



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA**

**SÍNTESE DE SONDA DE RNA-FISH PARA DETECÇÃO DO**

**COMPONENTE RNA DA ENZIMA TELOMERASE EM**

**CAMUNDONGOS**

**Orientadora:** Prof. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

**Banca:** Dr. Guido Lenz e Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen

**Periódico de referência:** Nature Communications

Porto Alegre, Junho de 2015

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a minha família, que me incentivou, apoiou e possibilitou minha trajetória estudantil. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

A minha orientadora, Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna, por ter aceitado acompanhar-me neste projeto. Agradeço a atenção, o tempo e o conhecimento disponibilizados.

À professora Dra. Lavínia Schüller-Faccini por todo seu apoio e confiança em mim depositados. Obrigada por permitir a realização deste projeto.

Agradeço à Dra. María Blasco por abrir as portas do seu laboratório e permitir minha participação no desenvolvimento de um dos seus projetos.

À Dra. Isabel López de Silanes por acompanhar-me durante a pesquisa, por seu auxílio, por seus ensinamentos e total dedicação.

Aos meus amigos pelos momentos de apoio e alegria que foram fundamentais nesta caminhada.

Aos grupos dos laboratórios de Telómeros y Telomerasa e Supresión Tumoral e à equipe de microscopia do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas que me auxiliaram e acolheram.

Aos meus colegas do laboratório 113 do departamento de genética da UFRGS pelo apoio, compartilhamento de conhecimento e pela amizade.

Agradeço aos membros da banca que aceitaram avaliar este trabalho e contribuir com seu conhecimento.

À UFRGS que permite que o conhecimento seja passado através das gerações de estudantes e profissionais.

Aos órgãos de fomento que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial ao CNPq, ao INaGeMP, e ao programa Ciência sem Fronteiras.

Finalmente, obrigada a todos que me acompanharam e de alguma forma me apoiaram ao longo destes anos.

## Índice

Título .....	5
Resumo .....	5
Introdução .....	6
Resultados .....	8
Discussão .....	11
Métodos .....	15
Referências .....	19
Figuras .....	23

# **Síntese de sonda de RNA-FISH para detecção do componente RNA da enzima telomerase em camundongos**

Ana Carolina Moisés da Silva<sup>1</sup>, Isabel López de Silanes<sup>2</sup>, Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,3</sup>  
& María A. Blasco<sup>2,\*</sup>

Telômeros são estruturas especializadas encontradas nas extremidades dos cromossomos compostas por sequências de repetições de nucleotídeos que desempenham função de proteção do DNA, e ao longo das divisões celulares sofrem encurtamento. A enzima telomerase combate esta erosão sintetizando repetições teloméricas e adicionando-as aos telômeros. Um dos elementos que constituem esta enzima é o componente RNA da telomerase (TERC), e através de sua marcação a telomerase pode ser detectada. Neste artigo, desenvolvemos uma sonda de hibridização *in situ* fluorescente para a marcação de TERC (RNA-FISH) como uma alternativa para detecção da telomerase. Esta ferramenta pode ser utilizada em futuros trabalhos, permitindo uma observação rápida, eficiente e de menor custo, otimizando tempo e facilitando avanços nesta área.

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Médica e Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves. 9500, 91509-900 Porto Alegre, Brasil. <sup>2</sup>Grupo de Telômeros e Telomerase, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, C/ Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Espanha. <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves. 9500, 91509-900 Porto Alegre, Brasil. \*Correspondência e pedidos de materiais devem ser enviados à M.A.B. (e-mail: [mblasco@cniio.es](mailto:mblasco@cniio.es)).

Telômeros são estruturas de heterocromatina localizadas nas extremidades dos cromossomos que conferem estabilidade ao genoma, estando presentes em organismos eucariotos.<sup>1-3</sup> Em vertebrados, os telômeros são compostos por repetições em “tandem” de sequência TTAGGG<sup>4</sup>. A ligação a um complexo multiproteico, conhecido como “shelterin”, e a existência de uma conformação específica, possibilitam que o telômero desempenhe uma função de proteção das extremidades cromossômicas. “Shelterin” é um complexo de seis proteínas que reconhecem e se ligam à sequência telomérica em vertebrados. A presença destas proteínas faz com que os mecanismos de reparo não reconheçam o final dos cromossomos como uma quebra de DNA e não atuem nesta região<sup>1,5,6</sup>. O processo de replicação do DNA, que ocorre durante a divisão celular, contribui para o encurtamento telomérico. Os “primers” de RNA utilizados pela DNA polimerase para síntese da nova fita são removidos ao final do evento deixando uma lacuna em 5’, isso resulta em um DNA encurtado gradativamente ao longo das várias replicações que a célula sofre<sup>3,7</sup>. Propõe-se que a diminuição dos telômeros, que ocorre durante as divisões celulares, esteja relacionada com o processo de envelhecimento e com o processo carcinogênico<sup>8-10</sup>.

