



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO DE DANOS AO DNA E CONTROLE
DO CICLO CELULAR**

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

RIO DE JANEIRO
2020



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO DE DANOS AO DNA E CONTROLE
DO CICLO CELULAR**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Oncologia

Orientador: Dr. Marcelo Alex de Carvalho

RIO DE JANEIRO
2020

N441a Nepomuceno, Thales da Costa

Avaliação do papel de CDK9 no reparo de danos ao DNA e controle do ciclo celular. / Thales da Costa Nepomuceno – Rio de Janeiro, 2020.
130.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia,
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

1. BRCA1. 2. Quinase 9 Dependente de Ciclina. 3. Reparo do DNA. 4. Dano ao DNA.
5. Ciclo Celular. I. Carvalho, Marcelo Alex de (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

Catlogação na fonte

Kátia Simões CRB7/5952



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO DE DANOS AO DNA E
CONTROLE DO CICLO CELULAR**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr. João Paulo de Biaso Viola – INCA - Presidente
Dr. Leonardo Augusto Karam Teixeira – INCA – Titular
Dr. Robson de Queiroz Monteiro IBqM/UFRJ - Titular
Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira IBCCF/UFRJ – Titular
Dra. Gabriela Nestal de Moraes – INCA – Suplente I
Dr. Rafael Dias Mesquita – IQ/UFRJ - Suplente II

RIO DE JANEIRO
2020

**“Você sabe que encontrou a felicidade quando vive
um momento que não quer que acabe”**

Clóvis de Barros Filho

Agradecimentos

Essa tese de doutorado é o produto de 4 anos de trabalho de bancada, mas que na verdade reflete 10 anos de formação dentro do grupo de pesquisa que vai muito além do seu papel profissional.

De 2009 a 2020, muitas pessoas contribuíram para a minha formação científica e crescimento pessoal. Esses agradecimentos são a tentativa de externalizar a gratidão que tenho por todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho. E por tudo que aprendi com cada um que convivi nesse período

Minha família me ensinou a ser quem eu sou, me transmitiu os valores que considero mais caros. Meus pais me ensinaram a me doar completamente às causas que acredito. Não seria nada sem vocês.

Na convivência com minha esposa, aprendi a dividir alegrias e dificuldades. Na distância, entendi o valor do agora. Sou muito grato a você, por tudo. Não teria chegado aqui sem Babi.

Com o Marcelo, aprendi muito mais que o pensar científico. Nossa convivência forjou minha postura profissional. Sou muito grato por toda a dedicação com que sempre conduziu nossa relação. E por sempre acreditar e confiar em mim. Tenho certeza que ainda vou te agradecer muito.

Tive muita sorte de poder conviver por 9 meses com Alvaro, o pesquisador que durante grande parte da minha formação, admirei de longe. De perto, a admiração se confunde com gratidão por todo o aprendizado durante esse período. Também sou muito grato à Simone por todo o suporte.

Tive muito privilégio de poder conviver com o Professor Guilherme Kurtz durante esses 10 anos. Sou muito grato pelos momentos de interação e aprendizagem.

Ao nosso grupo, que se confunde com família, só tenho a agradecer. Durante esses anos, Vanessa foi promovida de amiga a comadre. Thiago e Anna chegaram como alunos e hoje são referência. Giu, que acompanha tudo de longe, segue fazendo muita falta. Assim como Renato, João e Renata. Tenho muito orgulho do que construímos juntos nesses anos. Sou muito grato por tudo. Muito obrigado.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO DE DANOS AO DNA E CONTROLE DO CICLO CELULAR

RESUMO

A via de resposta a danos ao DNA (RDD) é composta por uma cascata coordenada de sinalizações capaz de perceber e reparar diferentes tipos de lesões no DNA. As quebras de duplas fita do DNA ativam o eixo da RDD modulado por ATM-CHK2, que é responsável pela parada do ciclo celular, possibilitando o reparo da molécula. Esse tipo de dano é resolvido majoritariamente por dois mecanismos distintos: o reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination* - HR) e o reparo não homólogo por junção de pontas (*Non-homologous End-joining* - NHEJ). As proteínas BRCA1 e 53BP1 desempenham um papel importante na RDD através do direcionamento do reparo por HR ou NHEJ, porém o mecanismo exato que modula ambas as respostas não está completamente elucidado. Anteriormente, nosso grupo identificou a cinase dependente de ciclina 9 (CDK9) como uma possível parceira de interação de BRCA1 e BARD1 (*BRCA1-associated RING domain 1*). CDK9 é um componente do complexo de alongamento da transcrição e sua atividade está relacionada à manutenção da integridade genômica na resposta ao estresse replicativo e no reparo por HR através do recrutamento de BRCA1 aos sítios de quebra de dupla fita. Nesse trabalho demonstramos que a formação de focos de RAD51 mediante radiação ionizante não ocorre na ausência de CDK9, porém o mesmo não é observado para 53BP1. As células deficientes para CDK9 apresentam uma maior sensibilidade à inibição de PARP. Nossos resultados sugerem que a interação entre CDK9 e BRCA1 (através da porção N-terminal de BRCA1) é dependente da formação do heterodímero BRCA1/BARD1. E que o mutante E369A de CDK9, incapaz de interagir com a região C-terminal de BRCA1, não interfere no papel de CDK9 na transcrição: preservando a capacidade de fosforilação da cauda CTD da RNA polimerase II, bem como não alterando o perfil de ativação mediante fosforilação de sua alça T. Entretanto, o mutante E369A não é capaz de reestabelecer o recrutamento de BRCA1 para os sítios de danos ao DNA. Além disso, caracterizamos CHK2 como nova parceira de interação com CDK9 através de ensaios de interação proteína-proteína valendo-se de proteínas produzidas de forma ectópica e constitutiva. As células silenciadas para *CDK9* apresentarem um perfil de progressão ao longo do ciclo celular alterado mediante danos ao DNA. Entretanto, tanto a sensibilidade ao

tratamento com radiação ionizante e inibidores de PARP se mostraram fenótipos independentes de CHK2. Observamos também que os níveis de PLK1 são regulados negativamente em células interferidas para *CDK9*, mas não em células deficientes para CHK2, e a atividade de transativação transcricional de CDK9 parece ser menor em células deficientes para CHK2. Adicionalmente, novos parceiros de interação de CDK9 foram identificados no contexto de danos ao DNA através de rotinas de TAP-MS. Coletivamente, nossos dados estabelecem um papel para CDK9 na RDD através do reparo por HR e pelo controle do ciclo celular, bem como sugerem uma putativa função, não relacionada ao reparo, para a interação com CHK2.

Palavras-chave: BRCA1, CDK9, CHK2, Reparo a danos no DNA, Ciclo celular.

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO DE DANOS AO DNA E CONTROLE DO CICLO CELULAR

ABSTRACT

The DNA damage response (DDR) is a well-coordinated pathway capable of sensing and repairing different types of DNA damage. Double-strand break (DSB) lesions activate the ATM-CHK2 axis, which is responsible for the cell cycle arrest, prompting cells for DNA repair. DSBs are primarily repaired through two distinct pathways: homology-directed recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ). BRCA1 and 53BP1 play an important role in DDR by orchestrating the decision between HR and NHEJ, but the precise mechanisms regarding both pathways are not entirely understood. Previously, our group identified the putative interaction of the cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) with BRCA1 and BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1). CDK9 is a component of the positive transcription elongation complex and has been implicated in genome integrity maintenance in replication stress response and HR repair by modulating the BRCA1 recruitment to DSB sites. Here we show that cells lacking CDK9 failure to form RAD51, but not 53BP1, ionizing radiation-induced foci (IRIF) and exhibit an increased sensitivity to PARP inhibition. Our results indicated that CDK9/BRCA1 interaction occurs through BRCA1 N-terminal region in a BRCA1/BARD1 heterodimer formation-dependent manner. We also generated a CDK9 missense mutant (E369A) that abrogates the CDK9/BRCA1 interaction. Interestingly, E369A mutation does not impact CDK9 role in transcription: retaining the phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) activity and in its T-loop phosphorylation; but it failed to restore the recruitment of BRCA1 to DSB sites. Moreover, we characterized CHK2 as a novel CDK9-interaction partner through ectopic and constitutive protein-protein interaction assays. Cells lacking CDK9 present an altered cell cycle progression after ionizing irradiation treatment. However, as seen for its checkpoint control profile, the sensitivity to ionizing irradiation and PARP inhibition are CHK2-independent phenotypes. We also observed that PLK1 levels are downregulated in CDK9-silenced cells only in the presence of CHK2, and CDK9 transactivation activity seems to be downregulated in cells lacking CHK2. Additionally, new CDK9 interactions in a DDR-related context were identified using a TAP-MS approach. Collectively, our data place CDK9 as an important player of the DDR through HR repair and cell cycle control and suggest a putative DDR-independent role for CHK2 interaction.

Keywords: BRCA1, CDK9, CHK2, DNA damage repair, Cell cycle.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.1. Representação esquemática do papel da instabilidade genômica na tumorigênese de neoplasias hereditárias e esporádicas.....	3
Figura 1.2. Papel de CHK2 no controle da transição G1/S.	6
Figura 1.3. Papel de CHK2 no controle da transição G2/M.	8
Figura 1.4. Mecanismo de reparo de quebras de dupla fita do DNA.	10
Figura 1.5. Representação esquemática dos domínios de BRCA1 e de seus parceiros de interação.....	14
Figura 1.6. Rede de interação proteica do domínio tBRCT.	17
Figura 1.7. Representação esquemática do papel de CDK9 no processo de alongamento durante a transcrição gênica.....	19
Figura 1.8. CDK9 interage com BRCA1 e BARD1, e colocaliza com BRCA1 nos sítios de dano ao DNA.....	21
Figura 1.9 CDK9 modula o recrutamento de BRCA1 para os sítios de quebra de dupla fita.	23
Figura 1.10 O silenciamento de CDK9 é acompanhado pela redução do reparo por recombinação homóloga e aumento da sensibilidade à radiação ionizante.....	24
Figura 4.1 Representação esquemática das construções plasmidial utilizadas.....	27
Quadro 4.1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	29
Quadro 4.2. Lista dos anticorpos utilizados.....	34
Figura 5.1. CDK9 modula o recrutamento de RAD51, mas não de 53BP1, aos sítios de dano ao DNA.	41
Figura 5.2. A redução dos níveis de CDK9 gera um fenótipo de sensibilidade à inibição de PARP.....	43
Figura 5.3.1. Caracterização do mutante E369A de CDK9.....	45
Figura 5.3.2. Mutações no domínio tBRCT de BRCA1 são capazes de reestabelecer a interação com CDK9 _{E369A}	48
Figura 5.3.3. Caracterização da formação do complexo CDK9-BRCA1-BARD1.....	50
Figura 5.4.1. A interação CDK9/BRCA1 não interfere na ativação e atividade catalítica de CDK9.....	52

Figura 5.4.2. A interação CDK9/BRCA1 não interfere na transativação transcricional dependente de CDK9.....	54
Figura 5.5. A interação CDK9/BRCA1 modula o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA.....	56
Figura 5.6.1. CHK2 é capaz de interagir com CDK9.....	58
Figura 5.6.2. CHK2 interage com CDK9 em células humanas.....	60
Figura 5.6.3. Avaliação da putativa relação cinase-substrato entre CHK2 e CDK9..	62
Figura 5.7 A redução dos níveis de CDK9 resultam no aumento da sensibilidade à radiação ionizante, de forma independente de CHK2.....	64
Figura 5.8. A redução dos níveis de CDK9 resulta no aumento da sensibilidade à inibição de PARP, de forma independente de CHK2.....	66
Figura 5.9. CDK9 participa do controle de parada do ciclo celular mediante danos no DNA, de forma independente de CHK2.....	68
Figura 5.10.1. CDK9 apresenta parceiros de interação comuns a BRCA1 e CHK2..	70
Figura 5.10.2. Os níveis proteicos de PLK1 variam mediante interferência para CDK9, de forma dependente de CHK2.....	72
Figura 5.11. CHK2 modula a transativação transcricional mediada por CDK9.....	74
Figura 5.12. Caracterização dos parceiros de interação com CDK9 no contexto de danos ao DNA.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius
53BP1 – p53 *binding protein*
Arg – Arginina
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATM - *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein*
ATRIP – *ATR-Interacting Protein*
BACH1 – *BTB and CNC homology 1*
BARD1 – *BRCA1-associated RING Domain Protein 1*
BRCA1/2- *Breast Cancer Susceptibility Gene 1/2*
BRCT – *BRCA1 C-terminal*
BRD4 – *Bromodomain protein 4*
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CBP – *Calmodulin Binding Protein*
CDC - *Cell Division Cycle*
CDK – *cyclin-dependent kinase*
CDKN1A – *CDK-Inhibitor 1A*
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
CHK1/2 – *Chekpoin Kinase 1/2*
CO₂ - Dióxido de carbono
CoIP - Coimunoprecipitação
CTD, *C-Terminal Domain*
CtIP – *C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein*
DRB – 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole
PVDF - difluoreto de polivinilideno
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs - *Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide*
DSIF – DRB sensitivity-inducing factor
DTT - 1,4-ditiotreitol
ECT2 – *Epithelial cell-transforming 2*
EDTA - ácido etilenodiamina tetraacético
EXO1 – *Exonuclease I*
g – gravidade ($g = 9,8 \text{ cm/s}^2$)
G1 – Gap 1
G2 – Gap 2
GIN – *Genomic Instability*
Glu – Glutamato
GST- *Glutathione S-transferase*
Gy - Gray
H2A – Histona H2A
H2AX – Variante X, da histona H2A
H4 – Histona H4
HCl – ácido clorídrico
HR – *homologous recombination*
IgG – imunoglobulina G
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

