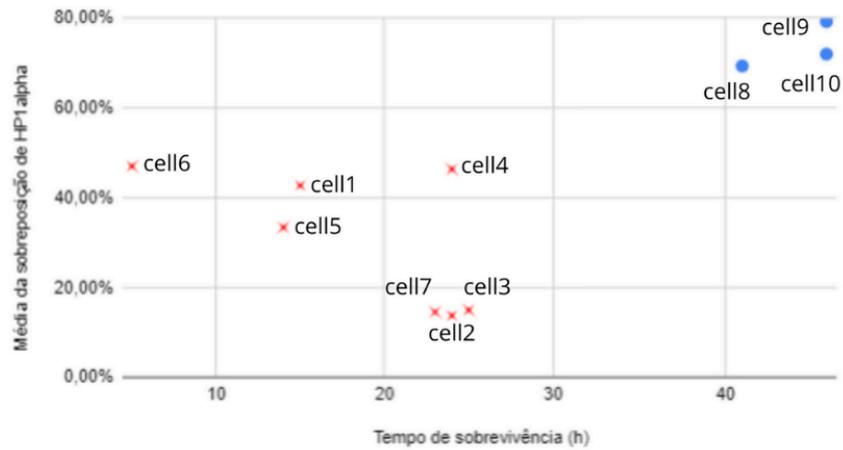
Figura 3. Impacto da área de sobreposição e do percentual de HP1alpha sobreposto no tempo de sobrevivência. (A) Percentual de sobreposição de HP1alpha antes da adição de TMZ pelo tempo de sobrevivência celular. (B) Área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1 pré-TMZ pelo tempo de sobrevivência celular. As células que morreram durante o tratamento estão indicadas pelo X em vermelho em ambos os gráficos.

CÉLULAS QUE SOBREVIVERAM MAIS TEMPO APRESENTAM MÉDIA DO PERCENTUAL DE SOBREPOSIÇÃO DE 53BP1 E DE HP1 ACIMA DE 50%

Para compreendermos se apenas o percentual pré-tratamento de sobreposição de HP1alpha influenciou no desfecho celular, calculamos a variância da área de sobreposição entre HP1alpha e 53bp1 ao longo do tempo em cada célula, para assim caracterizarmos se uma maior dinâmica de recrutamento e dispensa de HP1alpha para regiões de dano ao DNA têm impacto na sobrevivência celular. Essa correlação não foi significativa (r de pearson = -0,18 e p -value = 0,62).

Calculamos, ainda, a média do percentual de 53bp1 e HP1 sobrepostos para cada célula ao longo do tempo, e vimos que célula cujos percentuais de sobreposição HP1alpha e 53bp1 ultrapassam 50% da área total de ambas proteínas, também apresentavam maior tempo de sobrevivência (Fig. 4A, 4B). Entretanto, apesar do coeficiente de pearson apresentar correlação moderada para os percentuais médios de sobreposição (=0,62 para média do percentual de HP1 sobreposto, e =0,61 para média do percentual de 53bp1 sobrepostos), o p -value mostrou que não há significância (0,058 e 0,06, respectivamente).

A



B

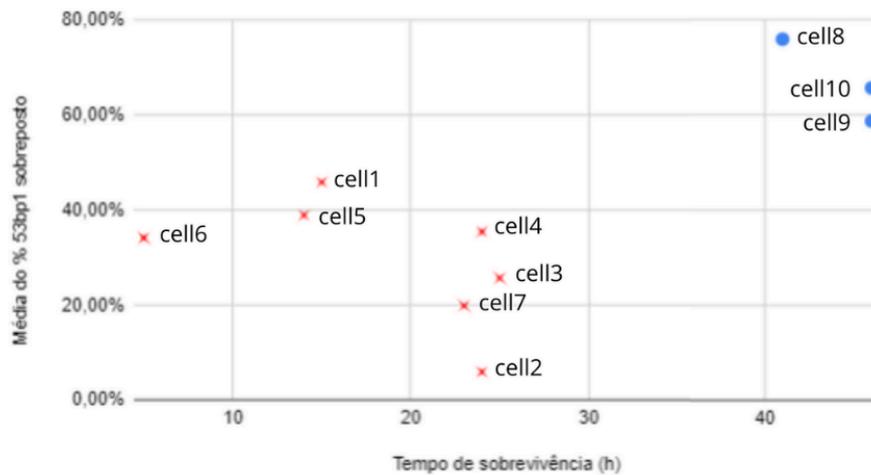


Figura 4. Média da área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1 em relação a área total de cada proteína para cada célula versus tempo de sobrevivência. (A) Média do percentual de HP1alpha ao longo do tempo para cada célula pelo tempo de sobrevivência. (B) Média do percentual de 53bp1 ao longo do tempo para cada célula pelo tempo de sobrevivência. As células que morreram durante o tratamento estão indicadas pelo X em vermelho em ambos os gráficos.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que uma maior área e percentuais de HP1alpha e 53bp1 sobrepostos pré-tratamento estão correlacionados positivamente com um maior tempo de sobrevivência e tolerância a TMZ. Desse modo, células que apresentam maiores taxas de HP1alpha ligado a 53bp1, bem como uma maior área

de co-localização destas proteínas, conseguiram tolerar e responder aos danos no DNA induzidos pelo TMZ, de modo a garantir sua sobrevivência por mais tempo em relação às outras.

Na perspectiva de heterogeneidade tumoral, esses resultados nos mostram que fenótipos de maior conservação da estrutura da heterocromatina influenciam na tolerância e aptidão de células tumorais, de modo que células com maior sobreposição de HP1alpha e 53bp1 durante o período pré-tratamento tendem a resistir mais à quimioterapia. Ainda, nossas quantificações sugerem que a quantidade de heterocromatina pré-tratamento em células tumorais não ofereceu proteção contra as quebras da dupla fita de DNA induzidos pelo TMZ, de modo que a área de HP1alpha pré-tratamento não foi prognóstico de sobrevivência celular.

Mostramos também que, após a adição de TMZ, a média ao longo do tempo do percentual de HP1 e 53bp1 sobrepostos também foi relevante para sobrevivência celular. Esse achado abre margem para que células que não têm um alto percentual de sobreposição antes do tratamento possam sobreviver devido ao posterior aumento da sobreposição. Entretanto, em nossos experimentos, todas variáveis incidiram sobre as mesmas células (área de sobreposição, percentual prévio e média ao longo do tratamento). O aumento da área total de *foci* de HP1alpha e sobreposição com 53bp1 após a adição de TMZ, corrobora com os achados de Dinnant e Luisjsterburg (2023), que demonstraram que as HP1 são recrutadas para regiões de dano ao DNA.

A maior sobrevivência de células que apresentam maior área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1, e cujo maior percentual de HP1 estava co-localizado com 53bp1 previamente à adição de TMZ corrobora com os achados de Zhang et al. (2022), mostrando que a ligação entre HP1alpha e 53bp1 atuou na manutenção da estrutura da cromatina, ainda que, em nossos dados, não tenha desempenhado papel protetor contra danos ao DNA (as células que apresentaram maior área de sobreposição prévia não sofreram menos danos que as células com menor sobreposição).