A telomerase é uma ribonucleoproteína transcriptase reversa que combate o desgaste natural dos telômeros através da síntese e inserção de repetições teloméricas<sup>11,12</sup>. Sua atividade é detectada principalmente no início do desenvolvimento, enquanto que em células somáticas adultas quase não é detectada. No entanto, sua atividade é aumentada na maioria dos tumores humanos<sup>13,14</sup>. A telomerase é composta principalmente por duas subunidades, o componente proteico, telomerase transcriptase reversa (TERT), e o componente RNA, TERC<sup>15</sup>. TERT sintetiza repetições teloméricas ao final do cromossomo erodido, atuando como transcriptase reversa<sup>16</sup>. TERC é composto de uma sequência RNA 5’ – 3’ complementar às repetições teloméricas, que

serve como molde para que estas repetições sejam sintetizadas<sup>17</sup>. A porção 3' do telômero é reconhecida e hibridizada à sequência de RNA, dando início ao alongamento. Repetições teloméricas são adicionadas devido à atividade de TERT, que produz DNA a partir de RNA. Assim, o telômero é alongado permitindo que a célula tenha tempo para desenvolver suas funções<sup>11,17,18</sup>.

O estudo da telomerase passou a receber atenção devido à demonstração do envolvimento desta enzima em processos relevantes na manutenção da vida, como envelhecimento e câncer. Diversos trabalhos sobre telômeros e a telomerase desenvolvidos em camundongos levaram este modelo animal a ser utilizado para o estudo destes elementos em mamíferos<sup>19-22</sup>. Blasco e colaboradores, em 1997<sup>20</sup>, demonstraram a relevância da telomerase através da geração de camundongos deficientes para esta enzima, que possuem o gene de *Terc* nocauteado (*mTerc*<sup>-/-</sup>). Esses animais perderam a capacidade de proteção do DNA, levando ao envelhecimento precoce e assim demonstrando que a telomerase é essencial para a manutenção do comprimento telomérico. Outro estudo, realizado por Tomáz-Loba e colaboradores, em 2008<sup>21</sup>, revelou que camundongos com TERT super-expressa, e resistentes a tumores, apresentam maior atividade da telomerase, o que lhes confere maior longevidade e um melhor estado de “fitness”.

A detecção e visualização nuclear da telomerase podem ser realizadas através da marcação dos dois principais componentes da enzima, TERT e TERC<sup>23,24</sup>. A marcação de TERT em camundongos através de imunofluorescência não se mostrou possível devido à falta de eficiência dos anticorpos utilizados (M. Blasco, comunicação pessoal, 2015). Para a marcação da outra subunidade, TERC, coquetéis de sondas de RNA-FISH são utilizados<sup>25-27</sup>, pois permitem uma melhor especificidade. Tomlinson e colaboradores, em 2010<sup>25</sup>, utilizaram quatro sondas de marcação direta contra diferentes

regiões de TERC em camundongos (mTERC). Essas sondas têm tamanhos entre 46 e 58 nucleotídeos (nt), e apresentam um sinal maior quando hibridizadas aos pares (coquetel). O objetivo deste trabalho foi sintetizar uma sonda única de RNA-FISH com especificidade à TERC, de maior rapidez e facilidade de síntese e aplicação e menor custo, em camundongos.

## Resultados

O componente RNA da telomerase pode ser detectado através RNA-FISH<sup>25,26</sup>, técnica na qual se pode marcar um RNA de interesse através de uma sonda que consiste em nucleotídeos complementares à zona alvo marcados com uma substância fluorescente. Existem dois tipos de marcação: 1. direta; 2. indireta. No primeiro, os nucleotídeos complementares são marcados diretamente a um fluoróforo, no segundo estes nucleotídeos são conjugados a uma molécula sinalizadora que posteriormente se ligará a anticorpos contendo um fluoróforo<sup>28,29</sup>.

**1. Detecção de TERC por marcação direta.** A sonda de marcação direta de RNA-FISH para a detecção de TERC em camundongos foi sintetizada através da realização de uma transcrição *in vitro*. O molde para a transcrição se obteve da seguinte maneira: a partir de bactérias com o plasmídeo<sup>30</sup> pBluescript SK<sup>-</sup> com um inserto 1.9kb contendo o promotor endógeno de *Terc* e o gene *Terc*, se amplificou *Terc* por PCR com “primers” “forward” e “reverse” para *Terc*. A banda visualizada em gel de agarose correspondendo ao tamanho de *Terc*, 397 nt<sup>19,31</sup>, foi isolada e purificada para a retirada do material inespecífico. A banda de *Terc* purificada foi utilizada como molde para uma segunda PCR, onde foram utilizados um “primer” “forward” e um “reverse” que

continha uma sequência correspondente ao promotor T7, para que o produto gerado (*Terc*-T7) pudesse servir como molde para uma posterior transcrição *in vitro* (Fig. 1). Na transcrição *in vitro* uma porcentagem de citidina trifosfato (CTP) ligada ao fluoróforo cianina 3 (Cy3) foi adicionada, gerando uma sequência de nucleotídeos de RNA detectável por emissão de fluorescência na cor vermelha complementar à zona de interesse (TERC-Cy3) (Fig. 2). Provas anteriores (M. Blasco, comunicação pessoal, 2015) utilizaram o RNA total de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) para a obtenção de *Terc* em alternativa ao plasmídeo; entretanto, o emprego deste material para síntese da sonda não se mostrou eficiente.