K - quilo
KAT5 – *Lysine Acetyltransferase 5*
kb - quilobases
KCl- cloreto de potássio
kDa - quilodalton
KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico
KOH – hidróxido de potássio
kV - quilovolts
LB - Luria-Bertani
Leu – Leucina
LIT - *literature*
M - *Mitosis*
M - molar
MCM3/6 - Minichromosome Maintenance Complex Component 3/6
MCMBP – *MCM-Binding Protein*
MDC1 – *Mediator of DNA damage checkpoint 1*
mg – miligrama
Mg - Magnésio
min – minuto (s)
mL - mililitro
mM - milimolar
MRE11 - *Meiotic Recombination 11 Homolog*
MRN - MRE11-Rad50-NBS1
MSH - MutS Homolog
Na₃VO₄ - Ortovanadato de sódio
NaCl – cloreto de sódio
NaF – Fluoreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NBS1 – *Nijmegen breakage syndrome 1*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NELF – *Negative Elongation Factor*
NHEJ – *non-homologous end joining*
NLS – *Nuclear Localization Signal*
nM – nano molar
nm - nanômetros
p/v – peso por volume
PALB2 – *Partner and Localizer of BRCA2*
PARP1 – *Poly(ADP) – Ribose Polymerase 1*
PAXIP1 – PAX-interacting protein
PBS – tampão fosfato-salino
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
pH – potencial hidrogeniônico
Phe – Fenilalanina
PEI - polietilenimina
Pro – Prolina
P-TEFb – *Positive Elongation Factor B*
PTIP - *PAX Transcription Activation Domain Interacting Protein 1*
RAP80 – *Receptor-associated protein 80*
Rb – Retinoblastoma

RDD – resposta ao dano de DNA
RIF1 - *Replication Timing Regulatory Factor 1*
RING – *Real Interesting New Gene* (domínio protéico)
RNA – ácido ribonucleico
RNF8/168 – *Ring finger protein 8/168*
RPA – *Replication protein A*
RPB1 - *RNA Polymerase II Subunit B1*
S - *Synthesis*
SBP – *Streptavidin binding protein*
SDS – dodecil sulfato de sódio
Ser - Serina
shRNA – *short harpin RNA*
SIRT2 – Sirtuina 2
SLFN11 - *Schlafen Family Member 11*
SMC2/3 - *Structural Maintenance Of Chromosomes 2/3*
SFB - soro fetal bovino
TAP-MS – *Tandem affinity purification – Mass Spectrometry*
tBRCT –BRCT em tandem
TBS - *Tris-buffered saline*
TFIIH – *Transcription Factor II H*
Thr – Treonina
TIP60 - *Tat-Interactive Protein – 60kDa*
TOPBP1 - *DNA Topoisomerase II Binding Protein 1*
TP53 – *Tumor Protein p53*
TP53BP1 – *Tumor Protein p53 Binding Protein 1*
Tyr – Tirosina
USP7/9x - *Ubiquitin Specific Peptidase 7/9x*
Val – Valina
v/v – volume por volume
XRCC1/4 - *X-Ray Repair Cross Complementing 1/4*
µg - micrograma
µL - microlitro
µm - micrômetros
µmol – micromol
µM - micromolar

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1.	O Câncer.....	1
1.2.	O papel da instabilidade genômica na tumorigênese.....	1
1.3.	A resposta a danos de DNA.....	4
1.3.1.	Controle da progressão do ciclo celular por CHK2.....	5
1.3.2.	Reparo de danos ao DNA.....	9
1.3.3.	Recombinação homóloga.....	11
1.3.4.	Recombinação não homóloga por junção de pontas.....	12
1.4.	BRCA1.....	13
1.5.	Domínios BRCT em tandem no genoma humano.	16
1.6.	CDK9.....	18
2.	Objetivos.....	25
3.	Objetivos específicos.....	25
4.	Materiais e métodos.....	26
4.1.	Construções plasmidiais	26
4.2.	Cultivo de bactérias.....	30
4.3.	Produção proteica condicional em bactérias.....	30
4.4.	Culturas de células humanas.....	31
4.5.	Transfecção de células humanas.....	31
4.6.	Extração de proteínas de células humanas.....	31
4.7.	Ensaio de interação proteína-proteína.....	32
4.7.1.	(Co)imunoprecipitação de proteínas.....	32
4.7.2.	GST pulldown.....	32
4.8.	Immunoblotting.....	33
4.9.	Silenciamento da expressão gênica de CDK9.....	35
4.10.	Análise de imunofluorescência por microscopia confocal.....	35
4.11.	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.....	36
4.12.	Ensaio de viabilidade celular.....	36
4.13.	Ensaio de formação de colônias.....	37
4.14.	Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i>	37

4.15. Ensaio de transativação transcricional.....	38
4.16. Purificação de proteínas por afinidade sequencial seguida por espectrometria de massas (Tanden Affinitiy Purification, TAP-MS)	38
4.17. Análise de rede de interação in silico.....	39
4.18. Enriquecimento de vias biológicas in silico.....	39
4.19. Alinhamento in silico.....	39
4.20. Análises estatísticas.....	39
5. Resultados.....	40
5.1. Análise do recrutamento de 53BP1 e RAD51 aos sítios de dano ao DNA na ausência de CDK9.....	40
5.2. Avaliação do papel de CDK9 na sensibilidade à inibição de PARP.....	42
5.3. Caracterização estrutural da interação entre CDK9, BRCA1 e BARD1.....	44
5.4. Caracterização funcional do papel da interação CDK9/BRCA1 no controle transcricional mediado por CDK9.....	49
5.5. Caracterização funcional do papel de CDK9 na resposta a danos no DNA em modelo independente do controle transcricional.....	55
5.6. Caracterização da interação entre CDK9 e CHK2.....	57
5.7. Avaliação do papel de CHK2 na sensibilidade à radiação ionizante de células interferidas para CDK9.	63
5.8. Avaliação do papel de CHK2 na sensibilidade à inibição de PARP de células interferidas para CDK9.	65
5.9. Avaliação do papel de CDK9 no controle do ciclo celular mediante danos ao DNA.....	67
5.10. Caracterização da rede de interação comum à BRCA1, CHK2 e CDK9.....	69
5.11. Avaliação do papel de CHK2 na transativação transcricional mediada por CDK9.....	73
5.12. Determinação da rede de interação proteica mediada por CDK9 no contexto de dano ao DNA.....	73
6. Discussão.....	78
7. Conclusões	89
8. Referências bibliográficas.....	90

Anexo I.....	110
Anexo II.....	119
Anexo III.....	121
Anexo IV.....	126

1. Introdução

1.1. O câncer

O câncer é um problema de saúde mundial, afetando aproximadamente 18 milhões de pessoas por ano, com cerca de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018, segundo dados da GLOBOCAN (“GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018” – obtido através do sítio <http://www.gco.iarc.fr/>). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, estima-se para cada ano do triênio 2020-2022, a ocorrência de cerca de 625 mil novos casos no Brasil (“Estimativa 2020 de Incidência de Câncer no Brasil” – obtido através do sítio <http://www.inca.gov.br/>).

A complexidade da biologia tumoral está intrinsicamente associada às diferentes características adquiridas pelas células cancerosas ao longo da história da doença. A aquisição do fenótipo neoplásico baseia-se na alteração de diferentes vias biológicas que resultam na perda do controle da proliferação. Dentre elas, notabilizam-se a capacidade de suprimir estímulos antiproliferativos, evitar mecanismos de morte celular, evadir do sistema imune e sustentar a proliferação mesmo em situações desfavoráveis. Essas células também apresentam capacidade indefinida de proliferação, sustentam o processo de angiogênese, e passam a apresentar desregulação metabólica, além de adquirirem a capacidade de invadir e colonizar outros tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Algumas características, como a capacidade de promover a inflamação e a instabilidade genômica (*genomic instability* – GIN), destacam-se por serem capazes de promover a tumorigênese, (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2. O papel da instabilidade genômica na tumorigênese

O fenótipo de GIN é definido como o aumento da frequência de alterações genéticas (como mutações, amplificações, translocações, entre outras) durante a vida de uma célula. Esse perfil está diretamente associado à aquisição das diferentes características apresentadas na seção anterior (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010), além de ter participação importante no desenvolvimento da

heterogeneidade tumoral e, geralmente, estar associado a quadros de pior prognóstico (ANDOR; MALEY; JI, 2017).

A integridade genômica é mantida através de diferentes processos biológicos, dentre os quais destacam-se especialmente a fidelidade da replicação do genoma, o controle de transição entre as diferentes fases do ciclo celular, a segregação precisa dos cromossomos durante a mitose e o reparo de eventuais danos no DNA (AGUILERA; GARCÍA-MUSE, 2013).

A GIN apresenta um papel importante na evolução das neoplasias, independente de sua origem (esporádica ou hereditária), porém, os mecanismos de instabilidade variam de acordo com o perfil da doença. Em neoplasias de origem esporádica, esse fenótipo está relacionado ao aumento do estresse replicativo, decorrente da proliferação exacerbada adquirida através da ativação de oncogenes (**Figura 1.1**) (HALAZONETIS; GORGOULIS; BARTEK, 2008; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). Por outro lado, em casos de câncer hereditário, a GIN está intimamente associada à perda da heteroziguidade de genes envolvidos com vias de reparo a danos no DNA (**Figura 1.1**). Como observado na síndrome de Lynch, onde portadores de mutações na linhagem de células germinativas em genes relacionados ao reparo do pareamento errôneo, adquirem o fenótipo de GIN depois da perda do alelo funcional, favorecendo o acúmulo de mutações e conseqüentemente também a tumorigênese (FISHEL et al., 1993; LEACH et al., 1993; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). Outro exemplo clássico é a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, atribuída principalmente às mutações inativadoras nos genes envolvidos com o reparo de quebra de dupla fita por recombinação homóloga (*Homologous Recombination*; HR), *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2* (KENNEDY; D'ANDREA, 2006; NEPOMUCENO et al., 2017b; NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016; RIPPERGER et al., 2009)