De qualquer forma, os achados neste trabalho tratam-se de resultados preliminares, que devem ser interpretados com cautela, uma vez que o N amostral é pequeno, não temos réplica biológica, e foram analisadas apenas células cuja transfecção com HP1alpha foi bem sucedida. Ainda, a transfecção de DNA é um método tóxico para células, e sua utilização pode ter influenciado na sensibilidade à

quimioterapia, o que pode explicar a morte da célula 6 nas primeiras horas de tratamento. A transdução lentiviral de linhagens celulares com o plasmídeo GFP-HP1alpha, após subclonagem molecular, pode eliminar os problemas como a toxicidade e permitir a observação a longo prazo dos fenótipos e seu impacto na sobrevivência de tumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Mini-prep e extração de DNA

Bactérias *E. coli* transformadas com o plasmídeo GFP-HP1alpha foram adquiridas da Addgene (#17652), cultivadas e isoladas em 3 colônias para acervo. A partir de uma das colônias, foi feita inoculação em LB líquido contendo 100 mg/mL de ampicilina (marcador de seleção do plasmídeo) e incubadas *overnight* em estufa a 37°C com rotação constante, juntamente com controles positivo e negativo. No dia seguinte, foi realizado o protocolo de extração de DNA do kit Purelink mini-prep da ThermoFisher Scientific. Obteve-se 293,2 ng/μl de plasmídeo extraído, com razão de pureza A260/A280=1,80, medidas através de espectrofotometria em NanoDrop®.

Validação do plasmídeo

Com o plasmídeo extraído, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1%, obtendo uma banda forte próxima a 4kbp. O mapa do plasmídeo fornecido pela Addgene contém 5714bp (Fig. 5A). PCR convencional com primers comerciais M13 F e R amplificou um fragmento observável na eletroforese em 2,5kbp, como esperado para o segmento GFP-HP1alpha.

O plasmídeo também foi enviado para sequenciamento de Sanger, utilizando os primers M13 F e R utilizados no PCR. O resultado do sequenciamento foi alinhado pelo algoritmo BLAST do NCBI, e obteve 98% de correspondência com o mapa fornecido pela addgene na região que engloba o promotor, a sequência codificadora de HP1 e de GFP.

Em uma placa de 24 poços Corning Falcon, foram plaqueadas 50 mil células A172wt, em 5 poços. Em segunda realizou-se transfecção do plasmídeo GFP-HP1alpha utilizando Polietilenoimina (PEI) na proporção 1:6 em A172wt, que

conferiu as células expressão fluorescente no núcleo com *foci* bem formados (Fig. 5B).

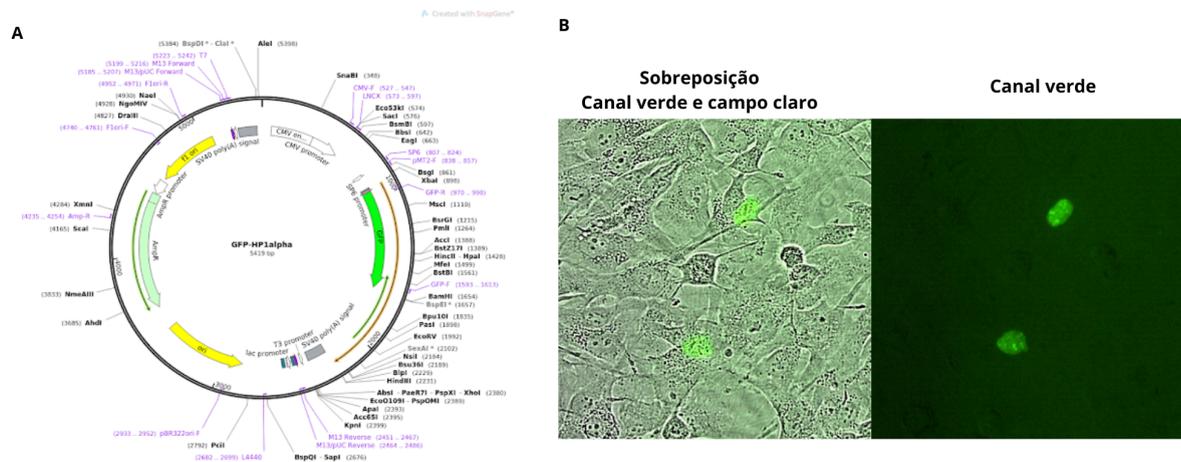


Figura 5. Mapa do plasmídeo GFP-HP1alpha e fotografias da transfecção em A172wt. (A) Mapa do plasmídeo GFP-HP1alpha. Figura retirada de Addgene GFP-HP1alpha (Cheutin et al., 2003). (B) Células A172wt transfectadas com GFP-HP1alpha. À esquerda vemos a sobreposição do canal verde com o contraste de fase, demonstrando a expressão nuclear de GFP. À direita vemos a captura no canal de fluorescência verde, mostrando que a fluorescência foi expressa no núcleo e formou *foci* bem delimitados.

Cultura celular, marcadores fluorescentes e reagentes

A linhagem celular de glioma A172 foi obtida da *American Tissue Culture Collection* (ATCC) e cultivada em *Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *Low Glucose* (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina e estreptomicina e 0,1% de anfotericina B, mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. Células A172 foram transduzidas por vetor lentiviral com o marcador fluorescente de dano ao DNA Apple53BP1trunc (Yang et al., 2015), produzindo A172-53BP1. Em seguida, foram plaqueadas 50 mil células por poço, em 7 poços de uma placa de 24 poços Corning Falcon e transfectadas com o plasmídeo GFP-HP1alpha (Addgene #17652), utilizando PEI na proporção 1 µg de DNA para 6 µg de PEI, um dia antes do início das captura das fotografias.

As células foram testadas regularmente para *Mycoplasma* por PCR convencional, utilizando primers universais descritos por Wong-Lee and Lovett

(1993) e quando positivas, tratadas como cloranfenicol 10 µg por 7 dias, e retestadas 2 dias após o fim do tratamento. Temozolomida diluída em DMSO na concentração de estoque foi posteriormente diluída a 50 µM em DMEM Low suplementado e utilizado para tratar a linhagem A172-53BP1-HP1alpha por 3 dias, no terceiro dia após transfecção.

Microscopia de *time-lapse* e rastreamento de células vivas

Imagens de células A172-53BP1-HP1alpha foram capturadas com intervalos de 1h por 3 dias, começando imediatamente após 30 minutos da adição de tratamento, em objetiva de 20x no equipamento Incucyte® SX3 (Sartorius), utilizando os canais de fluorescência verde e vermelho com uma exposição de 300 e 400 milissegundos, respectivamente. O rastreamento de células individuais foi realizado manualmente.

Quantificação de área dos *foci* de fluorescência e sobreposição de proteínas

Foram selecionadas aleatoriamente 10 células duplo marcadas para serem analisadas e descritas em 5 pontos temporais: 1) antes do tratamento com TMZ; 2) 30 minutos após a adição de TMZ; 3) 3h após a adição de TMZ; 4) 12h após a adição de TMZ; e 5) Último registro fotográfico em que a célula aparece (quando aplicável).

A área dos *foci* fluorescentes de cada marcador e sua sobreposição foi quantificada de maneira semi-automatizada, com o software ImageJ (FIJI), medindo o número de pixels ocupados pelas regiões de maior intensidade de luz. Em seguida, converteu-se o valor de pixels para micrômetros seguindo a constante de conversão da objetiva fornecida pelo manual do equipamento Incucyte® S3. Os *foci* de fluorescência para 53bp1 foram considerados como os pixels de maior intensidade, desse modo delimitados por *threshold* individual e adaptativo em cada célula. A quantificação dos *foci* de HP1alpha considerou apenas *foci* de fluorescência bem formados e distinguíveis da fluorescência basal.