*Otimização das condições de hibridização da sonda TERC-Cy3.* Para obter a melhor condição do fluoróforo, foram realizadas transcrições *in vitro* contendo diferentes porcentagens de CTP-Cy3 que complementam a quantidade de CTP. As porcentagens de 40%, 60%, 80% e 100% de CTP-Cy3 foram testadas. A escolha da concentração ótima foi realizada, primeiramente, por eletroforese, onde o sucesso da sonda foi constatado através do aparecimento de uma banda no tamanho de *Terc*. Com exceção da sonda de 100% de CTP-Cy3, todas as outras apresentaram banda (Fig. 3) e foram hibridizadas em MEF e em células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) selvagens (WT) para visualização, onde seus desempenhos foram avaliados, sendo eleita a que obteve melhor resultado. A concentração de CTP-Cy3 que apresentou pontos de tingimento nuclear e ausência de sinal citoplasmático foi a de 80% (Fig. 4).

A diluição da sonda e a temperatura de hibridização também foram testadas através de RNA-FISH em células selvagens. A visualização da nitidez dos pontos de TERC no núcleo e a ausência de fundo citoplasmático foram os critérios iniciais de análise. A hibridização da sonda foi testada em 40°C, 45°C e 50°C através da exposição

das células contendo a sonda a estas temperaturas “overnight”. A temperatura considerada ideal foi de 45°C (Fig. 4). Diluições de sonda de 1:20, 1:40, 1:50 e 1:80 foram testadas. A diluição da sonda melhor observada foi de 1:50 (Fig. 4).

*Comprovação da especificidade da sonda TERC-Cy3.* Nestes testes foram utilizadas células iPS e MEF, selvagens e nocaute para *Terc* (TERC-KO ou *mTerc*<sup>-/-</sup>). Como comprovação principal, a sonda foi hibridizada para a observação dos pontos de TERC em células WT e a ausência deles em TERC-KO. Em MEF os pontos não foram visualizados, mas em iPS foi possível detectar de 1 - 2 pontos por núcleo que marcavam TERC em células WT, ao contrário das TERC-KO, onde não foi possível detectar pontos (Fig. 4). Comprovou-se, adicionalmente, se TERC encontrava-se no telômero, como já descrito anteriormente em outros estudos<sup>25,27</sup>. Para isso, foi realizado um experimento unindo as técnicas de RNA-FISH e imunofluorescência (Fig. 4), demonstrando a existência de co-localização do fator de ligação a repetições teloméricas 1 (TRF1) com TERC (Fig. 4). O terceiro ensaio para verificar se a hibridização à TERC era específica, foi o tratamento de células WT com ribonuclease (RNase), anterior à hibridização da sonda. Um grupo de células (controle) não recebeu o tratamento e outro grupo sim. Nas células tratadas com RNase os pontos de TERC desapareceram (Fig. 5).

**2. Detecção de TERC por marcação indireta.** Na tentativa de obter um sinal amplificado<sup>28</sup>, uma sonda de marcação indireta foi sintetizada a partir de transcrição *in vitro* utilizando digoxigenina (DIG). Após a transcrição, a sonda foi purificada e teve sua especificidade comprovada através de eletroforese, onde foi observada uma banda correspondente ao tamanho de *Terc* (dado não mostrado). A sonda foi hibridizada em

células iPS WT e TERC-KO através da técnica de RNA-FISH, em uma diluição 1:50. O anticorpo anti-DIG foi testado nas diluições de 1:200 e 1:1000. A visualização de um citoplasma mais limpo levou à escolha da segunda diluição. Um bloqueio das células com albumina sérica bovina (BSA) em 4 × sódio salino citrato (SSC) foi adicionado visando o melhor desempenho do método. O BSA inicialmente estava a 1%, mas notou-se uma melhora na sua função quando concentrado a 5%. Sinais desta sonda foram captados em células WT e também em TERC-KO (dado não mostrado), descartando, portanto, seu uso até a obtenção de melhores condições.

## **Discussão**

Neste trabalho experimentos de síntese, aperfeiçoamento e comprovação permitiram a obtenção de uma única sonda de marcação direta de RNA-FISH para detecção de TERC em camundongos. Após o ajuste da concentração de CTP-Cy3 para 80% na transcrição *in vitro*, uma temperatura de hibridização de 45°C e a concentração da sonda de 1:50, a sonda foi testada, através de ensaios de RNA-FISH, onde foi possível observar com sucesso pontos de TERC em células WT e a ausência em TERC-KO. Finalmente, a co-localização do sinal de TERC com TRF1 e ausência de TERC quando as células foram submetidas à RNase consolidaram o resultado de hibridização específica.

A atividade da telomerase pode ser detectada principalmente durante a fase embrionária e em compartimentos de células-tronco de vários tecidos adultos, estando ausente na maioria dos tecidos somáticos adultos tanto de camundongos quanto de humanos<sup>15,20,22,32</sup>. Sabendo-se que MEF são células embrionárias e iPS comportam-se

como células-tronco embrionárias, estes tipos celulares foram escolhidos para a realização deste trabalho em função do funcionamento da telomerase.