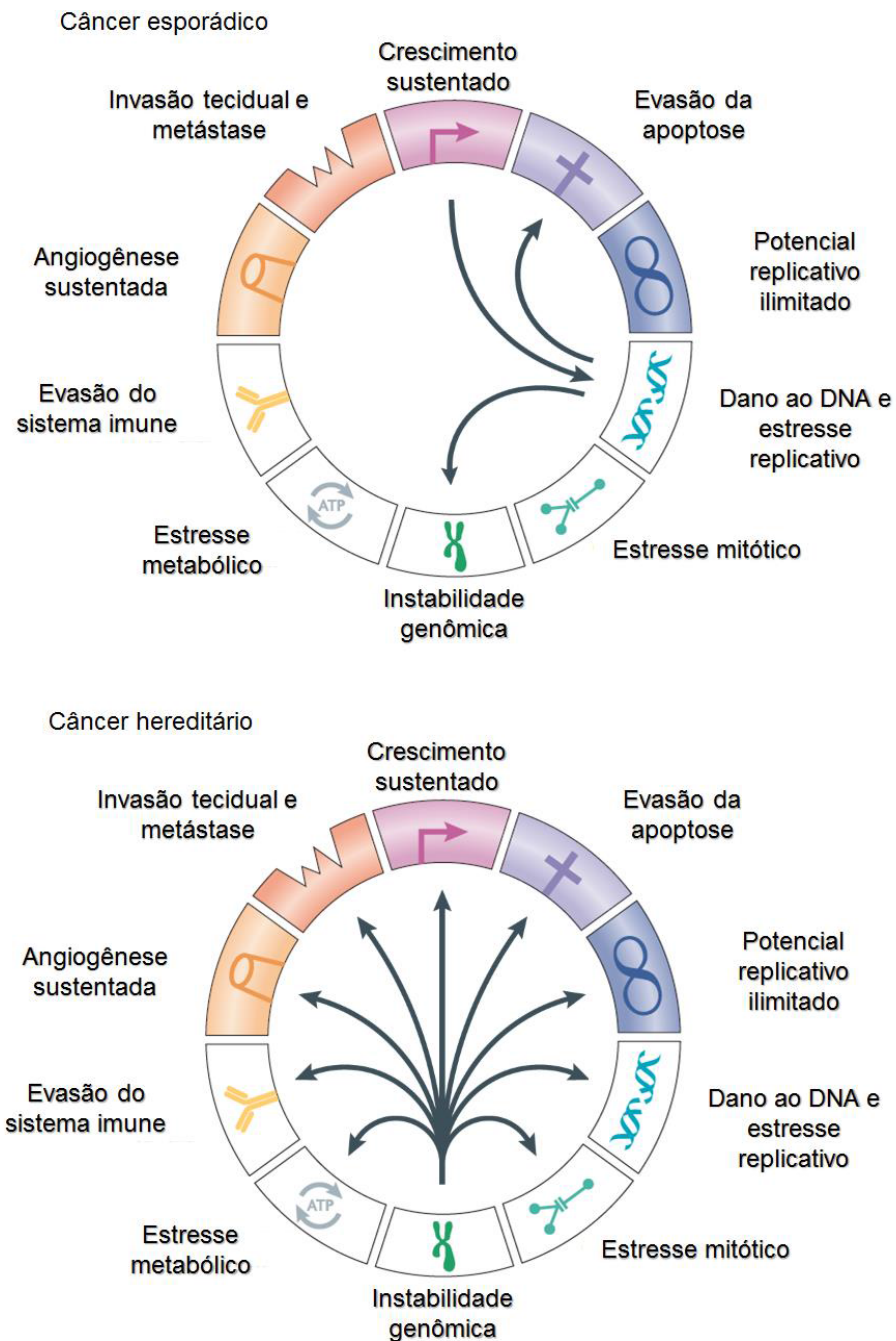


Figura 1.1. Representação esquemática do papel da instabilidade genômica na tumorigênese de neoplasias hereditárias e esporádicas. Representação do papel da GIN em tumores de origem esporádica, através de alterações geradas por estresse replicativo que culminam no desenvolvimento do fenótipo de GIN; e de origem hereditária, por mutações em genes relacionados a vias de manutenção da integridade genômica. Adaptado de NEGRINI; GORGOLIS; HALAZONETIS, 2010.

1.3. A resposta a danos de DNA

A importância do reparo a danos ao DNA, na manutenção da integridade genômica, é evidenciada pela noção de que o DNA de células humanas encontra-se constantemente sujeito a danos, que podem ter origem endógena ou exógena, como erros do processo de replicação, reações químicas espontâneas, agentes químicos e radiação ionizante. Esses danos resultam em diferentes tipos de lesão, como quebras de fita simples, formação de adutos, alquilação e oxidação de bases nitrogenadas além de quebras de fita dupla. Sendo a última considerada a mais tóxica por permitir rearranjos no genoma lesionado (KASTAN; BARTEK, 2004; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

Dessa forma, diferentes mecanismos moleculares foram evolutivamente selecionados, permitindo que as células detectem e reparem esses danos (ARCAS et al., 2014; FRIEDBERG, 2003). Essa sinalização é denominada resposta a danos de DNA (RDD), e é fundamental na manutenção da integridade genômica e consequente supressão tumoral.

De forma geral, a RDD pode ser dividida em dois braços principais: o controle de parada da progressão do ciclo celular e o reparo efetivo do dano ao DNA. Ambos apresentam a mesma estrutura de transdução de sinal, composta por proteínas sensoras, que sinalizam e recrutam proteínas mediadoras que, por sua vez, transduzem o sinal para as proteínas efetoras da resposta que promovem o arresto do ciclo celular, reparo e/ou morte celular (JACKSON; BARTEK, 2009; LOWNDES; MURGUIA, 2000; PETRINI; STRACKER, 2003; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

1.3.1. Controle da progressão do ciclo celular por CHK2.

A parada do ciclo celular mediante quebra de dupla fita do DNA é orquestrada majoritariamente pela ativação das cinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) e CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*). O reconhecimento da lesão culmina na autofosforilação e consequente ativação da cinase ATM que, por sua vez, catalisa a fosforilação de uma série de componentes da via de RDD. Dentre os substratos de ATM, destaca-se a cinase CHK2 que atua na RDD promovendo a parada do ciclo celular na transição G1/S e G2/M (GOLDBERG et al., 2003; MATSUOKA et al., 2007; MATSUOKA; HUANG; ELLEDGE, 1998; ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014).

A transição entre as fases G1 e S do ciclo celular é controlada principalmente pela ação da proteína CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*) que, juntamente com a ciclina E, modula a ativação do fator de transcrição E2F que, por sua vez, ativa a transcrição de genes relacionados a entrada em fase S. A manutenção de CDK2 em seu estado inativo ocorre através da fosforilação mediada pela cinase Wee1, que é contrabalaneada pela ação da fosfatase CDC25A. Mediante danos ao DNA, CHK2 fosforila CDC25A em seu sítio de controle de degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, promovendo a manutenção de CDK2 em sua forma inativa, o que resulta na parada das células em G1 (**Figura 1.2**) (DONZELLI; DRAETTA, 2003; FALCK et al., 2001; ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014). CHK2 também controla a entrada em S mediante danos no DNA através da fosforilação e consequente ativação de p53, que controla a transcrição de *CDKN1A* (gene que codifica p21), modulador negativo da ação de CDK2 (**Figura 1.2**) (CHEHAB et al., 2000; ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014). Por outro lado, p53 também apresenta um papel independente de CHK2 no controle de parada em G1/S, podendo ser ativado diretamente por ATM, ATR e/ou CHK1 (KARNITZ; ZOU, 2015; STEWART-ORNSTEIN; LAHAV, 2017).

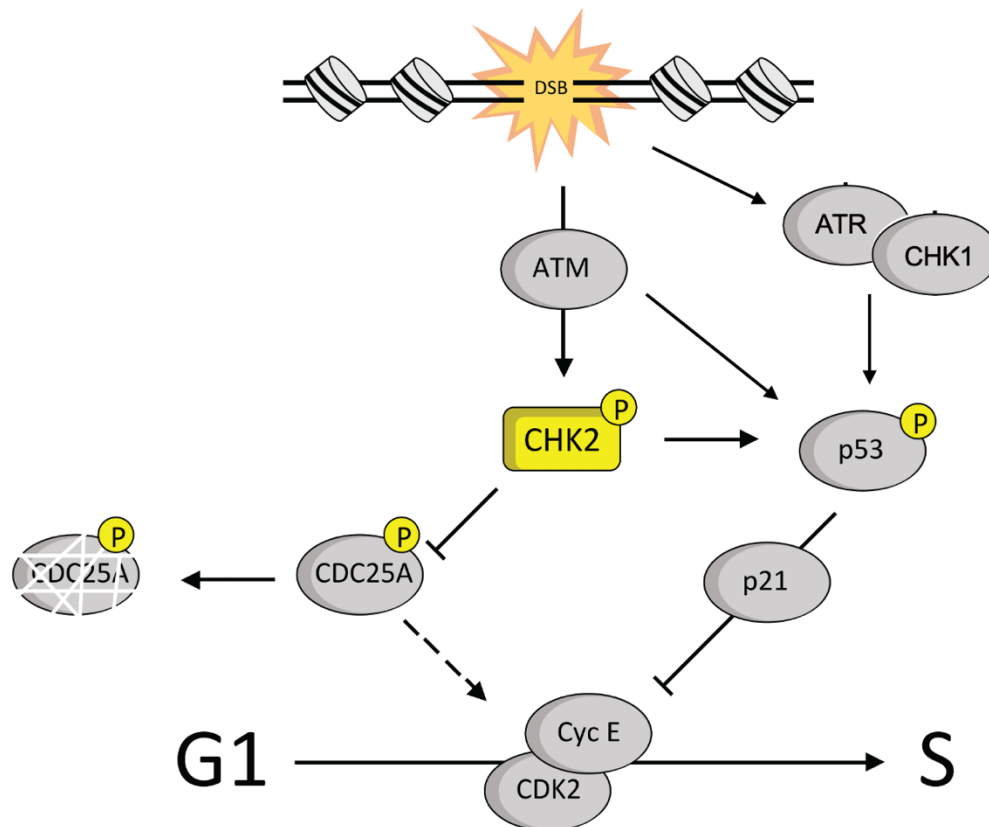


Figura 1.2. Papel de CHK2 no controle da transição G1/S. Mediante quebra de dupla fita, ATM fosforila/ativa CHK2 que, por sua vez, inibe a ação do complexo CDK2-ciclina E (Cyc E) através de dois mecanismos. (1) A inibição através da fosforilação de CDC25A, que acarreta a degradação da fosfatase pela ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e, conseqüentemente, manutenção do estado inativo de CDK2. (2) A ativação através da fosforilação de p53, que culmina na transcrição do inibidor de CDK2, *CDKN1A* (que codifica p21). Ambos os mecanismos levam a inibição da transição G1/S. O controle de parada em G1/S no contexto de RDD, também é modulado pela ação de p53 através da fosforilação promovida por ATM, ATR e/ou CHK1.

A transição G2/M é modulada, principalmente, pela ação de CDK1 e ciclina B. CDK1 atua através da ativação do complexo APC/C que, de forma geral, promove a entrada em mitose. Semelhante a CDK2, a ativação de CDK1 é sustentada pela manutenção do seu estado desfosforilado por CDC25C. Mediante danos ao DNA, CHK2 atua no controle de entrada em mitose através da fosforilação de CDC25C, promovendo sua translocação para o citoplasma através da ação de proteínas da família 14-3-3. Uma vez no citoplasma, CDC25C não sustenta CDK1 em seu estado ativo no núcleo, promovendo, assim, a parada das células na fase G2 (**Figura 1.3**) (DALAL et al., 1999; MATSUOKA; HUANG; ELLEDGE, 1998; TAKIZAWA; MORGAN, 2000).

Por outro lado, o papel de CHK2 é suplementado pela ação da cinase Wee1, responsável pela promoção da parada em G2, através da fosforilação inibitória de CDK1 (CRNCEC; HOCHEGGER, 2019). Mediante reparo efetivo dos danos ao DNA, a reentrada em mitose é mediada pela ação da cinase PLK1, que fosforila Wee1, promovendo sua degradação. PLK1 também atua no controle de parada em G2 através da fosforilação inibitória de CHK2 (JOUKOV; DE NICOLO, 2018).

Além de seu papel nos pontos de checagem das diferentes fases do ciclo celular, CHK2 também atua na manutenção da integridade genômica através do controle de formação dos microtúbulos através da fosforilação de BRCA1 no resíduo de serina na posição 988, porém, esse mecanismo de controle não está completamente elucidado. Até o momento, os dados disponíveis na literatura apontam para um papel na modulação da cinase Aurora A. Essa fosforilação de BRCA1 também impacta sua função no reparo de dano no DNA (ERTYCH et al., 2016; STOLZ et al., 2010; ZHANG et al., 2004).