A área de sobreposição dos *foci* foi calculada pelo número de pixels de 53bp1 e HP1alpha que coincidiam sobre a mesma coordenada XY da imagem (Fig. 6). Em

seguida, foram convertidos para micrômetros e feitos os cálculos de porcentagem em relação a área total de cada marcador fluorescente.

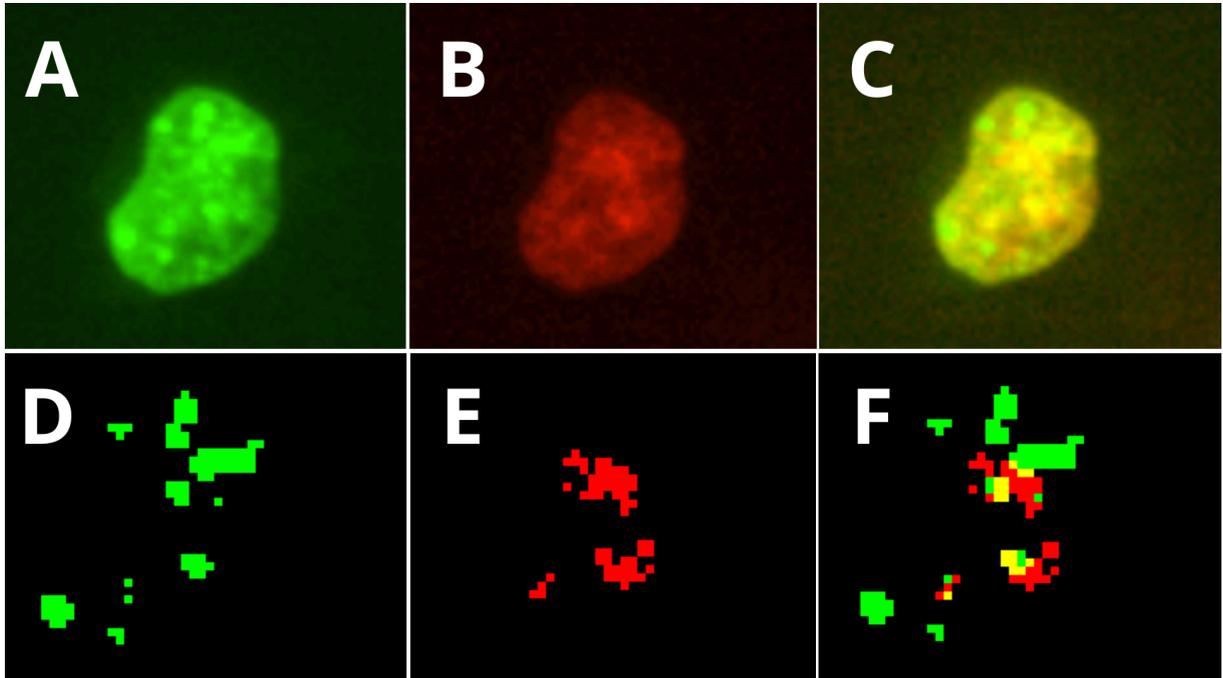


Figura 6. Quantificação da sobreposição de canais. Correspondência de uma mesma célula nos canais verde (HP1alpha-GFP), vermelho (53bp1) e sobrepostos, respectivamente (A, B, C); (D) Pixels correspondentes aos *foci* de HP1alpha-GFP. (E) Pixels correspondentes aos *foci* de 53bp1. (F) Sobreposição de canais . Pixels em amarelo foram considerados sobreposição.

Determinação da correlação e significância estatística

Após mensurar a área de *foci* de HP1alpha, de 53bp1 e sua sobreposição, calculamos médias e variâncias em Excel. Para determinar a correlação entre variáveis calculamos o coeficiente de correlação de Pearson para amostras e *p-value*, utilizamos pipeline própria em Python. Consideramos como correlação muito forte valores maiores que 0,9 e menores que -0,9; correlação forte valores entre 0,7 e 0,9 ou -0,7 e -0,9; e correlação moderada valores entre 0,5 e 0,7 ou -0,5 e -0,7. *P-value* menores que 0,05, foram considerados como significativo, mostrando a baixa probabilidade de o acaso explicar a relação entre as variáveis.

Reconhecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Multi BioCell Lab do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela aquisição de imagens, ao Angelo Angonezi pelo auxílio na metodologia de análise de imagens e ao Tom Misteli pelo plasmídeo GFP-HP1alpha (Addgene plasmid # 17652; <http://n2t.net/addgene:17652> ; RRID:Addgene_17652).

Notas de rodapé

Contribuições dos autores

Conceituação, Metodologia: RGG, DTL, GL; Análise formal, Curadoria de dados: RGG; Redação: RGG, DTL, GL; Supervisão: DTL, GL; Administração do projeto: GL.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). RGG recebeu bolsa da FAPERGS, DTL e GL receberam bolsas do CNPq.

Interesses competitivos

Os autores declaram não haver interesses concorrentes ou financeiros.

REFERÊNCIAS

BANNISTER, A.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J.; MISKA, E.; THOMAS, J.; ALLSHIRE, R.; KOUZARIDES, T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature**, v. 410, p. 120–124, 2001. DOI <https://doi.org/10.1038/35065138>.

CHEUTIN, T.; MCNAIRN, A.J.; JENUWEIN, T.; GILBERT, D.M.; SINGH, P.B.; MISTELI, T.. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. **Science**, 31 jan 2003. DOI 10.1126/science.1078572.

DINANT, Christoffel; LUIJSTERBURG, Martijn S. The Emerging Role of HP1 in the DNA Damage Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, ed. 24, 23 mar. 2023. DOI 10.1128/MCB.01048-09. PMID - 19805510.

GUPTA, A.; HUNT, C.R.; CHAKRABORTY, S.; PANDITA, R.K.; YORDY, J.; RAMNARAIN, D.B.; HORIKOSHI, N.; PANDITA, T.K.. Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Radiation Research**, v. 181, p. 1-8, jan 2014. DOI 10.1667/RR13572.1.

LUIJSTERBURG, Martijn S.; DINANT, Christoffel; LANS, Hannes; STAP, Jan; WIERNASZ, Elizbieta; LAGERWERF, Saskia; WARMERDAM, Daniel O.; LINDH, Michael; BRINK, Maartje C.; DOBRUCKI, Jurek W., ATEN, Jacob A.; FOUSTERI, Maria I., JANSEN, Gert; DANTUMA, Nico P.; VERMEULEN, Wim; MULLENDERS, Leon H.F.; HOUTSMULLER, Adriaan B.; VERSCHURE, Pernette J.; DRIEL, Roel van. Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. **Journal Cell Biology**, v. 185, p. 577-586, 18 mai 2009. DOI <https://doi.org/10.1083/jcb.200810035>.

MAISON, C.; ALMOUZNI, G. HP1 e a dinâmica da manutenção da heterocromatina. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 296–305. 01 abr 2004. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm1355>

NEBBIOSO, A.; TAMBARO, F.P.; DELL'AVERSANA, C.; ALTUCCI, L. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLOS Genetics**, v. 14, ed. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>

SADIDA, H.Q.; ABDULLA, A.; MARZOOQI, S.A.; HASHEM, S.; MACHA, M.A.; AKIL, A.S.A.; BHAT, A.A.. Epigenetic modifications: Key players in cancer heterogeneity

and drug resistance. **Translational Oncology**, v. 39, 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101821>.