A otimização de três pontos foi fundamental para que fosse possível a confecção desta sonda. Primeiro, a identificação da quantidade ideal do nucleotídeo CTP marcado com o fluoróforo Cy3 permite a visualização de um bom sinal fluorescente. Segundo, a diluição da sonda a uma concentração ótima possibilita que a visualização seja limpa. Por último, a temperatura correta para a hibridização permite que a sonda se ligue de maneira específica ao alvo e que este seja marcado corretamente. A identificação de 1-2 pequenos pontos nucleares arredondados e definidos, posterior ao aprimoramento da sonda, corrobora estudos anteriores<sup>25</sup> e demonstra ser este um bom marcador de eficiência da síntese da mesma.

Após testes de RNA-FISH, foi constatado que em MEF os pontos esperados de TERC não eram visíveis em células WT. Martín-Rivera e colaboradores, em 2008<sup>23</sup>, relatam a não detecção de TERT no núcleo de MEF através de imunofluorescência, fato atribuído a um possível baixo nível do componente no núcleo deste tipo celular. Sendo assim, a detecção da telomerase por marcação de TERC poderia estar prejudicada, já que se TERT está pouco presente, a telomerase potencialmente também estaria. O fato de o RNA total não ser viável como molde para a síntese da sonda também pode estar relacionado a este fato. O RNA foi extraído a partir de MEF, portanto, se este tipo celular tem baixos níveis de atividade da telomerase, a PCR terá menos moléculas disponíveis para a amplificação e o sinal não poderá ser detectado. Já no plasmídeo há uma maior disponibilidade de TERC, existindo um número mais elevado de moléculas para que a PCR amplifique, tornando o sinal visível.

Células *mTerc*<sup>-/-</sup> derivam de camundongos nos quais *Terc* está nocauteado, e portanto, a expressão de TERC não ocorre, enquanto células WT expressam TERC de

maneira normal<sup>20</sup>. Considerando que a sonda foi desenvolvida para marcar o componente RNA da telomerase, estando ele ausente, o alvo não é encontrado e o sinal não é emitido. Portanto, a ausência de pontos de TERC em células TERC-KO e a presença em WT corrobora estudos prévios<sup>20</sup> e confirma a especificidade da sonda de TERC.

Ensaio de co-localização permitem a confirmação da presença de um elemento de interesse em determinada localização, através da marcação de outra molécula que se sabe estar presente no local<sup>27</sup>. TRF1 é uma das proteínas que compõem o complexo “shelterin” e está envolvida na proteção telomérica<sup>5,33</sup>. Tendo conhecimento de que TRF1 está ligada ao telômero e que a telomerase realiza o alongamento telomérico, a observação da co-localização dos pontos de TERC com os da proteína em células WT confirma que o sinal detectado é de TERC. A não detecção da interação dos pontos em células TERC-KO dá-se pelo fato de que, na ausência de TERC, não há atividade da telomerase, portanto, TRF1 não pode ser observado em co-localização com a enzima<sup>11,20</sup>.

Sabe-se que cada molécula de DIG, que está conjugada a uma sequência de nucleotídeos, pode ligar-se a vários anticorpos anti-DIG ao mesmo tempo, que por sua vez ligam-se a outros anticorpos que possuem um fluoróforo. Este mecanismo de marcação faz com que o sinal fluorescente seja aumentado<sup>28</sup>. Portanto, ao marcar TERC com DIG, o sinal emitido pode ser amplificado. Ao hibridizar esta sonda à TERC, foram detectados pontos fluorescentes também nas células TERC-KO. Uma possível causa da não especificidade de TERC-DIG poderia ser explicada pela diluição inadequada da sonda, sendo necessários ajustes na diluição que serão realizados.

A RNase digere os RNAs das células, que por isso não podem ser detectados. Sendo TERC o componente RNA da telomerase, a não detecção de sinal no grupo de

células em que houve o tratamento com a nuclease, demonstra que a sonda é específica de RNA. Este tipo de ensaio é habitual para comprovar a especificidade de sondas<sup>25,34</sup>.

Existem vantagens em sintetizar e aprimorar uma única sonda ao invés de um coquetel de sondas. Considerando que os gastos da obtenção de um coquetel são proporcionais à quantidade de sondas que serão utilizadas na marcação, a obtenção de uma única sonda reduz os custos dos ensaios realizados. Sintetizar sondas em alternativa à compra também contribui para a diminuição de gastos. O tempo dispensado no processo de síntese e de otimização de coquetéis também é um fator que é reduzido quando se obtém somente uma sonda, já que a quantidade de experimentos é restringida. Assim, o uso de uma única sonda torna-se mais vantajoso e menos propenso a erros de manuseio laboratorial.

A sonda descrita neste trabalho demonstrou ser específica para a detecção da telomerase em camundongos. No entanto, alguns ajustes na técnica devem ser realizados para otimização e amplo uso. A obtenção do funcionamento da sonda em MEF deve ser ainda melhor desenvolvida, já que se sabe que a detecção de TERC neste tipo celular é possível através de coquetéis de sondas<sup>25</sup>. Outro ponto que deve ser aprimorado é sincronização das células na fase S do ciclo celular, momento no qual ocorre alongamento do telômero pela telomerase, assim facilitando a detecção desta enzima devido à sua maior disponibilidade<sup>35</sup>. Finalmente, deve-se otimizar a detecção indireta com sonda de DIG, podendo este método ser utilizado, inclusive, para a visualização de TERC em MEF.