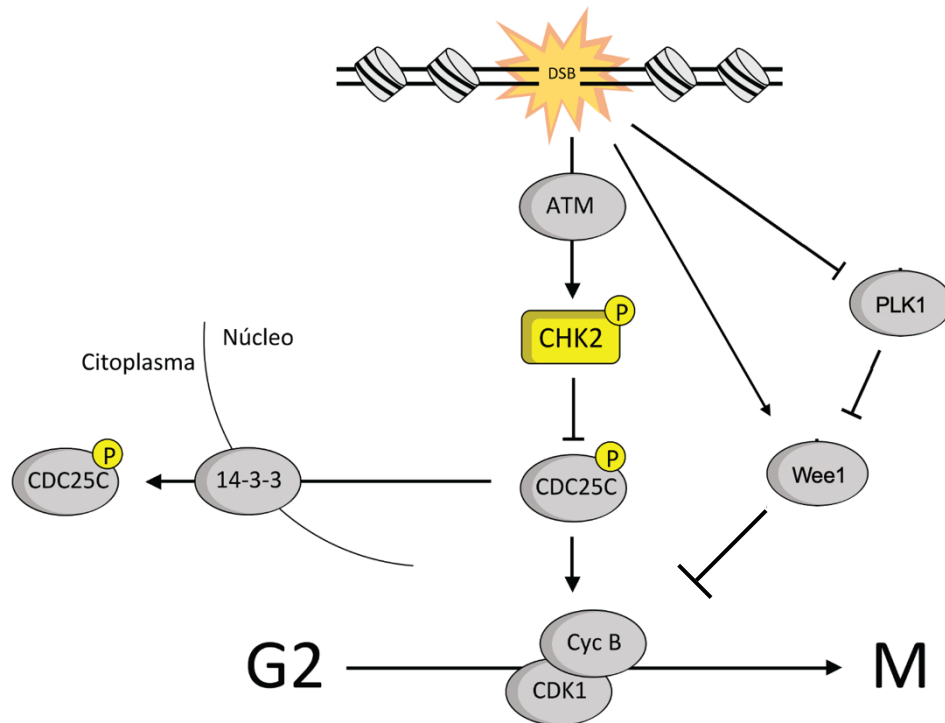


Figura 1.3. Papel de CHK2 no controle da transição G2/M. Mediante quebra de dupla fita, ATM fosforila/ativa CHK2 que, por sua vez, inibe a ação do complexo CDK1-ciclina E (Cyc B) através da fosforilação de CDC25C que é, então, translocada para o citoplasma através da ação de proteínas da família 14-3-3. A ausência de CDC25C no núcleo leva à manutenção do estado inativo de CDK1 e, conseqüentemente, paralisa a transição G2/M. O controle de parada em G2/M também é promovido pela ação de Wee1, que fosforila e inibe CDK1. Por outro lado, mediante reparo da lesão, PLK1 atua por promover a reentrada em mitose através do controle das funções de CHK2 e Wee1.

1.3.2. Reparo de danos ao DNA

A sinalização celular que promove o reparo aos danos no DNA é composta por múltiplas etapas enzimáticas. Essas etapas promovem, de forma hierárquica, o reconhecimento da lesão, seguido do processamento da região ou nucleotídeo/base danificada e, posteriormente, o reparo do dano. As quebras da dupla fita são resolvidas, majoritariamente, por dois mecanismos: a HR, que faz uso da cromátide irmã como molde para promover o reparo de forma fiel, ou o reparo não homólogo por junção de pontas (*Non-Homologous End Joining* – NHEJ), que por religar as fitas lesionadas com um processamento mínimo, e é propenso a erros (DALEY; SUNG, 2014; HUSTEDT; DUROCHER, 2016).

A ativação dessas vias está intimamente relacionada à fase do ciclo celular que a célula se encontra. O reparo por HR ocorre preferencialmente nas fases S e G2. Por outro lado, o NHEJ ocorre de forma ubíqua ao longo do ciclo celular (HUSTEDT; DUROCHER, 2016). O comprometimento celular com a via de HR ou NHEJ, nas fases do ciclo onde ambas podem ocorrer, baseia-se na execução do processamento conhecido como ressecção. Mecanicamente, esse controle passa pela atividade de proteínas da família das cinases dependente de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinases*; CDKs), que estimulam o processamento das fitas lesionadas através da fosforilação de endo e exonucleases responsáveis por promover a ressecção (HUSTEDT; DUROCHER, 2016).

De forma geral, a sinalização do reparo se inicia com o reconhecimento da lesão pelo complexo MRN, composto pelas proteínas MRE11, RAD50 e NBS1 (PAULL, T. *et al.*, 2000; BOSCH, M. *et al.*, 2003). O complexo MRN se liga às pontas quebradas e ativa a cinase ATM, que por sua vez, promove a fosforilação da variante X da histona H2A (H2AX) no resíduo de serina na posição 139 (γ H2AX). O enriquecimento de γ H2AX na circunvizinhança da lesão, coordena o recrutamento de diferentes proteínas para essas regiões, entre elas, destaca-se MDC1. Uma vez recrutada para os sítios de dano, MDC1 interage com ATM e NBS1, regulando positivamente a ativação de ATM, amplificando o sinal de fosforilação de H2AX (**Figura 1.4**) (LOU *et al.*, 2006).

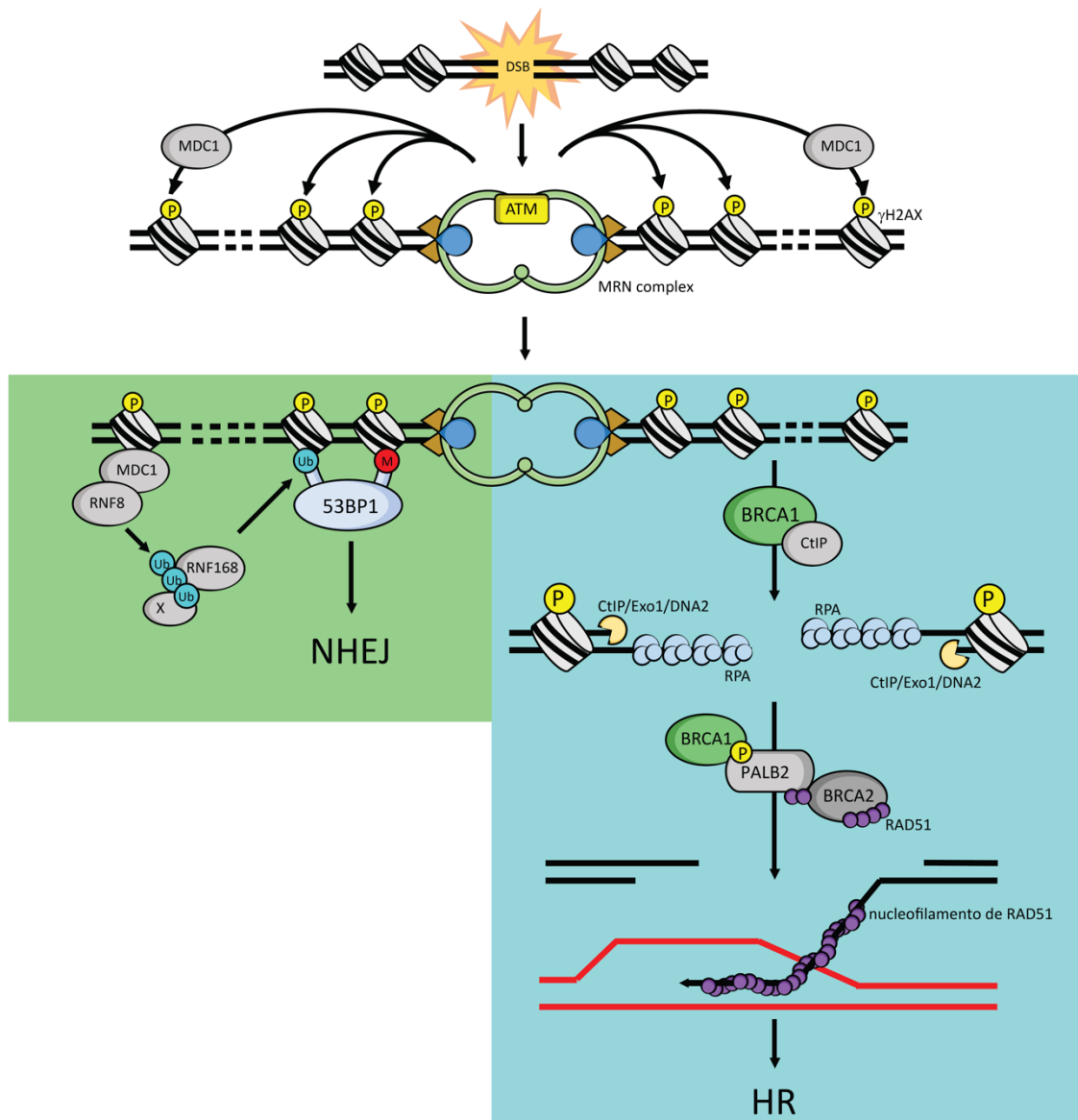


Figura 1.4. Mecanismo de reparo de quebras de dupla fita do DNA. Mediante quebra de dupla fita, o complexo MRN ativa a cinase sensora ATM que, por sua vez, promove a fosforilação da histona H2AX. O sinal é posteriormente amplificado através da ação de MDC1. Em um segundo momento, a resposta pode seguir dois mecanismos distintos, dependentes do recrutamento de 53BP1 ou BRCA1. (1 – fundo verde) O recrutamento de 53BP1 e direcionamento do reparo por NHEJ, ocorre de forma dependente da ação das E3 ubiquitina ligases RNF8 e RNF168, assim como da metilação do residuo de lisina 20 da histona H4. (2 – fundo azul) O recrutamento de BRCA1 e CtIP culmina na ressecção das fitas lesionadas e direcionamento do reparo por HR. A simples fita de DNA é então capeada por RPA que posteriormente é substituída por RAD51 através da ação do complexo BRCA1-PALB2-BRCA2. A recombinase RAD51 então promove a invasão da cromátide irmã e conseqüentemente reparo por HR. Adaptado de NEPOMUCENO et al., 2017b.

ATM também promove a interação de MDC1 e RNF8, que estimula o recrutamento da E3 ubiquitina ligase RNF168 que, por sua vez, promove a ubiquitinação do resíduo de lisina na posição 15 da histona H2A. Esta sinalização, juntamente com a metilação no resíduo de lisina na posição 20 da histona H4, é responsável pelo recrutamento de 53BP1 para os sítios de dano. Durante a fase G1, 53BP1, juntamente com PTIP, RIF1 e o complexo *Shielding*, inibem a ressecção através do controle do recrutamento de BRCA1/CtIP e modulação da atividade das exonucleases Exo1 e DNA2. (CALLEN et al., 2020; PANIER; BOULTON, 2014) (**Figura 1.4**).

Durante as fases S e G2 do ciclo celular, a ressecção é favorecida pelo recrutamento do complexo BRCA1/CtIP através da interação com o complexo MRN. As endonucleases MRE11 e CtIP promovem a excisão dos primeiros nucleotídeos (que variam de 50 a 500pb) no sentido 3'→5', em direção a região da lesão (ANAND et al., 2019; MAKHARASHVILI et al., 2014). Posteriormente, as exonucleases Exo1 e DNA2 procedem com a retirada de até 5kb, permitindo a exposição da região a ser pareada com a cromátide irmã e, assim, patrocinando a adequada orientação de polimerização (5'→3'). A exposição de regiões de fita-simples promove o reconhecimento/recrutamento do complexo RPA, que realiza o capeamento dessas fitas, inibindo a ação de nucleases e favorecendo o reparo por HR (**Figura 1.4**) (CRUZ-GARCÍA; LÓPEZ-SAAVEDRA; HUERTAS, 2014).

1.3.3. Recombinação homóloga

As etapas subsequentes à ressecção das fitas lesionadas, ainda não estão completamente elucidadas. Entretanto, sabe-se que a recombinase efetora RAD51, desempenha um papel fundamental para que ocorra a busca e invasão da fita homóloga nas etapas finais da HR. O carregamento de RAD51 às fitas capeadas por RPA é promovido pela ação do complexo BRCA1/PALB2/BRCA2. RAD51 promove a formação da estrutura conhecida como *D-loop*, durante a síntese dependente da fita homóloga, etapa fundamental para que o reparo por HR ocorra de forma fiel (**Figura 1.4**) (NEPOMUCENO et al., 2017b; THOMPSON, 2012).

Apesar de seu papel central no reparo por HR, mediante perda de 53BP1, células deficientes para BRCA1 são capazes de promover o reparo por HR. Mecanicamente, a perda da inibição mediada por 53BP1 em células BRCA1 nulas, reestabelece a etapa de ressecção. Dados da literatura sugerem que, em células deficientes para BRCA1, o direcionamento de RAD51 para as regiões ressecadas ocorre através do recrutamento de PALB2 por RNF168 ou mediante seu reconhecimento de regiões da cromatina (BELOTSEKOVSKAYA et al., 2020; CALLEN et al., 2020; ZONG et al., 2019).

A importância do papel do complexo BRCA1/PALB2 no reparo a danos no DNA pode ser evidenciado pelo fato de que a inibição da HR durante a fase G1 do ciclo celular também ocorre através da modulação da interação entre BRCA1 e PALB2 pela ubiquitinação de PALB2 pela ação da E3 ubiquitina ligase CUL3, impossibilitando que ocorra a heterodimerização de BRCA1 e PALB2 pelos seus domínios *coiled-coil*. Nas fases S/G2 do ciclo celular essa ubiquitinação é revertida através da ação da deubiquitinase USP11, de forma ATM e ATR dependente, favorecendo o reparo por HR (ORTHWEIN et al., 2015).