SCHOELZ, J.M.; RIDDLE, N.C.. Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. **Epigenetics Chromatin**, 7 mar 2022. DOI 10.1186/s13072-022-00453-8.

TOMAR, S.; KUMAR, A.; SRIVASTAVA, C.; SHRIVASTAVA, A.. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer (BBA)**, v. 1876, ed. 2, dez 2021. DOI 10.1016/j.bbcan.2021.188616

WONG-LEE, J.G.; LOVETT, M.. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. **Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications**, Washington, DC: Am Soc Microbiol, 1993.

ZHANG, L.; GENG, X.; WANG, F. et al. 53BP1 regulates heterochromatin through liquid phase separation. **Nature Communication**, v. 13, 360, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28019-y>

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que uma maior área de sobreposição de HP1alpha e 53bp1, bem como um maior percentual de HP1alpha co-localizado com 53bp1 previamente ao tratamento com TMZ levou a um maior tempo de sobrevivência celular. A maior sobrevivência dessas células pode estar associada às características de interação destas proteínas, que incluem o resgate da estrutura da heterocromatina, maior proteção contra danos e senescência induzidos por estresse.

Mostramos também que há recrutamento de HP1alpha para regiões de danos ao DNA que levam a quebras da dupla fita, visto o aumento concomitante da área de 53bp1, HP1alpha e da sobreposição destas após a adição de TMZ.

Apontamos por fim, que a utilização de moduladores epigenéticos previamente ao tratamento com TMZ, que possam levar a perda da estrutura da heterocromatina pela redução de HP1alpha e 53bp1 sobrepostos, podem contribuir para o maior sucesso da quimioterapia.

De todo modo, nossos resultados precisam ser interpretados com cautela, uma vez que o N amostral é pequeno, não temos réplica biológica, e foram analisadas apenas células cuja transfecção com HP1alpha foi bem sucedida. Ainda, a transfecção de DNA é um método tóxico para células, e sua utilização pode ter influenciado na sensibilidade à quimioterapia.

De qualquer forma, os achados neste trabalho corroboram com a literatura atual e têm coerência com o que se sabe sobre mecanismos de reconhecimento de dano ao DNA e importância da manutenção da estrutura de heterocromatina em tumores.

Para confirmação destes achados, os próximos passos incluem realização de réplica biológica e aumento do N amostral. Ainda, desejamos realizar a transdução lentiviral de linhagens celulares com o plasmídeo GFP-HP1alpha, após subclonagem molecular, eliminando os problemas associados a métodos de expressão transitória de plasmídeo, como a toxicidade e a degradação, permitindo a observação a longo prazo da modulação da heterocromatina em células únicas e seu impacto na sobrevivência de células tumorais.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2017. 1464 p. ISBN 9788582714225.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Survival Rates for Selected Adult Brain and Spinal Cord Tumors**. Versão 5 mai 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/brain-spinal-cord-tumors-adults/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>>. Acesso em 14 mar 2024.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Survival Rates for Breast Cancer**. Versão 17 jan 2024. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>>. Acesso em 14 mar 2024.

AYOUB, N.; JEYASEKHARAN, A.; BERNAL, J.; VENKITARAMAN, A.. HP1- β mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. **Nature**, p. 682–686, 2008. DOI <https://doi.org/10.1038/nature06875>

BANNISTER, A.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J.; MISKA, E.; THOMAS, J.; ALLSHIRE, R.; KOUZARIDES, T.. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature**, v. 410, p. 120–124, 2001. DOI <https://doi.org/10.1038/35065138>.

CALCINOTTO, A.; KOHLI, J.; ZAGATO, E.; PELLEGRINI, L.; DEMARIA, M.; ALIMONTI, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. **Physiological Reviews**, v. 99, ed. 2, p. 1047-1078, abr 2019. DOI 10.1152/physrev.00020.2018.

CASADO-PELAEZ M, BUENO-COSTA A, ESTELLER M. Single cell cancer epigenetics. **Trends Cancer**, v. 8, ed. 10, p. 820-838, jul 2022. DOI 10.1016/j.trecan.2022.06.005.

CHEUTIN, T.; MCNAIRN, A.J.; JENUWEIN, T.; GILBERT, D.M.; SINGH, P.B.; MISTELI, T.. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. **Science**, 31 jan 2003. DOI 10.1126/science.1078572.

CHMIELIK, E.; RUSINEK, D.; OCZKO-WOJCIECHOWSKA, M.; JARZAB, M.; KRAJEWSKA, J.; CZARNIECKA, A.; JARZAB, B. Heterogeneity of Thyroid Cancer. **Pathobiology**, v. 85, ed. 1-2, p. 117-129, 6 fev 2018. DOI 10.1159/000486422.

DINANT, Christoffel; LUIJSTERBURG, Martijn S. The Emerging Role of HP1 in the DNA Damage Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, ed. 24, 23 mar. 2023. DOI 10.1128/MCB.01048-09. PMID - 19805510.

FURTADO, C.L.M.; LUCIANO, M.C.S.; SANTOS, R.D.S.; FURTADO, G.P.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, p.1164-1176. 13 Jul 2019. DOI 10.1080/15592294.2019.1640546.

GUPTA, A.; HUNT, C.R.; CHAKRABORTY, S.; PANDITA, R.K.; YORDY, J.; RAMNARAIN, D.B.; HORIKOSHI, N.; PANDITA, T.K.. Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Radiation Research**, v. 181, p. 1-8, jan 2014. DOI 10.1667/RR13572.1.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, ed. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, ed. 1, p. 57-70, 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.. **Biologia Celular e Molecular**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 27 fev 2023. 416p.

KIM, Y.H.; PARK, T.J. Cellular senescence in cancer. **BMB Reports**, v. 52, ed. 1, p. 42-46, jan 2019. DOI 10.5483/BMBRep.2019.52.1.295.

KIRKLAND, J.L.; TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. **Journal of Internal Medicine**, v. 288, ed. 5, p. 518-536, nov 2020. DOI 10.1111/joim.13141.

LENZ, G.; ONZI, G.R.; LENZ, L.S.; BUSS, J.H.; SANTOS, J.A.; BEGNINI, K.R.. The origins of phenotypic heterogeneity in cancer. **Câncer Research**, v. 82, p. 3–11, 1 jan 2022. DOI <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1940>

LENZ, L.S. et al. Cancer Cell Fitness Is Dynamic. **Cancer Research**, 15 fev 2021. DOI <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>.

LENZ L. S.; LENZ, G. The role of dynamic phenotypes in cancer. **Oncotarget**, v. 12, p. 1962-1965, 2021. DOI 10.18632/oncotarget.28006.

LEVINE, A.J.. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**. 7 fev 1997. DOI 10.1016/s0092-8674(00)81871-1.

LI, H.; ZIMMERMAN, S.E.; WEYEMI, U. Genomic instability and metabolism in cancer. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 364, p. 241-265, 1 jun 2021. DOI 10.1016/bs.ircmb.2021.05.004.