Aqui, demonstramos ser possível a síntese de uma única sonda para a marcação direta da telomerase através da técnica de RNA-FISH, o que contribuirá para diminuir os erros laboratoriais e acelerar pesquisas que utilizam marcação de telomerase, tais como ensaios de tumorigênese, desenvolvimento e envelhecimento.

## Métodos

**Células.** As células MEF e iPS utilizadas nos ensaios derivam da linhagem BL6 de camundongos. O modelo nocaute para TERC pode ser encontrado em Blasco e colaboradores, 1997<sup>20</sup>, e as células iPS WT e KO são descritas em Marion e colaboradores, 2009<sup>22</sup>.

### Transcrição *in vitro*.

*Produção do molde para transcrição in vitro:* As bactérias que continham o plasmídeo<sup>30</sup> foram crescidas a 37°C “overnight” sob agitação na presença de 5 ml de meio LB (Luria Bertani) e 5 µl de ampicilina (utilização de protocolo “standard”). O DNA plasmidial foi purificado através do uso do QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge (QIAGEN), conforme instruções do fabricante, servindo como molde para PCR. Para a purificação da banda correspondente à *Terc* visualizada em gel de agarose 1%, foi utilizado o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Outra PCR com um “primer” “forward” e o “reverse” contendo uma sequência correspondente ao promotor T7 utilizou a banda purificada como molde, gerando um produto *Terc-T7*.

*Transcrição in vitro:* Para desenvolver a sonda complementar à TERC, foi realizada uma transcrição *in vitro* com o produto de PCR *Terc-T7*, onde parte do CTP estava marcado com o fluoróforo Cy3 (Nen Life Biosciences). Para este procedimento foi utilizado o kit MAXIscript® T7 *In Vitro* Transcription (Ambion®), conforme instruções do fabricante. Para a remoção de sais e nucleotídeos não incorporados, realizou-se uma purificação do produto através de colunas NucAway™ Spin Columns (Ambion®),

segundo indicações do fabricante. Eletroforese em gel de RNA de agarose 1% foi realizada com o produto da transcrição para a comprovação de seu funcionamento.

A zona de desenho da sonda e os “primers” utilizados na amplificação do fragmento de interesse não foram inseridos neste trabalho por motivos de confidencialidade.

### **RNA-FISH e Imunofluorescência.**

*Sonda TERC-Cy3:* Para a realização do RNA-FISH ou RNA-FISH seguido de imunofluorescência as células foram preparadas e fixadas. As células cresceram em lâminas de vidro Superfrost™ Plus (Thermo Scientific), foram enxaguadas duas vezes em tampão fosfato-salino 1 × (PBS), colocadas por 30 segundos em “cytobuffer” (100 mM NaCl/300 mM sucrose/3 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM Pipes, pH 6.8), nos próximos 30 segundos as células foram postas em “cytobuffer” contendo 0.5% de Triton X-100, novamente deixadas 30 segundos em “cytobuffer”, e permaneceram 10 minutos em paraformaldeído 4% (PFA; Electron Microscopy Sciences) em PBS. Aos dois “cytobuffers” foram adicionados 500 µl de inibidores de protease (para 50 ml de tampão) e 10 µl de inibidores de RNase (para 10 ml de tampão) (Roche). As células foram lavadas duas vezes em PBS, desidratadas sendo lavadas três vezes em álcool 70%, por 3 minutos em álcool 80, 95 e 100%, e brevemente secas ao ar. Um círculo hidrofóbico desenhado na lâmina (Pap Pen; Dako) delimitou a área de aplicação da sonda. A sonda foi diluída 1:50 em tampão de hibridização (50% formamida (SIGMA); 10% dextrano sulfato (SIGMA) em 2 × SSC) e desnaturada (65°C/5 min, gelo/5 min). Foram aplicados 4 µl da sonda diluída juntamente com 4 µl de tampão de hibridização. A hibridização da sonda de RNA nas células foi realizada a 45°C “overnight”. Após a

hibridização, as lâminas foram lavadas duas vezes por 15 minutos em  $2 \times \text{SSC}/50\%$  formamida a  $48^\circ\text{C}$ , 10 minutos em  $2 \times \text{SSC}$  a  $48^\circ\text{C}$ , 10 minutos em  $1 \times \text{SSC}$  a  $48^\circ\text{C}$ , 5 minutos, em  $4 \times \text{SSC}$  à temperatura ambiente, 5 minutos  $4 \times \text{SSC}$  contendo 0.1% Tween- 20 (SIGMA) à temperatura ambiente e 5 minutos em  $4 \times \text{SSC}$  à temperatura ambiente. Após os lavados 12  $\mu\text{l}$  de ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (LIFE Technologies) foram aplicados sobre a região da sonda.