1.3.4. Recombinação não homóloga por junção de pontas

Como discutido anteriormente, o reparo por NHEJ é favorecido pela inibição da ressecção por 53BP1. A sinalização da via de NHEJ pode ser dividida em NHEJ clássica ou alternativa (conhecida como junção de pontas micro-homólogas; *Micro-homology end-joining - MMEJ*), sendo a primeira dependente do recrutamento do heterodímero Ku70-Ku80 e a segunda da participação de PARP1. De forma simplificada, a via clássica ocorre através da sinalização mediada da ação de cinase sensora DNA-PKcs, que promove o recrutamento de XRCC4 e DNA ligase 4 que, por sua vez, catalizam a junção das pontas lesionadas. Por outro lado, o reparo por MMEJ ocorre através da ação de XRCC1 e DNA ligase 3, que reconhecem regiões de micro-homologia que são, então, processadas e ligadas. De forma geral, ambos os processos são passíveis de erro, tendo em vista a eventual perda de regiões durante a etapa de processamento (THOMPSON, 2012; WANG et al., 2006).

1.4. BRCA1

Dentro do contexto da sinalização do reparo ao dano de DNA, BRCA1 desempenha um papel central na manutenção da integridade genômica e supressão tumoral. *BRCA1* foi descrito como primeiro gene associado à susceptibilidade hereditária ao câncer de mama (MIKI et al., 1994). Posteriormente, foi observado que portadoras de mutações patogênicas em *BRCA1* também são propensas ao desenvolvimento precoce de câncer de ovário (STEICHEN-GERSDORF et al., 1994). Mutações que estão relacionadas à perda de função de *BRCA1* resultam no risco estimado de 46-87% para o desenvolvimento do câncer de mama (contra 11% na população geral) e 39-63% para câncer de ovário (contra 1.4-2.5% na população geral) (PFEFFER; HO; SINGH, 2017).

BRCA1 apresenta vários motivos estruturais conservados entre os diferentes ortólogos (SZABO; WORLEY; MONTEIRO, 2004). A região N-terminal da proteína encerra um domínio RING-finger que confere atividade E3 ubiquitina ligase, e é responsável por mediar interações importantes para as funções de BRCA1, como com a proteína BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*) (**Figura 1.5**) (LORICK et al., 1999; RUFFNER et al., 2001; SAURIN et al., 1996). A formação do heterodímero BRCA1/BARD1 resulta no aumento da atividade E3 ubiquitina ligase de BRCA1 (BAER; LUDWIG, 2002; WU-BAER et al., 2003). Dentre os substratos do heterodímero, destacam-se a histona H2A, γ -tubulina e a holoenzima RNA polimerase II, quando fosforilada (FUKUDA et al., 2016; KALB et al., 2014; STARITA et al., 2005).

O heterodímero BRCA1/BARD1 catalisa a formação de cadeias de poliubiquitina ligadas entre si pelos resíduos de lisina na posição 6, ao contrário das cadeias canônicas que se valem dos resíduos de lisina nas posições 48 ou 63 (MORRIS; KEEP; SOLOMON, 2002; NISHIKAWA et al., 2004; RUFFNER et al., 2001). A atividade E3 ubiquitina ligase de BRCA1 parece desempenhar um papel importante na RDD, tendo em vista que danos no DNA resultam no aumento global das cadeias características do heterodímero (ELIA et al., 2015).

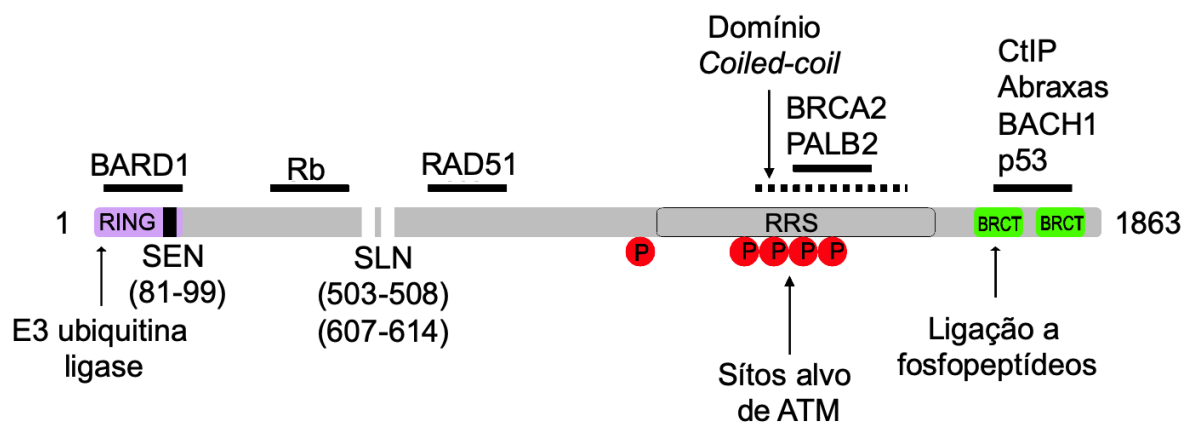


Figura 1.5. Representação esquemática dos domínios de BRCA1 e de seus parceiros de interação. Em destaque, as estruturas dos domínios RING-*finger*, responsável pela atividade E3 ubiquitina ligase da proteína (em roxo), e tBRCT, responsável pela ligação a proteínas fosforiladas (em verde). NLS: sinais de localização nuclear. O domínio *coiled-coil* é representado pela linha tracejada. Os sítios que são fosforilados na resposta ao dano de DNA são representados como círculos vermelhos. As barras horizontais pretas representam as regiões que medeiam a interação de outras proteínas com BRCA1, agrupados pelas respectivas regiões de interação. Adaptado de CLARK et al., 2012.

A porção central de BRCA1 encerra dois sinais de localização nuclear (*Nuclear Localization Signal – NLS*) compreendidos entre os resíduos de aminoácido 500-508 e 609-615, porém, apenas um (503-508) é essencial para sua apropriada localização nuclear (THAKUR et al., 1997). BRCA1 também apresenta sítios de fosforilação para ATM, ATR e CHK2 localizados em sua região central (**Figura 1.5**) (OUCHI, 2006).

A região C-terminal de BRCA1 contém dois domínios BRCT (**BRCA1 C-Terminal**) em tandem (CALLEBAUT; MORNON, 1997; KOONIN; ALTSCHUL; BORK, 1996; MESQUITA et al., 2010). Quando em tandem (tBRCT), esses domínios são capazes de reconhecer e se ligar a fosfopeptídeos que, no caso do tBRCT de BRCA1, respeitam a sequência consenso composta por um resíduo de serina fosforilada na posição 0, seguida de dois resíduos não conservados e um resíduo de fenilalanina na posição +3 (*pSer₀-X₊₁-X₊₂-Phe₊₃*) (BOTUYAN et al., 2004; CLAPPERTON et al., 2004; GLOVER; WILLIAMS; LEE, 2004; MESQUITA et al., 2010; SHIOZAKI et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004). O domínio tBRCT é responsável por mediar interações proteína-proteína, destacando-se a formação dos 3 principais complexos proteicos nos quais BRCA1 faz parte: o complexo BRCA1-A, BRCA1-B e BRCA1-C (**Figura 1.5**) (SAVAGE; HARKIN, 2015).

O complexo BRCA1-A é composto essencialmente por RAP80, MERIT40, BRE, ABRAXAS, BRCA1 e BARD1. Este complexo é recrutado para os sítios de dano ao DNA através do reconhecimento por RAP80 das histonas H2A e H2AX poliubiquitinadas. De forma geral, a presença desse complexo se faz necessária para que ocorra a parada do ciclo celular em G2/M, porém, o exato mecanismo ainda não está elucidado (SAVAGE; HARKIN, 2015). Existe na literatura uma discussão sobre a importância desse complexo para o reparo; já foi descrito que, quando ausente, existe uma redução da eficiência do reparo por HR. Porém, outros autores já demonstraram que o complexo BRCA1-A também limita a HR através do controle fino da ressecção (FENG; HUANG; CHEN, 2009; HU et al., 2011; WANG, 2007). O complexo BRCA1-B é composto por BACH1 (FANCI), TOPBP1, BRCA1 e BARD1, e está relacionado ao controle de parada do ciclo celular em fase S, assim como com o reparo de estruturas de *cross-link* no DNA (KUMARASWAMY; SHIEKHATTAR, 2007; SAVAGE; HARKIN, 2015). Já o complexo BRCA1-C, por sua vez, é formado por CtIP, pelo complexo MRN e pelo heterodímero BRCA1/BARD1, cujo papel

já foi discutido anteriormente (**seção 1.3.2**) (CRUZ-GARCÍA; LÓPEZ-SAAVEDRA; HUERTAS, 2014; MAKHARASHVILI et al., 2014).

1.5. Domínios BRCT em tandem no genoma humano.

O domínio BRCT foi originalmente identificado em BRCA1, porém está presente em diversas proteínas, tanto procarióticas quanto eucarióticas. O genoma humano codifica a produção de 23 proteínas que encerram pelo menos um BRCT (MESQUITA et al., 2010). Os domínios BRCT, quando em tandem, representam uma única unidade estrutural, formando uma classe particular de domínios BRCTs (JOO et al., 2002). O genoma humano codifica a produção de 12 proteínas que apresentam domínios tBRCT, e todas estão relacionadas com a RDD (GOLDBERG et al., 2003; GRAWUNDER et al., 1998; JOWSEY; DOHERTY; ROUSE, 2004; MESQUITA et al., 2010; RAPPOLD et al., 2001; WESTERMARK et al., 2003).

Em um trabalho prévio do nosso grupo, em associação com o grupo do Dr. A. Monteiro (*H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute*, Tampa, EUA), foi caracterizada a rede de interação proteica de sete tBRCTs presentes em proteínas diferentes (BRCA1, BARD1, PTIP, 53BP1, ECT2, MDC1 e DNA Ligase 4) (WOODS et al., 2012). Esse trabalho rastreou novas interações através de ensaios de dois híbridos em levedura contra uma biblioteca de expressão humana, e varredura por purificação de proteínas por afinidade sequencial, seguido por espectrometria de massas (*Tanden Affinity Purification – Mass Spectrometry*, TAP-MS). Também foi feita uma curadoria da literatura, buscando interações mediadas pelos domínios tBRCT, previamente descritas. Esse trabalho identificou 1013 interações. Dentre as quais, CDK9 (*Cyclin-Dependent Kinase 9*) nos chamou a atenção por ter sido identificada como parceira de interação de BRCA1 (por dois híbridos em levedura), BARD1 e PTIP (por ensaios de TAP-MS) (WOODS et al., 2012).