LUIJSTERBURG, Martijn S.; DINANT, Christoffel; LANS, Hannes; STAP, Jan; WIERNASZ, Elizbieta; LAGERWERF, Saskia; WARMERDAM, Daniel O.; LINDH, Michael; BRINK, Maartje C.; DOBRUCKI, Jurek W., ATEN, Jacob A.; FOUSTERI, Maria I., JANSEN, Gert; DANTUMA, Nico P.; VERMEULEN, Wim; MULLENDERS, Leon H.F.; HOUTSMULLER, Adriaan B.; VERSCHURE, Pernette J.; DRIEL, Roel van. Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. **Journal Cell Biology**, v. 185, p. 577-586, 18 mai 2009. DOI <https://doi.org/10.1083/jcb.200810035>.

MAEDA, R.; TACHIBANA, M. HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases. **EMBO Reports**, 15 fev 2022. DOI 10.15252/embr.202153581.

MAISON, C.; ALMOUZNI, G. HP1 e a dinâmica da manutenção da heterocromatina. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 296–305. 01 abr 2004. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm1355>

MINCHOM, A; AVERSA, C.; LOPEZ, J. Dancing with the DNA damage response: nextgeneration anti-cancer therapeutic strategies. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, p. 1-18, 2018.

NEBBIOSO, A.; TAMBARO, F.P.; DELL'AVERSANA, C.; ALTUCCI, L. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLOS Genetics**, v. 14, ed. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2019. 1278 p. ISBN 8582715331.

NGUYEN, D. M.; SPITZ, F. R.; YEN, N.; CRISTIANO, R. J.; ROTH, J. A. Gene therapy for lung cancer: enhancement of tumor suppression by a combination of sequential systemic cisplatin and adenovirus-mediated p53 gene transfer. **Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Tokyo, v. 112, n. 5, p. 1372-1377, 1996.

OSTROM, Q.T. et al.. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. **Neurooncology**, vol. 23, 2021. DOI 10.1093/neuonc/noab200.

PAN, H.; JIANG, Y.; BOI, M. et al. Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. **Nature Communications**, v. 6, 2015. DOI <https://doi.org/10.1038/ncomms7921>.

PANIER, S.; BOULTON, S. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 7–18, 2014. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm3719>.

PATEL, AP et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**. New York, 2014. DOI 10.1126/science.1254257.

REYES, J.; LAHAV, G. Leveraging and coping with uncertainty in the response of individual cells to therapy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 51, p. 109–115, 2018.

ROGER, L.; TOMAS, F.; GIRE, V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, ed. 23, 6 dez 2021. DOI 10.3390/ijms222313173.

ROULOT, A.; HÉQUET, D.; GUINEBRETIERE, J.M.; VINCENT-SALOMON, A.; LEREBOURS, F.; DUBOT, C.; ROUZIER, R. Tumoral heterogeneity of breast cancer. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, p. 653-660, dez 2016. DOI 10.1684/abc.2016.1192.

SADIDA, H.Q.; ABDULLA, A.; MARZOOQI, S.A.; HASHEM, S.; MACHA, M.A.; AKIL, A.S.A.; BHAT, A.A.. Epigenetic modifications: Key players in cancer heterogeneity and drug resistance. **Translational Oncology**, v. 39, 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101821>.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L.A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. **Annual Review Biochemistry**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SCHOELZ, J.M.; RIDDLE, N.C.. Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. **Epigenetics Chromatin**, 7 mar 2022. DOI 10.1186/s13072-022-00453-8.

SHEFFIELD, N.; PIERRON, G.; KLUGHAMMER, J. et al. DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. **Nature Medicine**, v. 23, p. 386–395, 2017. DOI <https://doi.org/10.1038/nm.4273>.

SHENG, H.; LI, H.; ZENG, H.; ZHANG, B.; LU, Y.; LIU, X.; XU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, L. Heterogeneity and tumoral origin of medulloblastoma in the single-cell era. **Oncogene**, v. 43, ed. 12, p. 839-850, 14 fev 2024. DOI [10.1038/s41388-024-02967-9](https://doi.org/10.1038/s41388-024-02967-9).

SCHMITT, C.A.; WANG, B.; DEMARIA, M. Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, ed. 10, p. 619-636, ago 2022. DOI [10.1038/s41571-022-00668-4](https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4).

SOUSA, V.M.L.; CARVALHO, L. Heterogeneity in Lung Cancer. **Pathobiology**, v. 85, ed. 1-2, p. 96-107, 10 abr 2018. DOI [10.1159/000487440](https://doi.org/10.1159/000487440).

TOMAR, S.; KUMAR, A.; SRIVASTAVA, C.; SHRIVASTAVA, A.. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer (BBA)**, v. 1876, ed. 2, dez 2021. DOI [10.1016/j.bbcan.2021.188616](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188616)

UI, A.; CHIBA, N.; YASUI, A. Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer. **Cancer Science**, v.111, ed. 5, p. 1443-1451, mai 2020. DOI [10.1111/cas.14404](https://doi.org/10.1111/cas.14404).

WANG, L.; LANKHORST, L.; BERNARDS, R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, p. 340-355, 3 mar 2022. DOI [10.1038/s41568-022-00450-9](https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9).

YI, S.; LIN, S.; LI, Y.; ZHAO, W.; MILLS, G.B.; SAHNI, N.. Functional variomics and network perturbation: connecting genotype to phenotype in cancer. **Nature Reviews Genetic**, p. 395-410, 2017. DOI [10.1038/nrg.2017.8](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.8).

ZHANG, J.; STEVENS, M.F.G.; BRADSHAW, T.D.. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, ed. 1, p. 102-114, 2012. DOI 10.2174/1874467211205010102.

ZHANG, L.; GENG, X.; WANG, F. et al. 53BP1 regulates heterochromatin through liquid phase separation. **Nature Communication**, v. 13, 360, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28019-y>

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF CELL SCIENCE

Manuscript preparation

1. General information

Journal of Cell Science requires authors to submit their manuscripts online using the Bench>Press manuscript processing system. Authors are required to read our journal policies before preparing their manuscripts, and all manuscripts should adhere to the journal's terms of submission.

All pre-submission or general editorial queries should be directed to the Editorial Office.

1.1. New submissions – format free

To make manuscript submission as easy as possible for authors, Journal of Cell Science has a format-free submission policy.

At first submission, authors may submit their manuscript in any format; however, we do encourage authors to read the manuscript preparation guidelines below and to consider how easy a manuscript is to read by reviewers and editors (e.g. line spacing, line numbers).

All manuscripts must adhere to our guidelines regarding manuscript length.

1.2. Revised submissions

On Journal of Cell Science, >95% of revised submissions are accepted for publication.

All revised manuscripts should adhere to the guidelines below on preparing text and tables, figures, movies and supplementary information.

Authors should complete and submit our submission checklist with their manuscripts. This form asks authors to confirm that they have followed best practice guidelines regarding experimental subjects, data reporting and statistics. The checklist is based

on the NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research and is intended to help ensure high standards for reporting and to aid reproducibility.

2. Manuscript length

Research articles and **Tools and Resources articles**: the total length of the article should not exceed 8000 words, including the main text and figure legends, but not the title page, abstract, materials and methods section or reference list (reference citations in the text do count towards the word limit). The total number of display items (Figures and Tables) must not exceed eight (8).

Short reports: the total length of the article should not exceed 3000 words, including the main text and figure legends, but not the title page, abstract, materials and methods section or references (reference citations in the text do count towards the word limit). The total number of display items (Figures and Tables) must not exceed four (4).