Para a realização da imunofluorescência, após o último lavado do RNA-FISH e antes do ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI, as células foram fixadas por 10 minutos em PFA 4% em PBS, enxaguadas duas vezes em PBS, lavadas suavemente por 20 minutos em Triton X-100 0.1% a  $4^\circ\text{C}$ , enxaguadas duas vezes com PBS e finalmente bloqueadas em BSA 5% em PBS por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . O anticorpo primário foi incubado por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . As lâminas foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS/Tween-20 0.1%. Então, o anticorpo secundário foi aplicado e também incubado por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . As lâminas foram novamente lavadas três vezes por 10 minutos em PBS/Tween-20 0.1%. Foram aplicados 12  $\mu\text{l}$  de ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI. O material foi visualizado através de microscopia confocal LCS-SP5-X (Leica). Os anticorpos utilizados foram: anti-TRF1 “Rabbit” (desenvolvido no CNIO, 1:500), “Goat anti-Rabbit” Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes; 1:500), anti-TRF1 “Rat” (desenvolvido no CNIO, 1:200) e “Chicken anti-Rat” Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes; 1:500). Estes anticorpos foram diluídos em BSA 5% em PBS (modificado de Lopéz de Silanes, I. *et al.*, 2014<sup>34</sup>).

*Sonda TERC-DIG*: Se utilizou como “mix” de nucleotídeos trifosfato (NTPs) para a transcrição *in vitro* DIG RNA Labeling Mix (Roche), conforme indicações do fabricante. A sonda foi purificada por colunas, diluída 1:50 em tampão de hibridização e

comprovada através de gel de RNA de agarose 1% (dado não mostrado). Foi aplicada em células iPS WT e TERC-KO através de RNA-FISH. Após o último passo da fixação das células, 10 minutos em PFA 4%, seguiu-se o experimento com dois enxágues em PBS, 10 minutos com Triton X-100 0,1% em PBS, seguido de três enxágues de PBS e três com etanol 70%. A partir deste ponto, o protocolo de RNA-FISH segue como o descrito acima. Posteriormente aos lavados, as lâminas foram enxaguadas uma vez em PBS e um passo extra, de BSA 5% em  $4 \times$  SSC por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  foi adicionado ao protocolo original<sup>36</sup>. O anticorpo anti-DIG (Santa Cruz; 1:1000) foi diluído em BSA 5% e incubado por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguido dos lavados 10 minutos  $4 \times$  SSC, 10 minutos  $4 \times$  SSC/Triton X-100 0,1% e 10 minutos  $4 \times$  SSC. O anticorpo secundário, “anti-Mouse-Cy3” (Molecular Probes; 1:500), também foi incubado por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , e os lavados como descritos acima foram repetidos. Ao final do procedimento, 12  $\mu\text{l}$  de ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (LIFE Technologies) foram aplicados. A visualização do material foi realizada através de microscopia confocal LCS-SP5-X (Leica).

**Tratamento com RNase.** Na realização do teste RNA-FISH com tratamento de RNase (Roche), o protocolo do fabricante foi seguido.

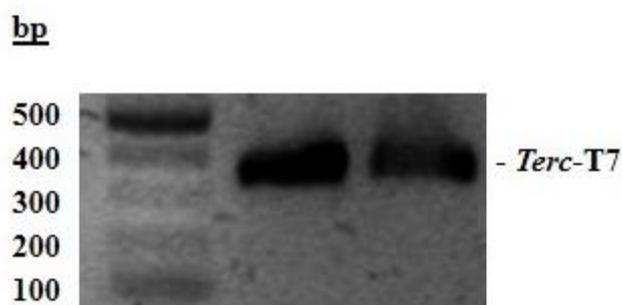
## Referências

1. De Lange, T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* **5**, 323-329 (2004).
2. Schoeftner, S. & Blasco, M. A. A. 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J.* **28**, 2323-2336 (2009).
3. Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573 (1991).
4. Moyzis, R. K. *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 6622-6626 (1988).
5. De Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110 (2005).
6. Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514 (1999).
7. Cavalier-Smith, T. Palindromic base sequences and replication of eukaryote chromosome ends. *Nature* **250**, 467-470 (1974).
8. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
9. d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
10. Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W. & DePinho, R. A. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat. Genet.* **28**, 155-159 (2001).
11. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413 (1985).