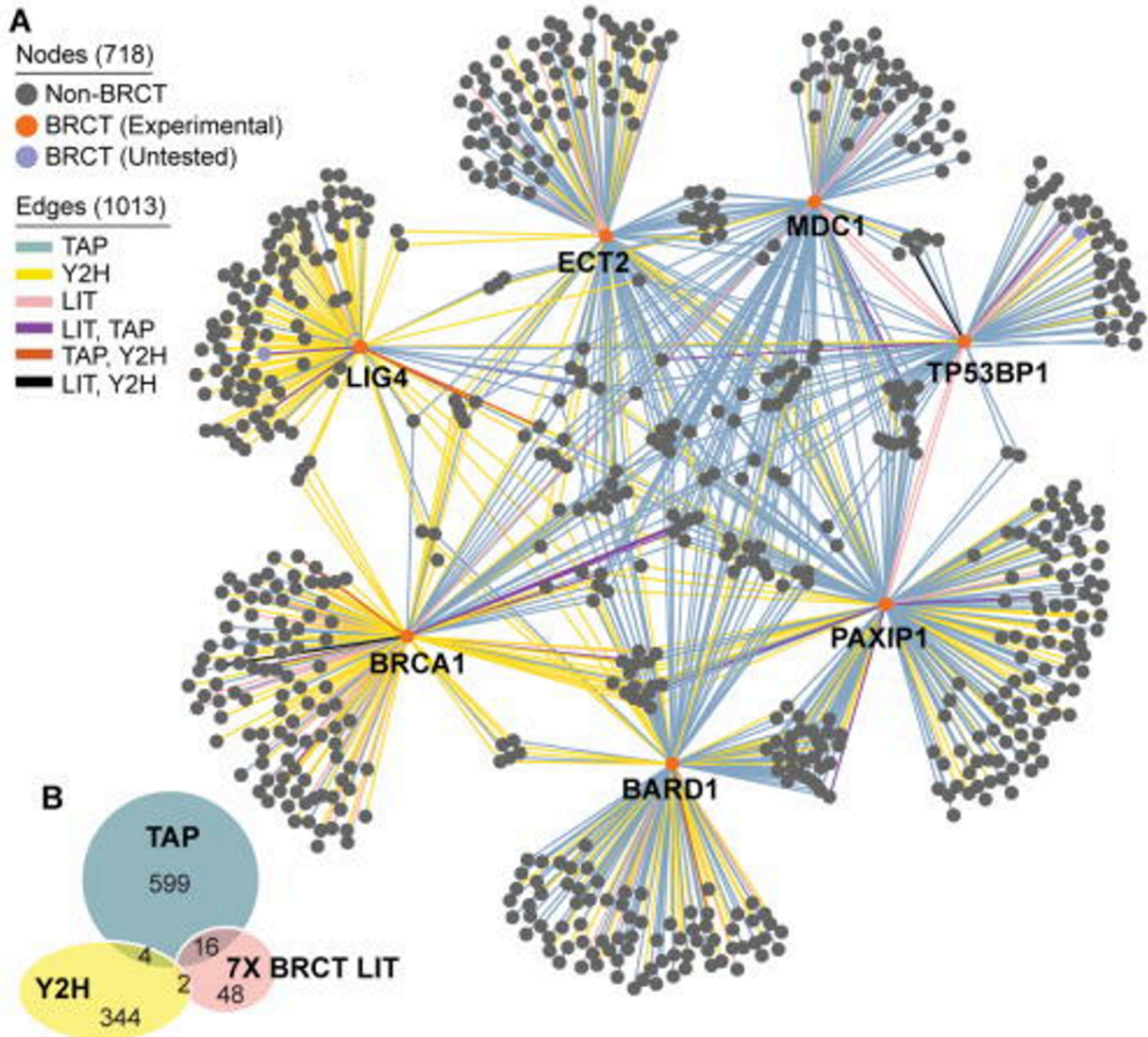


Figura 1.6. Rede de interação proteica do domínio tBRCT. (A) Integração das redes tBRCT: curadoria da literatura (7X-LIT), varredura pelo ensaio de dois-híbridos em levedura (Y2H) e purificação de proteínas por afinidade sequencial (TAP-MS). **(B)** Diagrama de Venn, mostrando a sobreposição de interações identificada por cada um dos métodos que deram origem a rede final de interação. Adaptado de WOODS et al., 2012.

1.6. CDK9

CDK9 foi originalmente identificada como uma proteína da família das CDC2 (*Cell Division Cycle 2*), descritas inicialmente em leveduras. Graña e colaboradores (1994) demonstraram que esta proteína é capaz de fosforilar Rb *in vitro*, sugerindo um papel no controle do ciclo celular. Entretanto, a atividade cinase de CDK9 não varia ao longo do ciclo celular, sugerindo uma função biológica diferente (GRAÑA et al., 1994; PAPANICOLAOU; DURVALE; CANDURI, 2017). CDK9 atua como subunidade catalítica do complexo denominado “fator de alongamento transcricional positivo b” (*Positive Transcriptional Elongation Factor b*, PTEF-b), juntamente com as ciclinas T (T1 e T2). O complexo PTEF-b promove o aumento da processividade da RNA polimerase II, através da fosforilação do segundo resíduo de serina do heptapéptido (*Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇*) que se apresenta em 52 repetições na cauda C-terminal (CTD, *C-Terminal Domain*) de Rpb1, uma das subunidade da holoenzima RNA polimerase II (**Figura 1.7**) (BRÈS; YOH; JONES, 2008; ROMANO; GIORDANO, 2008). Durante a etapa de alongamento, CDK9 também fosforila componentes inibitórios como NELF, DSIF e a histona H1, que atua como reguladora da compactação do DNA e conseqüentemente da expressão gênica (O'BRIEN et al., 2010; O'BRIEN; KNIGHT; RANA, 2012; PING; RANA, 2001; ZHOU; YIK, 2006).

O complexo PTEF-b apresenta um papel central na patogênese de alguns vírus, como o HSV (*Herpes Simplex Virus*) e HIV (*Human immunodeficiency vírus*), seja pela expressão de genes virais ou replicação do genoma (ZABOROWSKA; ISA; MURPHY, 2016). O estudo do papel de CDK9 na replicação do HIV teve impacto direto na elucidação do papel do complexo PTEF-b durante a etapa de alongamento da transcrição. Mediante infecção pelo HIV, CDK9 é recrutado através da interação entre a ciclina T e a proteína viral Tat (*Trans-activation of transcription*). A ciclina T é, então, direcionada à região LTR do genoma viral que, juntamente à CDK9, estimula a transcrição produtiva do genoma viral. O papel de CDK9 na transativação da região LTR do HIV foi, por muito tempo, utilizado como modelo para avaliar seu papel como subunidade catalítica do complexo PTEF-b (PAPANICOLAOU; DURVALE; CANDURI, 2017; RICE, 2019).

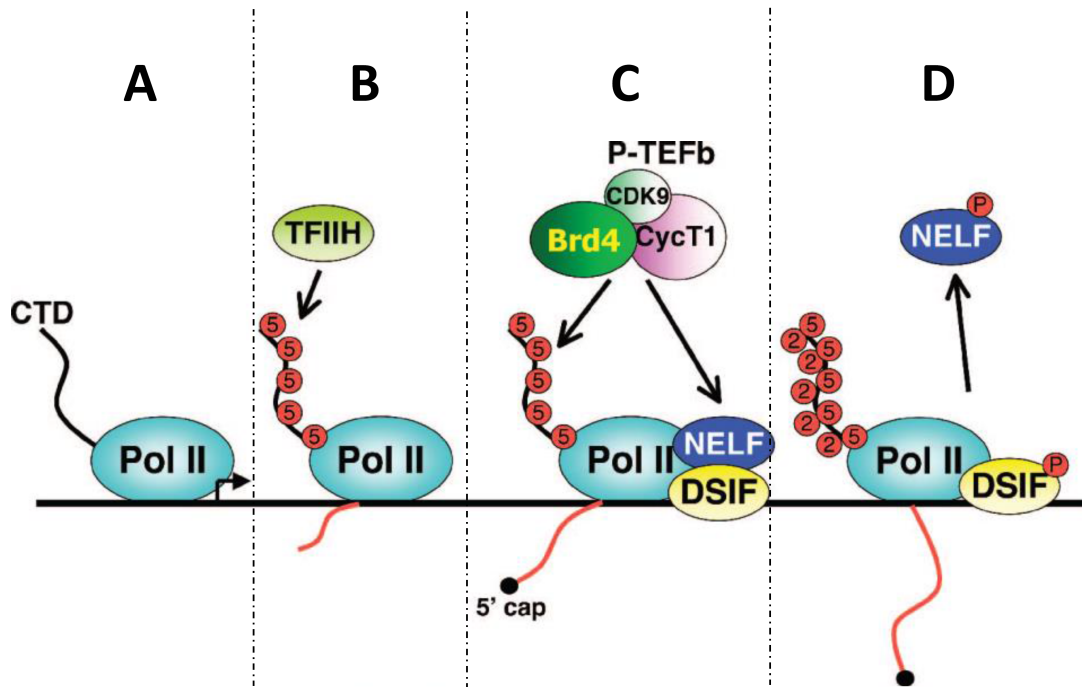


Figura 1.7. Representação esquemática do papel de CDK9 no processo de alongamento durante a transcrição gênica. (A) após o recrutamento da maquinaria basal da transcrição (aqui representado pela holoenzima RNA polimerase II – Pol II) para região promotora, (B) a cauda C-terminal (CTD) é fosforilada no resíduo de serina na posição cinco do heptapeptídeo YSPTSPS pelo complexo TFIIF. (C e D) Após a fosforilação, a maquinaria da cauda CTD precisa ser fosforilada pelo complexo P-TEFb, que tem CDK9 como unidade catalítica, no resíduo de serina na posição 2 do heptapeptídeo (YSPTSPS) para que a maquinaria da transcrição passe a apresentar uma maior processividade. Paralelamente CDK9 também fosforila os complexos inibitórios e estimuladores NELF e DSIF, respectivamente. Adaptado de ZHOU; YIK, 2006.

Além de interagir com ciclinas do tipo T, foi demonstrado que CDK9 é capaz de interagir com a ciclina K, sugerindo uma resposta mais flexível a diferentes estímulos, assim como outras CDKs envolvidas no controle do ciclo celular. Entretanto, não existe um consenso na literatura quanto a essa informação; um trabalho subsequente à descrição original demonstrou que CDK9 não interage com a ciclina K (BLAZEK et al., 2011; FU et al., 1999). Por outro lado, foi demonstrado que tanto CDK9 quanto a ciclina K participam da resposta ao estresse replicativo através da interação com ATR e ATRIP. Nesse contexto de RDD, CDK9 modula o recrutamento de RPA para a cromatina, e é modulado através da desacetilação do resíduo de lisina na posição 28 por SIRT2 que, por sua vez, também modula a ação de ATRIP (YU et al., 2010; ZHANG et al., 2013, 2016).

Diferentes linhas de evidência convergem para a noção de que proteínas envolvidas na regulação transcricional também possam estar, de alguma forma, relacionadas à RDD (FONG; CATTOGLIO; TJIAN, 2013; MALEWICZ; PERLMANN, 2014). A ação de BRD4 (ativador de P-TEFb) nas etapas iniciais de resposta ao dano de DNA é um dos muitos exemplos dessa interlocução (FLOYD et al., 2013; ITZEN et al., 2014; PONGAS et al., 2017; YANG; HE; ZHOU, 2008). Outro exemplo é a ação da acetiltransferase TIP60/KAT5, que mediante fosforilação por CDK9 estimula a transcrição através da acetilação da histona H4 (BRAUNS-SCHUBERT et al., 2018; HLUBEK et al., 2001). TIP60 também atua no reparo a danos de DNA através da acetilação que contribui para a ativação de ATM, além de promover a retirada de 53BP1 dos sítios de danos através da acetilação do resíduo de lisina 16 da histona H4 (PANIER; BOULTON, 2014).

De uma forma geral, diferentes linhas apontam para um papel de CDK9 na RDD. Dentro deste contexto, durante a elaboração do trabalho de mestrado que precedeu esta tese, fomos capazes de estabelecer uma relação funcional entre CDK9 e BRCA1 (NEPOMUCENO, 2016). Esses dados prévios são parte integrante do manuscrito “*BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9*” publicado no periódico *Cell Cycle*, em abril de 2017 (NEPOMUCENO et al., 2017a) (**Anexo I**). É importante ressaltar que parte dos resultados apresentados no manuscrito compõem (**Figura 5.1; página 41**) o trabalho de doutorado.