Note that final word limits will depend on the paper submitted and are at the discretion of the Editors.

3. Preparing the text and tables

The information below relates to a standard Research Article. For all other article types, please refer to the style and layout guidelines provided on our article types page.

3.1 File formats

For manuscript text and tables, our preferred **file format** is **Microsoft Word .docx** (or **.doc**). We also accept Pages (rtf format) and LaTeX.

Please include tables as part of the manuscript file. Tables must be editable and not embedded as an image.

Authors working in LaTeX can download and use our template. Please upload a single PDF at first submission and include any component files, such as .st (style file), .cls (class file) and .bib (bibliography file) at revision submission. Please note that LaTeX files will be converted to Microsoft Word files during the production

process and that authors will be required to check the conversion of symbols and special characters carefully at the proofing stage.

For mathematical equations, our preferred file format is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) and LaTeX.

3.2. Article sections

3.2.1. Title page

This section should include a **title** of 120 characters or less that clearly and concisely summarises your specific findings and avoids specialist abbreviations, a **running title** of 32 characters or less, the full **names** (including middle initials) **and affiliations of all authors** (including present addresses for authors who have moved), and the **corresponding author's email address**. Please note any cases where authors contributed equally to the work. Please also include 3-6 **key words** for indexing purposes (select key words that will make your manuscript easily searchable).

3.2.2. Summary statement

Provide a brief Summary Statement for use in emailed and online tables of content alerts. The text should be approximately 180-200 characters, and should explain, without overstatement, why someone should read the article. Please do not simply repeat the title, and avoid unfamiliar terms and abbreviations, as the text should be comprehensible to non-experts. We reserve the right to edit the text.

3.2.3. Abstract

Provide a brief abstract of no more than 180 words. This should succinctly and clearly introduce the topic of the paper, summarise the main findings and highlight the significance of the data and main conclusions. The abstract is used by abstracting services without modification and is often read more frequently than the full paper and therefore needs to be comprehensible in its own right. Do not include subheadings or references, and avoid any non-standard abbreviations.

3.2.4. Introduction

This section should succinctly provide the background information that is required to set the results into their proper biological context. It should not contain subheadings.

3.2.5. Results

This section should describe the results of the experiments performed and should be broken up by subheadings to organise the findings presented and walk the reader through the results. Reproducibility of results must be included– see our submission checklist for further information. Please ensure that the distinction between new results and published findings/established facts is clear.

3.2.6. Discussion

This section should explain the significance of the results and should place them into the broader context of the current literature. The Discussion may contain subheadings to highlight important areas that are expanded on in the text.

3.2.7. Materials and methods

This section should include sufficient detail to understand and to replicate the experiments performed, in conjunction with cited references. To facilitate detailed description of materials and methods (allowing the reader to fully understand and replicate the experimental protocols), this section does not count towards the word limit for article length. The materials and methods should be divided into sections, and should include subsections detailing reagents, animal models and statistical analysis. Provide names and locations (town, state, country) for ALL equipment and reagent suppliers. Give Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) for all experimental species. Reporting standards should follow those recommended in our journal policies and submission checklist.

Authors who use AI tools in the writing of a manuscript, generation of code or production of images, or in the collection and analysis of data, must disclose this in the Materials and Methods section. They should describe which AI tool was used and how it was used (note that this section does not count towards the word limit for article length). Please note that authors are fully responsible for the content of their manuscript, including those parts produced by an AI tool.

3.2.8. Acknowledgements

This section should mention any individuals or groups that do not qualify for authorship according to our authorship guidelines, but have contributed to the research presented (e.g. in terms of reagents, time, expertise) or writing of the manuscript. Please also include details of support from core facilities (e.g. microscopy, sequencing, proteomics facilities); an example of how this can be done is included below.

“The authors thank the WEHI core facilities for their important contributions to this work, particularly The WEHI Advanced Genomics Facility, The Centre for Dynamic Imaging and the WEHI Bioservices Facility.”

3.2.9. Competing interests

Include a statement to identify any potential influences that readers may need to know about when thinking about the implications of the presented research. For more specific information regarding the affiliations and associations that must be disclosed, please see our journal policies page. Authors without financial or competing interests should explicitly assert this and include the statement ‘No competing interests declared’.

3.2.10. Funding

Details of all funding sources must be provided. It is the responsibility of the corresponding author to provide the relevant funding information from ALL authors. Please provide the official funding agency name as listed on the Crossref Open Funder Registry, i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH', and all relevant grant numbers. If your Funder is not listed in the Registry, please provide the name in full.

Where individuals need to be specified for certain sources of funding, please add initials after the relevant agency or grant number. Please use the following format: This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789]. Where no specific funding has been provided for the research, please state ‘This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors’.

3.2.11. Data availability

All publicly available datasets supporting your work should be included in the Data availability section. Details should include repository name, identifier such as accession number or doi and, where possible, include a hyperlink to the URL of the dataset. Datasets should be made publicly available at the time of publication. For more information on our data deposition requirements, see please see our Journal Policies.

Please note that Journal of Cell Science endorses the Force 11 Data Citation Principles and recommends that references to datasets should also be included in the reference list with DOIs/accession numbers and hyperlinks, where available.

If all data are included only within the manuscript itself and/or its Supplementary information, please include a default statement as follows:

Data availability: All relevant data can be found within the article and its supplementary information.

3.2.12. Diversity and inclusion statement

Authors may provide a Diversity and inclusion statement in their paper. This can document diversity and inclusion practices relevant to both the scientific content of the paper, and authorship and attribution.

3.2.13. References

All references cited in the text, tables and figure legends should be included in a single reference list at the end of the article. We strongly encourage the citation of the primary literature over review articles wherever possible, and for this reason do not have a limit on the number of references that can be included. For specific information about reference formatting, please see the references section below.

3.2.14. Figure legends

Figure legends should be listed at the end of the manuscript. The first sentence of the legend should summarise the figure and be in bold. Each figure legend should stand alone and should contain enough information to ensure that the figure is understandable without having to refer to the main text. Figure panels should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.), and each panel should be described in

the legend. Any abbreviations not given in the main text should be defined. For further details on what should be included in figure legends, please refer to our submission checklist.

3.3. Preparing the text

3.3.1. General information

- Prepare manuscripts in English (either US or UK spelling is acceptable but be consistent within the manuscript). Your writing should be comprehensible to editors and reviewers, and your writing style should be concise and accessible. If English is not your first language, please consider using a language editing service prior to submission.
- Ensure that the language in your manuscript is original and does not contain previously published passages of text (including those from your own publications) – see our journal policies for more details. All accepted manuscripts are routinely screened using plagiarism-detection software.
- Use 1.5 line spacing and continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing.
- Do not embed figures in the text.
- Cite each figure, table and movie in the text in numerical order. Figure or table parts should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.). Use the following format for citations: Fig. 1A,B or Figs 1, 2 or Table 1 or Movie 1.
- If necessary, display equations should be cited using the following format: Eqn 1.
- For supplementary figures, tables and equations, cite as Fig. S1, Table S1, Eqn S1.
- Define abbreviations at first mention.
- For special characters not available on a standard keyboard (e.g. Greek characters, mathematical symbols), use the Symbol font or the 'Insert Symbol' function in Microsoft Word, where possible. For special characters that are not available via this route, please use MathType characters; do not use embedded images (e.g. GIF).