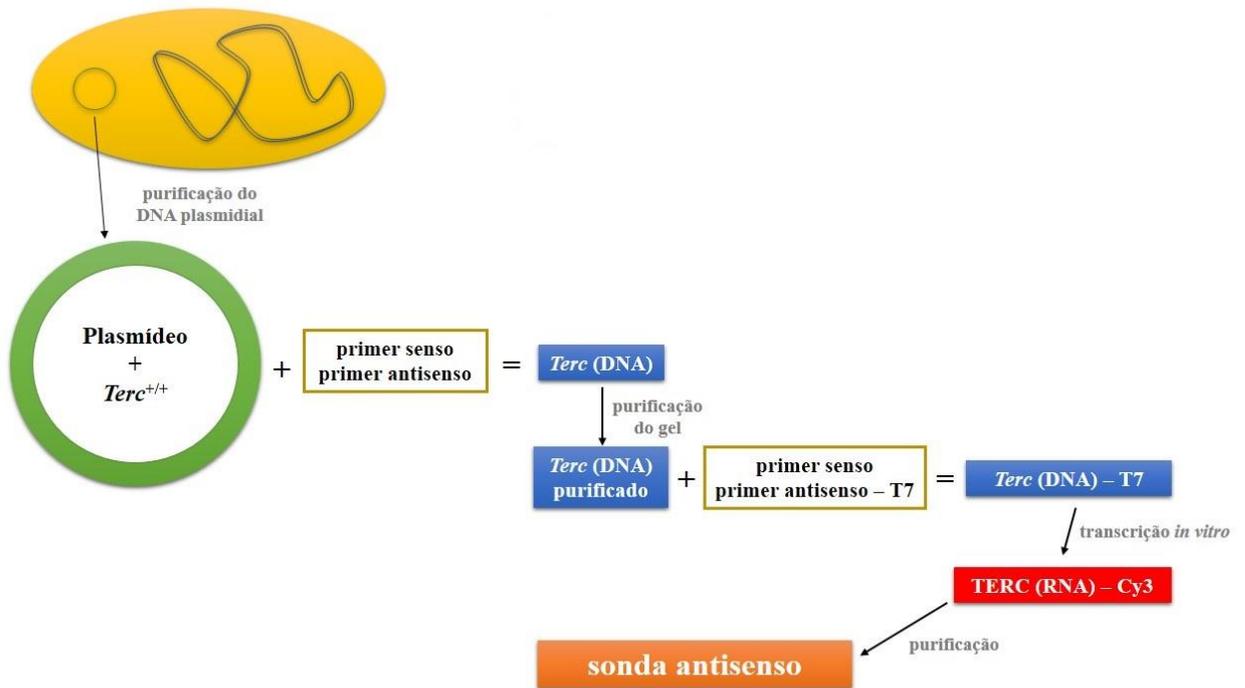
12. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521-529 (1989).
13. Greenberg, R. A., Allshop, R. C., Chin, L., Morin, G. B. & DePinho, R. A. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-1730 (1998).
14. Kim, K. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015 (1994).
15. Collins, K. & Mitchell, J. R. Telomerase in the human organism. *Oncogene* **21**, 564-579 (2002).
16. Cohen, S. B. *et al.* Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**, 1850-1853 (2007).
17. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337 (1989).
18. Lingner, J. *et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567 (1997).
19. Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B. & Greider, C. W. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* **269**, 1267-1270 (1995).
20. Blasco, M. A. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34 (1997).
21. Tomáz-Loba, A. *et al.* Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* **135**, 609-622 (2008).
22. Marion, R. M. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cell. *Cell Stem Cell* **4**, 141-154 (2009).

23. Martín-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J. P. & Blasco, M. A. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc. Nat. Acad.* **95**, 10471-10476 (1998).
24. Zhong, F. L. *et al.* TPP1 OB-Fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* **150**, 481-494 (2012).
25. Tomlinson, R. L., Li, J., Culp, B. R., Terns R. M. & Terns M. P. A Cajal body-independent pathway for telomerase trafficking in mice. *Exp. Cell. Res.* **316**, 2797-2809 (2010).
26. Ueda, Y. *et al.* A mutation in the H/ACA box of telomerase RNA component gene (*TERC*) in a young patient with myelodysplastic syndrome. *BMC Med. Genet.* **15**, 68-75 (2014).
27. Venteicher, A. S. *et al.* A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* **323**, 644-648 (2009).
28. Moter, A. & Göbel, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **41**, 85-112 (2000).
29. Neves, S. M. N. & Guedes, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arq. Inst. Biol.* **79**, 627-632 (2012).
30. Martín-Rivera, L. & Blasco, M. A. Identification of functional domains and dominant negative mutations in vertebrate telomerase RNA using *in vivo* reconstitution system. *J. Biol. Chem.* **276**, 5856- 5865 (2000).
31. Chen, J. L., Blasco, M. A. & Greider C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**, 503-515 (2000).

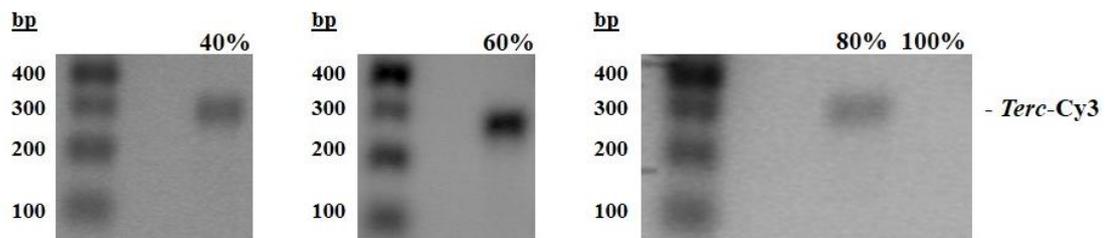
32. Wright, W. E., Piatyszek M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. & Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* **18**, 173-179 (1996).
33. Martínez, P. *et al.* Increased telomere fragility and fusions resulting from *TRF1* deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev.* **23**, 2060-2075 (2009).
34. López de Silanes, I. *et al.* Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. *Nat. Commun.* **5**, 4723- 4735 (2014).
35. Stern, J. L., Zyner, K. G., Pickett, H. A., Cohen, S. B. & Bryan, T. M. Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies Independently. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2384-2395 (2012).
36. Silver, D. P. *et al.* Further evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome. *Cell* **128**, 991-1002 (2007).