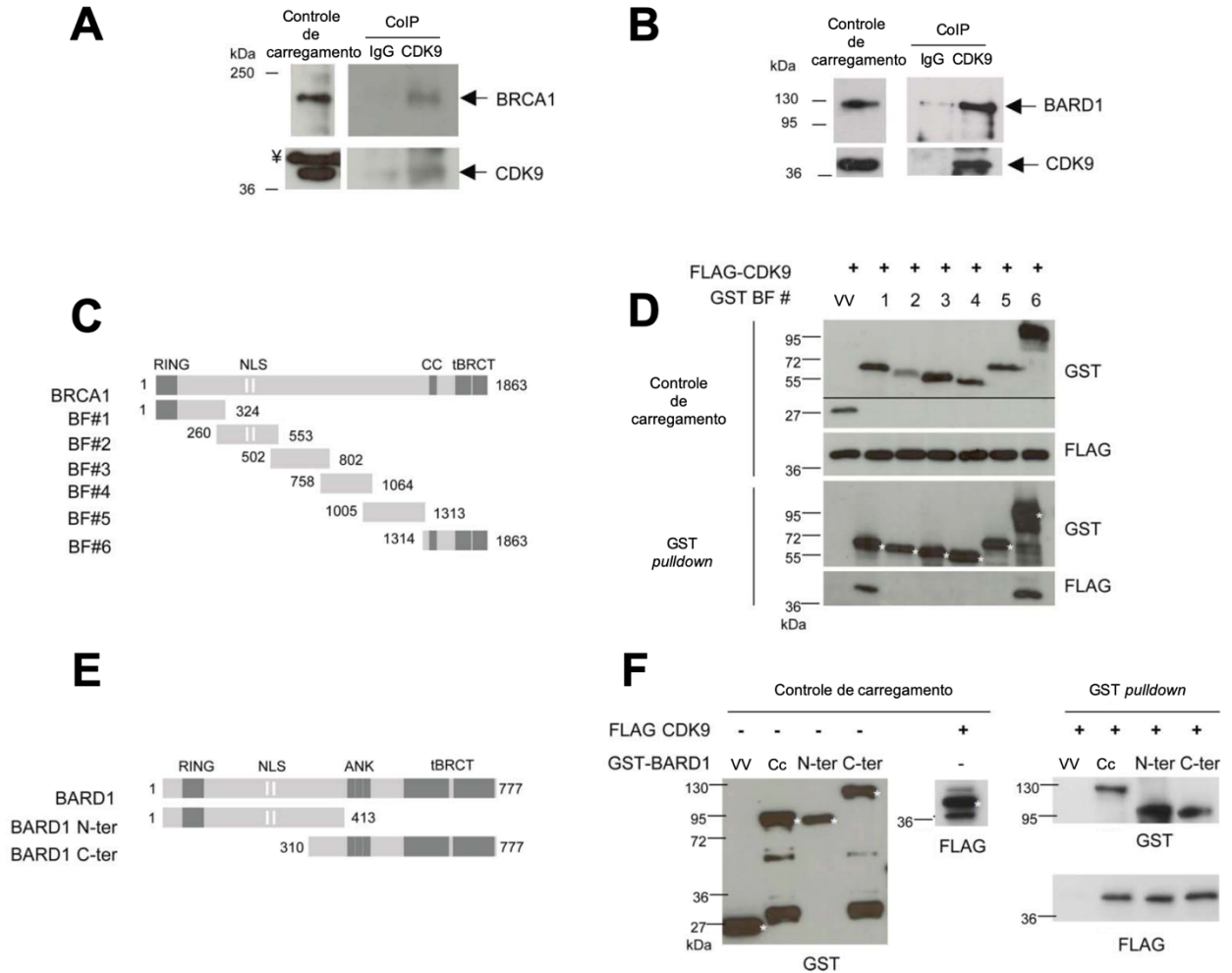


Figura 1.8. CDK9 interage com BRCA1 e BARD1, e colocaliza com BRCA1 nos sítios de dano ao DNA. CDK9 interage com (A) BRCA1 e (B) BARD1 em modelos de produção proteica constitutiva em células humanas das linhagens HeLa e HEK293FT, respectivamente. Os ensaios de coimunoprecipitação foram realizados utilizando anticorpos anti-HA (IgG) ou anti-CDK9. A presença das proteínas coimunoprecipitadas foi identificada através de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-BRCA1, anti-BARD1 e anti-CDK9. (C e E) representação esquemática das construções usadas nas rotinas de GST pulldown. BF, BRCA1 *fragments*. Cc, coiled-coil. ANK, repetições de anquirina. NLS, sinal de localização nuclear. (D) Ensaios de GST pulldown. As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, em solução (controle de carregamento) ou ligadas à resina Sepharose 4B (GST pulldown) foram analisadas através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-GST e anti-FLAG. (F) O controle de carregamento das proteínas fusionadas ao GST (BARD1 cadeia completa, N- e C-terminais) produzidas em bactérias *E. coli*. Os ensaios de GST pulldown foram realizados com a proteína de fusão FLAG-CDK9 produzidas ectopicamente em células humanas da linhagem HEK293FT. O resultado dos ensaios foi avaliado através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-GST e anti-FLAG. Adaptado de NEPOMUCENO et al., 2017a.

A interação de CDK9 com BRCA1 e BARD1 foi demonstrada em células humanas, como mostra a **Figura 1.8**.

Nossos dados também indicaram que, apesar de identificada originalmente por interagir através dos domínios tBRCT de BRCA1 e BARD1, essas interações são mediadas pelas porções N- e C-terminais de ambas as proteínas (**Figura 1.8**). Também foi demonstrado que o recrutamento de CDK9 para os sítios de dano ocorre juntamente com BRCA1 (**Figura 1.9**). E, na ausência de CDK9, a cinética de resposta a danos ao DNA ocorre de forma alterada (**Figura 1.9**), observando-se uma significativa redução na formação de focos de BRCA1 (**Figura 1.9**). Essa deficiência se reflete na redução dos níveis de reparo por HR e em uma maior sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante (**Figura 1.10**).

Além disso, dados da literatura apontam para uma possível relação cinase-substrato entre os ortólogos de CHK2 e CDK9 em *Saccharomyces cerevisiae* (Rad53 e SGV1/BUR1, respectivamente) (BASTOSDEOLIVEIRA et al., 2015; SMOLKA et al., 2007). A possível associação de CDK9 como um putativo substrato de CHK2, conservada evolutivamente, bem como a identificação de novos parceiros no contexto de RDD, poderia explicar o papel de CDK9 no reparo por HR através do recrutamento de BRCA1, tendo em vista a relação previamente descrita entre CHK2 e BRCA1, bem como sugerir uma regulação do controle de parada do ciclo celular no contexto de RDD (CHABALIER-TASTE et al., 2008; ERTYCH et al., 2016; PARAMESWARAN et al., 2015; ZHANG et al., 2004).

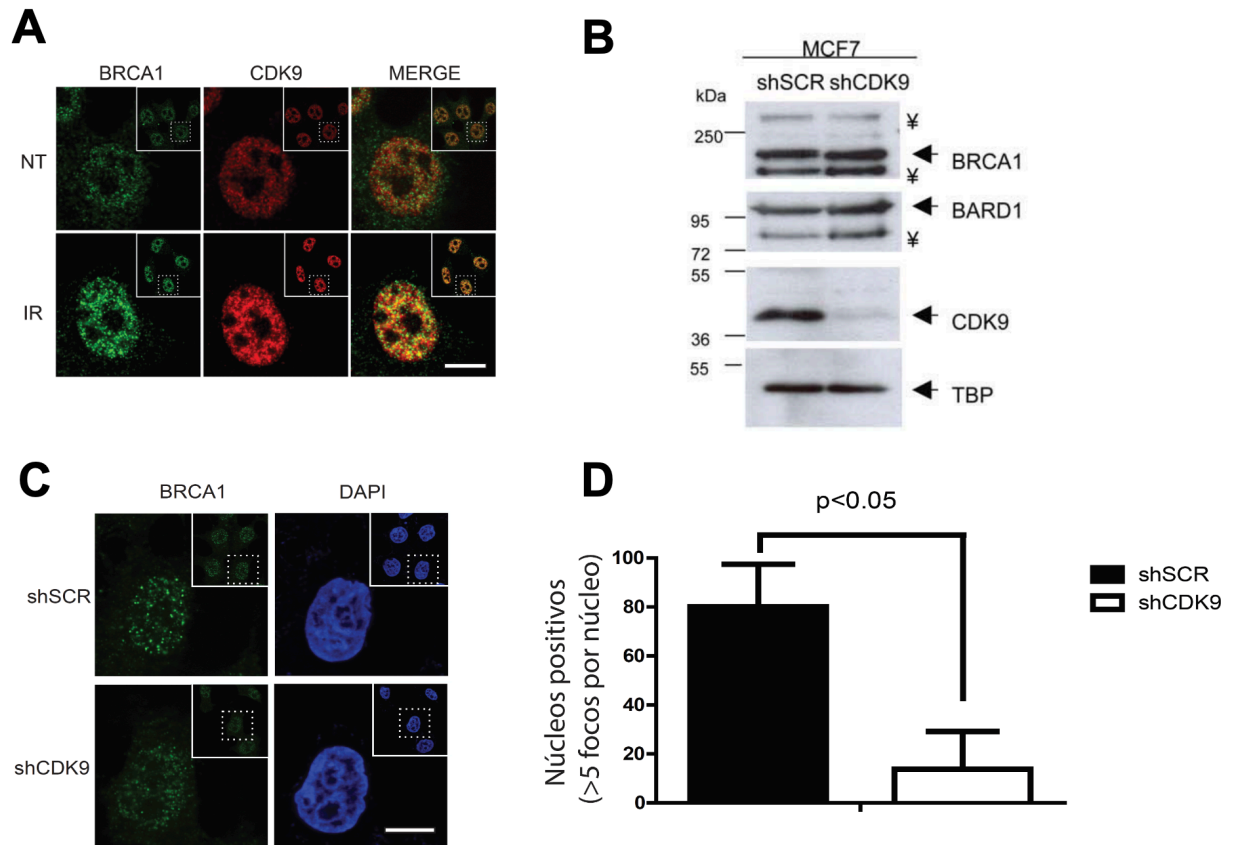


Figura 1.9 CDK9 modula o recrutamento de BRCA1 para os sítios de quebra de dupla fita. (A) Células humanas da linhagem MCF7 foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e a formação de focos de CDK9 e BRCA1 foi analisada três horas após o dano. As marcações foram realizadas usando anticorpos anti-BRCA1 e anti-CDK9. Escala = 10 μ m. (B) Os níveis de CDK9, BRCA1, BARD1 e TBP (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células MCF7 transduzidas com as construções shSCR (*scrambled*) ou shCDK9-1 por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-CDK9, anti-BRCA1, anti-BARD1 e anti-TBP. (C) A formação de focos de BRCA1 foi avaliada nas células MCF7 shSCR e shCDK9 três horas pós exposição à radiação ionizante (10Gy). As marcações foram realizadas usando anticorpos anti- γ H2AX, anti-BRCA1 e DAPI. (D) O gráfico representa a quantificação dos focos de BRCA1 através do *software* ImageJ. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste t de *student*. Escala = 10 μ m. Adaptado de NEPOMUCENO et al., 2017a.

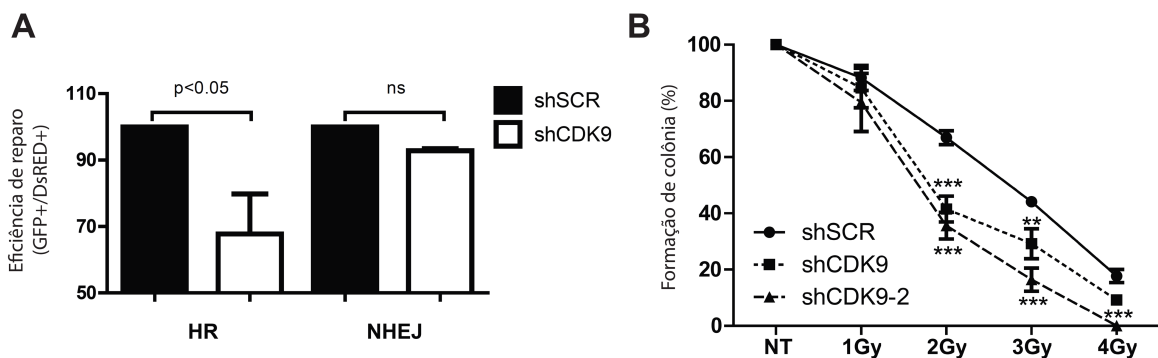


Figura 1.10 O silenciamento de CDK9 é acompanhado pela redução do reparo por recombinação homóloga e aumento da sensibilidade à radiação ionizante. (A) representação gráfica da eficiência de reparo por recombinação homóloga e não-homóloga por junção de pontas. Os dados demonstram a média \pm desvio padrão da razão GFP⁺/dsRED⁺, normalizados pelas células shSCR. A análise estatística foi realizada pelo teste t de *student*. **(B).** Representação gráfica da formação de colônias das células shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 mediante tratamento com diferentes doses de radiação ionizante. Os dados representam as médias \pm desvio padrão de triplicadas, normalizadas pelos respectivos controles. A análise estatística foi realizada pelo método, ANOVA bifatorial. **, $p < 0,01$. ***, $p < 0,001$
Adaptado de NEPOMUCENO et al., 2017a.

2. Objetivo

Caracterizar funcionalmente o papel de CDK9 na resposta a danos de DNA, em especial nas vias de reparo de quebras de dupla fita e controle do ciclo celular, através de sua relação com BRCA1 e CHK2.

3. Objetivos específicos

- Avaliar o papel de CDK9 no recrutamento de proteínas relacionadas ao reparo a danos no DNA para os sítios de quebra de dupla fita;
- Avaliar o impacto da ausência de CDK9 na sensibilidade à inibição de PARP;
- Caracterizar a formação do complexo CDK9/BRCA1/BARD1;
- Caracterizar o papel da interação CDK9/BRCA1 na função canônica de CDK9 (processamento transcricional);
- Caracterizar o papel da interação CDK9/BRCA1 no recrutamento de BRCA1;
- Confirmar a putativa interação entre CDK9 e CHK2;
- Caracterizar funcionalmente o papel da interação CDK9/CHK2;
- Avaliar funcionalmente o papel de CDK9 no controle de ciclo celular mediante danos ao DNA;
- Identificar proteínas de interação com CDK9 em contexto de danos ao DNA.