3.3.2. Units and nomenclature

- Units of measurement should follow the SI system, e.g. ml s⁻¹ rather than ml/s. See guidance on using the SI convention from NIST. Type a space between a digit and a unit, e.g. 1 mm (except 1%, 1°C).
- Use s.e.m. and s.d. for standard errors, etc.
- Taxonomic nomenclature: the Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) should be provided for all experimental species. All species names should be italicized.
- Genetic nomenclature: gene names should be in italic type, but the protein product of a gene should be in Roman type. Genetic nomenclature should be in accordance with established conventions and should be approved by the relevant nomenclature curator if applicable. See below for some relevant links.
 - HGNC list of genome databases:
<https://www.genenames.org/useful/all-links#ovgdb>
 - *Caenorhabditis elegans*: <https://www.wormbase.org>
 - *Dictyostelium*: <https://dictyocr.org/>
 - Chicken: <http://birdgenenames.org/cgnc/guidelines>
 - *Drosophila*: <https://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>
 - Human: <https://www.genenames.org/about/guidelines>
 - Maize: https://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php
 - Mouse: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/lists/lists.shtml>
 - *Saccharomyces cerevisiae*: <https://www.yeastgenome.org/>
 - *Schizosaccharomyces pombe*:
<https://www.pombase.org/submit-data/gene-naming-guidelines>
 - *Xenopus*: <https://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>
 - Zebrafish:
<https://zfin.atlassian.net/wiki/spaces/general/pages/1818394635/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Conventions>

3.3.3. References

3.3.3.1. References in text

References in the text should be cited using the Harvard (name, date) referencing system.

Each reference cited in the text must be listed in the Reference list and vice versa: please check these carefully. Where references are cited only in supplementary information, please provide a separate supplementary reference list and do not include these in the main reference list.

Literature citations in text are as follows.

- One author – (Jones, 1995) or (Jones, 1995; Smith, 1996).
- Two authors – (Jones and Kane, 1994) or (Jones and Kane, 1994; Smith, 1996).
- More than two authors – (Jones et al., 1995) or (Jones et al., 1995a,b; Smith et al., 1994, 1995).
- Manuscripts accepted for publication but not yet published: include in Reference list and cite as (Jones et al., in press).
- Manuscripts posted on preprint servers but not yet published: include in Reference list and cite as (Smith et al., 2016 preprint).
- Dataset: we recommend that all publicly available datasets are fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI. Cite as (Jones and Jane, 1994).
- Citation of unpublished work: we discourage citation of unpublished data; if it is necessary, use the format (S. P. Jones, unpublished observations/data). Unpublished data cannot be included in the Reference list.
- PhD theses: include in Reference list and cite as (Smith, 2016).
- Website URLs: cite in the text but do not include in the Reference list; provide the URL and, if the website is frequently updated, the date that the site was accessed.
- Personal communications (i.e. the unpublished observations of other scientists): when a person who is not an author on the paper is the source of unpublished data, those data should be cited as a personal communication using the format (full name, institution, personal communication). Personal communications should not be cited in the Reference list and will only be published when substantiated by written permission (e.g. email) from the scientist cited.

- Dataset: we recommend that all publicly available datasets are fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI. Cite as (Jones and Jane, 1994).
 - Authors should avoid citing articles from journals that are suspected to be predatory in nature (see <https://thinkchecksubmit.org/> for an online resource designed to help researchers identify trusted journals).
 - Citation of retracted articles is strongly discouraged. If it is necessary to cite a retracted paper, the notice of retraction must also be cited and it must be obvious to the reader that the article has been retracted. Editors may question why a retracted publication has been cited.

3.3.3.2. Reference List

References are listed in alphabetical order according to surname and initials of first author. Please note that a doi will automatically be inserted for all relevant references at the proof stage.

- Use the following style:

Journal

Rivera, A. R. V., Wyneken, J. and Blob, R. W. (2011). Forelimb kinematics and motor patterns of swimming loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): are motor patterns conserved in the evolution of new locomotor strategies? *J. Exp. Biol.* **214**, 3314-3323.

Book

Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Book chapter

Feller, G. (2008). Enzyme function at low temperatures in psychrophiles. In *Protein Adaptation in Extremophiles* (ed. K. S. Siddiqui and T. Thomas), pp. 35-69. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Preprint server

Baillie-Johnson, P., van den Brink, S. C., Balayo, T., Turner, D. A. and Martinez Arias, A. (2014). Generation of aggregates of mouse ES cells that show symmetry breaking, polarisation and emergent collective behaviour in

vitro. *bioRxiv* doi:10.1101/005215.

PhD thesis

Jones, A. R. (2016). Title of thesis. *PhD thesis*, University of Washington, Seattle, WA.

Dataset with persistent identifier

Zheng, L.-Y., Guo, X.-S., He, B., Sun, L.-J., Peng, Y. and Dong, S.-S.

(2011). Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*).

GigaScience Database. <https://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Kingsolver, J. G., Hoekstra, H. E., Hoekstra, J. M., Berrigan, D., Vignieri,

S. N., Hill, C. E., Hoang, A., Gibert, P. and Beerli, P. (2001). Data from: The strength of phenotypic selection in natural populations. *Dryad Digital*

Repository. <https://dx.doi.org/10.5061/dryad.166>.

- If there are more than 10 authors, use 'et al.' after the 10th author.
- Within a group of papers with the same first author, list single author papers first, then papers with two authors, then et al. papers. If more than one reference exists for each type, arrange in date order. Use a and b for papers published in the same year.
- 'In press' citations must have been accepted for publication and the name of the journal or publisher included.

3.4. Preparing tables

Prepare tables in 'cell' format and include in the same file as the main text. Tables must be editable and not embedded as an image.

The title of the table should be a single sentence and should summarise the contents of the table. Details referring to one or more isolated item(s) in the table are best given in a table footnote. Units should be given in parentheses at the top of each column (do not repeat in the table).

3.5. Preparing display equations

Our preferred file format for equations is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) or LaTeX.

Please number all display equations, consecutively. They should take the form:

$$Q = \frac{-\kappa A_p [P]}{\mu T_p}, \quad (1).$$

Units should be defined in the text rather than included in the equation.

4. Preparing figures

4.1. General information

For best practice and transparency, and to allow better assessment of the quality of the data and whether the data support the conclusions, **we strongly recommend** that you:

1. Use graphs that allow the reader to see the true data spread (i.e. box-and-whisker plots, super plots, etc. See PMID: 32346721 for more information.). If using box-and-whisker plots, please state what the whiskers represent. See here for helpful information.
2. Use appropriate statistics with the sample size representing biological replicates rather than technical replicates
3. Provide, if using western blots, one additional supplementary figure (as a single PDF or TIFF file), named 'Blot transparency', that contains the full, uncropped blots or a substantial portion of the blots that highlights where the bands provided in the figures have been taken from. Size/molecular weight markers should be present. This additional file should refer back to the relevant figures. It will not contribute towards your supplementary figure limit.

Figures should be numbered in a single series that reflects the order in which they are referred to in the text.

Figures should be prepared at the smallest size that will convey the essential scientific information; final figure size is at the discretion of the journal. For further information on how to arrange your figures to optimise viewing by reviewers and readers, download our figure layout guidelines.

At initial submission, you may submit a single PDF file containing all text and figures. Once an article has been accepted for publication, you are required to submit separate files for each figure (see below for file formats).

Figure legends should be included in the main text file and not in the figure file.