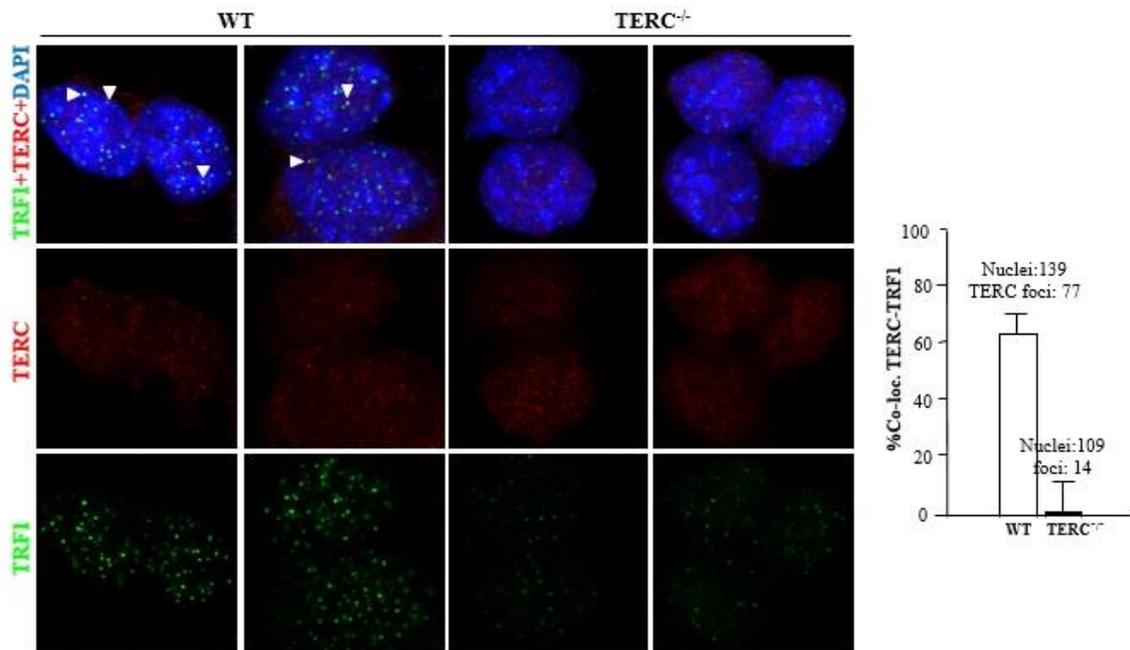
**Figura 1 | Síntese do molde *Terc* – T7 para transcrição *in vitro*.** Obtenção de *Terc* purificada com promotor T7 através de PCR com um “primer” “forward” e um “reverse” contendo sequência correspondente ao promotor T7. O produto desta PCR foi utilizado como molde para posterior transcrição *in vitro*. A figura mostra dois clones diferentes do plasmídeo com o mesmo inserto de *Terc*.



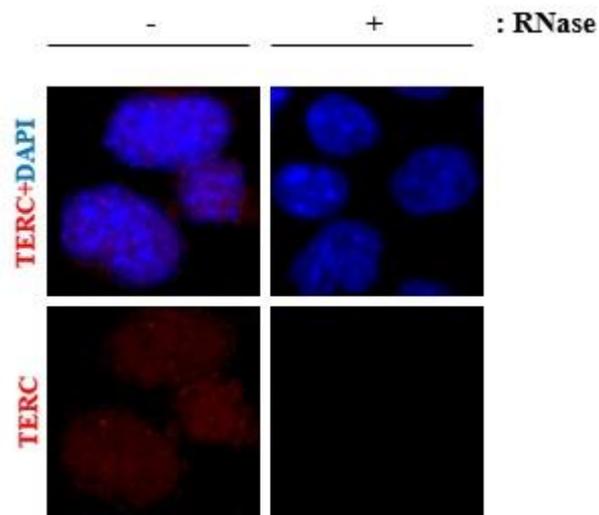
**Figura 2 | Síntese da sonda TERC-Cy3.** A partir do DNA plasmidial purificado, que antes estava contido em bactérias, se amplificou *Terc* por PCR e purificou a partir de gel de agarose. *Terc* purificado foi utilizado como molde para PCR contendo um “primer” “forward” e um “reverse” com uma sequência correspondente ao promotor T7. Foi realizada transcrição *in vitro* com *Terc*-T7 como molde, na presença de CTP marcado com Cy3, permitindo a visualização fluorescente da sonda.



**Figura 3 | Síntese da sonda de TERC-Cy3.** Após a transcrição *in vitro* das sondas, as mesmas foram comprovadas através de eletroforese. As figuras mostram as diferentes porcentagens de CTP-Cy3. Somente a concentração de 100% não apresentou banda.



**Figura 4 | Especificidade da sonda TERC-Cy3 e sua co-localização com o telômero.** RNA-FISH seguido de imunofluorescência para detectar pontos de TERC (vermelho) e a proteína marcadora do telômero TRF1 (verde). (*esquerda*) Células iPS WT e (*direita*) células iPS TERC-KO. As pontas de setas indicam eventos de co-localização. (*Gráfico*) As porcentagens de co-localização por núcleo de TERC com TRF1 em células iPS WT (*esquerda*) e TERC-KO (*direita*) estão representadas.



**Figura 5 | A sonda de TERC-Cy3 é específica para a detecção de RNA.** Imagens de microscopia confocal da preparação de RNA-FISH usando a sonda TERC-Cy3 em células iPS WT na ausência ou presença de RNase.