There are no charges for the use of colour in figures, although gratuitous use of colour in graphs and diagrams should be avoided and colour should only be used to improve scientific clarity.

We strongly encourage the use of colours that are suitable for colour-blind readers, particularly in the preparation of fluorescent microscopy images. Most notably, we discourage the use of red/green for the display of 2-channel images; authors should consider an alternative colour combination (e.g. magenta/green).

4.2. Preparing photographic images

4.2.1. General information

Photographic images (also known as bitmap images) are made up of pixels (e.g. light, fluorescence and electron microscopy, gels, and traditional photography)

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm x 210 mm.
- Images should be saved at a resolution of 300 pixels per inch. Any image quality option should be set to maximum.
- For figures that contain both photographs and line art or text, 600 pixels per inch preferred.
- For micrographs, use a scale bar to show the magnification and give the length of this in the figure legend.
- Colour: supply images in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

4.2.2. File formats

Accepted file formats are: **EPS/PDF/TIFF/JPEG** .

- ARIAL or HELVETICA must be the font choice used throughout figure preparation.

PowerPoint images: we do NOT accept PowerPoint files. Instead, please save as PDF using the instructions below.

- Go to 'print' and then choose 'Save as PDF' in the print dialogue box
- You can download free software which will enable you to print EPS/PDF files to disk: Download Acrobat Reader

4.3. Preparing graphs and diagrams (line art)

4.3.1. General information

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm × 210 mm.
- Line thicknesses and symbols should be of sufficient size to ensure clarity if the figure is reduced in size.
- For graphs, our preferred symbols are filled and open circles, triangles, squares, or diamonds; where possible, the same symbol should be used for the same entity in different figures.
- Colour: supply line art in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

4.3.2. File formats

Authors should submit their source figures in an editable format (vector graphic) that retains font, line and shape information. This format ensures that we can edit where necessary and produce high-quality print and online PDFs.

We accept the following file formats for graphs/line art: EPS, PDF, and WMF.

- Applications such as Adobe Illustrator, Canvas, DeltaGraph, Corel Draw, Freehand, MatLab and SigmaPlot provide these formats.
- Please ensure that you 'export' or 'save' with (text/font) information included
- Save text/font information as 'text' not 'curves' or 'outlines'.

- If combining images, always 'embed' images; do NOT simply 'link' them. In Adobe Illustrator, copying and pasting or dragging an image directly from Adobe Photoshop will embed the image. Alternatively, if you use the 'Place' command, uncheck 'Link' in the dialogue box. For other software applications, please refer to the documentation (often there will be a 'link', 'proxy', 'OLE' or 'OPI' option, which must NOT be used with EPS files).
- *Note that submission of JPEG or TIFF format for graphs/line art may delay production of your article.*

4.4. Image manipulation

Any alterations made to figures using computer software must be consistent with our image manipulation policy. The images presented in the manuscript must remain representative of the original data, and the corresponding author will be asked to confirm this at submission. Please read our requirements for preparing your figures (download PDF) to avoid a potential delay in the publication process or rejection on the basis of non-compliance with these guidelines. This guide also includes recommendations on improving figure layout to help reviewers and readers appreciate your data.

All accepted manuscripts are routinely screened by our production department for any indication of image manipulation. If evidence of inappropriate manipulation is detected, the journal's Editors might ask for the original data to be supplied and, if necessary, may revoke the acceptance of the article.

4.5. Figure permissions

It is the responsibility of the author to obtain permission to use figures from another publication in any article submitted to Journal of Cell Science and to ensure that any such use is credited to the source. Any fees associated with use of the figure are the responsibility of the author. Written permission from the author and/or publisher of the original material, as appropriate, should be provided at the time of submission, otherwise publication may be delayed. If a figure has been modified from a previously published figure, please check with the copyright owners to see whether permission is required and include a complete citation/reference for the original article.

5. Preparing movies

Our preferred **file format** for movies is **.mp4**, but we also accept .mov. Movies should be prepared at the smallest file-size that will convey the essential scientific information. We have a limit of 500 MB for all movie files. If your movies exceed this limit, please contact the Editorial Office for advice before submission.

Please include the titles and captions of all movies in your supplementary information PDF (see section on preparing supplementary information). Please keep captions as short as possible and ensure that they explain what is being shown in the movie and any necessary details of how the movie was made.

Movies should be numbered in a single series that reflects the order in which they are cited in the text, e.g. see Movie 1. Movie 2, etc. Please do not use alphabetical labelling, e.g. Movies 1A-C should be relabelled as Movies 1-3.

All movies will play in place in the full-text online version of the article and a link to each movie will be included in the supplementary information PDF.

When preparing your movies, please note the recommendations below :

- Use a resolution of no greater than 1280x720 (720p), as most readers will view on a desktop or mobile device
- Use a well-characterized video compression codec such as H.264 and use multi-pass encoding if available
- Do not exceed a bitrate of 2500mbps for 720p H.264-encoded video
- Keep duration to the minimum required to illustrate your point
- Do not include an audio track unless it is essential
- If including audio, use a well-characterized audio compression codec such as AAC
- Do not exceed a bitrate of 128kbps, sample rate of 44.1kHz, or channel count of 2 for encoded audio

Please note that we reserve the right to make movies or other data forms available on an Open Access basis via The Company of Biologists' website, You Tube and other online channels. Where we do, the movies and other data forms may on occasion be made available under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY) Licence (the terms of which are set out at

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>). These terms permit the copying and/or adaptation of the movie and the distribution of the movie or any such adaptation by any means and in any medium or format to any other person, including for commercial purposes, provided that you are credited as the original author. There would be no additional cost to you, the author.

6. Supplementary information

Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. Supplementary information provides access to supporting data that do not appear in the printed article or PDF but that accompany the final version of a paper online.

These data are peer reviewed and subject to the same criteria as the data that are to be published in the paper itself. During peer review, editors and reviewers are asked to assess whether supplementary information is appropriate and essential for supporting the findings of a paper.

The number of supplemental figures must be equal to or less than the total number of main-text figures, but there is no limit on the number of supplementary tables or movies. **All supplementary data will be strictly limited to a total of 50 MB per article (excluding movie files and cover art submissions).**

We only accept data files - such as datasets, movies, audio, figures and tables - as supplementary information. We do not accept text files that provide additional materials and methods, results or discussions related to the article; these should be included in the article itself. Very large files or those requiring specialist software are not suitable as supplementary information. For large datasets, e.g. imaging data, please see our guidelines on data deposition.

With the exception of movies (see section on preparing movies) and large tables, **all supplementary information , including movie titles and captions, should be collated into a single PDF file.** If your table is very large, or you wish readers to be able to export and/or manipulate the data, we would prefer you to submit it as a Microsoft Excel file.

Use a separate numbering system from that used in the main article and use the format Fig. S1, Fig. S2, Table S1 etc. If a supplementary figure relates to a particular figure in the text, please cite it as close to this figure as possible. For the convenience of readers, please place each figure next to the corresponding legend in the supplementary information PDF. Please include a legend for each figure and a title for each table.

Please note that supplementary data files are not copyedited by Journal of Cell Science and therefore authors must ensure that all files are checked carefully before submission and that the style of terms and figures conforms to that of the article. Modification of supplementary information after publication will require a formal correction.

Refer to each piece of supplementary information at least once within the text of the main article (the article that is published in the print issue of the journal).