4. Materiais e métodos

4.1. Construções plasmidiais

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) (MULLIS et al., 1986), utilizadas nas rotinas de clonagem, foram realizadas utilizando a enzima DNA polimerase Pfx50 (Invitrogen, Califórnia, EUA), segundo recomendações do fabricante e usando oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados.

A sequência codificante referente a CDK9 (*Pubmed Accession Number*: NM_001261.3) foi amplificada tendo como molde de DNA a construção pCDNA3-CDK9 HA (FUJINAGA et al., 1998), adquirida do repositório de plasmídeos Addgene (Massachusetts, EUA). O produto amplificado foi clonado direcionalmente utilizando os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*, do vetor pCMV FLAG (Sigma Co., Missouri, EUA) mantendo o quadro de leitura do epítipo FLAG, gerando a construção pCMV FLAG-CDK9 (**Figura 4.1A**).

As construções pCDNA3-GAL4_{DBD}-CDK9-HA (**Figura 4.1B**) pGEX-CDK9-HA (**Figura 4.1C**), e pNTAP-CDK9-HA (**Figura 4.1D**) foram geradas através de rotinas de subclonagem a partir do vetor pCDNA3-CDK9-HA, utilizando os sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI* para retirada do inserto do vetor original e posterior clonagem nos sítios *EcoRI* e *Sall* nos vetores de destino.

A construção pEBG-CDK9-HA foi obtida por subclonagem do inserto clonado no vetor pGEX (pGEX-CDK9-HA), utilizando os sítios de restrição *BamHI* e *NotI* para posterior clonagem nos mesmos sítios, no vetor pEBG (**Figura 4.1A**)

A sequência codificante referente a CHK2 (*Pubmed Accession Number*: NM_007194.3) foi amplificada tendo como molde de DNA a construção pCMV-Myc CHK2, gentilmente cedida pelo Dr. A. Monteiro (FREEMAN; DAPIC; MONTEIRO, 2010). O produto amplificado foi clonado direcionalmente através dos sítios de restrição *KpnI* e *NotI* do vetor pEBG mantendo o quadro de leitura da proteína glutathione-S transferase (GST), gerando a construção pEBG-CHK2 (**Figura 4.1A**).

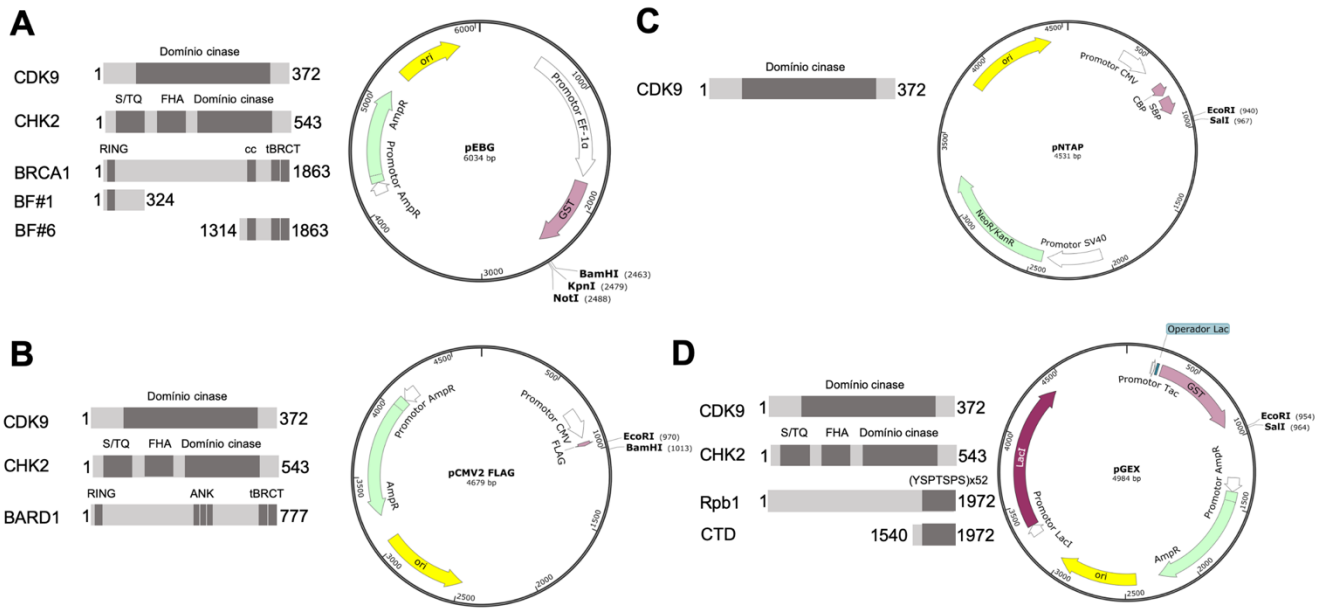


Figura 4.1 Representação esquemática das construções plasmidial utilizadas. Construções utilizadas para expressão ectópica em células de mamífero (**A**, **B** e **C**) e bactérias (**D**) e respectivos insertos. Destaque para as regiões reguladoras dos plasmídeos, sítios das enzimas de restrição utilizados nas rotinas de clonagem para geração das diferentes construções e domínios das diferentes proteínas codificadas pelos mesmos. Cc, Coiled-coil. FHA, Forkhead-associated domain; tBRCT, tandem BRCT.

A construção pGEX6P1-CHK2 foi gerada através de rotinas de subclonagem do inserto a partir do vetor pGBKT7-CHK2 (cDNA codificante de CHK2 em cadeia completa clonado no vetor de expressão em leveduras pGBKT7), gentilmente cedida pelo Dr. A. Monteiro, utilizando os sítios de restrição *EcoRI* e *Sall* para retirada do inserto do vetor original e posterior clonagem nos mesmos sítios no vetor de destino (**Figura 4.1C**).

A construção pHIV-LTR-Luc foi gerada por rotinas de subclonagem da região promotora a partir do vetor pG6 (5'pro) (TAUBE et al., 2002) adquirida do repositório de plasmídeos Addgene, utilizando os sítios de restrição *XhoI* e *BglII* para retirada do inserto do vetor original e posterior clonagem nos mesmos sítios no vetor de destino (pGL3-Basic).

As construções pEBG-BRCA1 (BF#1 e BF#6) (**Figura 4.1C**), pGEX-CTD (**Figura 4.1C**) e pYFP-FLAG-BARD1 (**Figura 4.1B**) foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. Monteiro, Dr. D Cress e Dr. B Handerson, respectivamente (MA et al., 2010; MARZEC et al., 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**).

As rotinas de mutagênese sítio dirigida foram realizadas utilizando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade PrimeSTAR™ (Takara, Califórnia, EUA) segundo recomendações do fabricante, como descrito em (FERNANDES et al., 2019; LAIBLE; BOONROD, 2009). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão apresentados no **quadro 4.1**

Todas as construções geradas foram confirmadas através de rotinas de sequenciamento automático utilizando-se o kit *BigDye Terminator* (Life Technologies, Califórnia, EUA), segundo instruções do fabricante. A análise dos produtos da rotina de sequenciamento foi conduzida em colaboração com a Divisão de Genética do Centro de Pesquisa do INCA.

Quadro 4.1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados

CDK9 E369A senso	5'	CCACCAACCAGACGGAGTTTGCGCGCGTCTTCT	3'
CDK9 E369A antissenso	5'	AAACTCCGTCTGGTTGGTGGTGGCGGGATT	3'
BRCA1 L1664P senso	5'	ACCCAGTCCGAATTTATGCCCGTGTACAAG	3'
BRCA1 L1664P antissenso	5'	CCTTGTACACGGGCATAAATTCGGACTGGGGT	3'
BRCA1 A1830T senso	5'	TGCAATTGGGCAGATGTGTGAGACACCTGTGGTG	3'
BRCA1 A1830T antissenso	5'	CACCACAGGTGTCTCACACATCTGCCCAATTGCA	3'
BARD1 L44P senso	5'	GTCGCGCCGCGCTCGACCGCCCCGAGAAGCTGC	3'
BARD1 L44P antissenso	5'	TGGGCCACAGTCGCGCCGCGCTCGACCGC	3'

4.2. Cultivo de bactérias

Foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli* nas rotinas de transformação. A cepa DH5 α (genótipo: fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 ϕ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) foi utilizada nas rotinas de clonagem de todas as construções citadas na **seção 4.1**. A cepa BL21 (DH3) (genótipo: F $^-$ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) foi utilizada nas rotinas de produção proteica condicional, descritas na **seção 4.3**.

O preparo de bactérias eletrocompetentes foi adaptado do procedimento descrito por Wirth e colaboradores (WIRTH; FRIESENEGGER; FIEDLER, 1989). Resumidamente, as transformações foram realizadas por incubação das bactérias eletrocompetentes com o DNA plasmidial e posterior eletroporação com um pulso de 1,8 kV no eletroporador modelo Micropulser™ (Bio-Rad Laboratories, California, EUA) em cubetas de 0,1 cm. As bactérias foram, então, recuperadas em meio LB e plaqueadas em meio LB sólido (ágar 4% p/v; Sigma Co.) suplementado com antibióticos de acordo com o cassete de resistência presente no plasmídeo utilizado (ampicilina 50 μ g/mL ou canamicina 30 μ g/mL; ambos Sigma Co.).

A extração do DNA plasmidial foi conduzida segundo adaptação do método de lise alcalina como descrito previamente (ENGBRECHT; BRENT; KADERBHAI, 1991). Alternativamente, quando para uso em rotinas de transfecção de células humanas os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo orientações do fabricante.

4.3. Produção proteica condicional em bactérias

A produção condicional e extração das proteínas de fusão em bactérias foi realizada como descrito em NEPOMUCENO, T. *et al.*, 2017b (**Anexo I**). Resumidamente, a indução da expressão condicional foi realizada com 0,5 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo – Sigma Co.) à 30°C por 4 horas. As células tratadas foram recolhidas em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,5, lisozima à 1 mg/mL, DNase à 1 μ g/mL e Triton X100 à 0,1% v/v- todas Sigma Co.) e mantidas à 37°C por 1 hora e posteriormente sonicadas (modelo *Autotune Series High Intensity Ultrasonic processor* -

100/130W, *Sonics & Materials*, Connecticut, EUA). O material sonicado foi centrifugado a 16.000 xg por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante recuperado foi armazenado à -80°C.

A concentração de proteína total foi determinada através de ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.4. Culturas de células humanas

As células humanas das linhagens HCT116 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*), HEK293FT (Invitrogen) e MCF7 (HTB-22, ATCC, Virginia, EUA), gentilmente cedidas pelo Dr. A. Monteiro. As células HCT116 foram cultivadas em meio McCoy's 5A e as células HEK293FT e MCF7 em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Co.) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Califórnia, EUA) e antibióticos penicilina e estreptomicina (100.000 U/L e 100 mg/L, respectivamente; ambas Invitrogen) a 37°C em atmosfera de 5% v/v de CO₂.

4.5. Transfecção de células humanas

A transfecção de células humanas da linhagem HEK293FT, MCF7 e HCT116 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*) com construções plasmidiais foram conduzidas utilizando o reagente polietilenimina 1 µg/µL (PEI) (Polysciences Inc, Pennsylvania, EUA) como descrito por (LONGO et al., 2013). As transfecções seguiram a proporção de 3 µL de PEI para cada 1 µg de DNA e 10 volumes de meio de cultura sem soro. Após 3 horas de incubação, o meio de cultivo foi substituído e as células mantidas em cultura por 24 horas para protocolos de extração proteica (**seção 4.6**) e 48 horas para análise da transativação transcricional mediada por CDK9 (**seção 4.15**)

4.6. Extração de proteínas de células humanas

Para obtenção de extratos de proteínas totais, células humanas em cultura foram recolhidas após dissociação enzimática com solução de tripsina 0,25% p/v e EDTA 0,01% p/v (ambos Sigma Co.). As células recolhidas foram ressuspensas em tampão de lise *Mild*-RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM e NP40 1% v/v) suplementado com coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma Co.). Os produtos lisados foram incubados por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida,

centrifugados a 16.000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80°C.

Os extratos nucleares foram obtidos através da ressuspensão das células dissociadas em tampão de extração da fração citoplasmática (HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e NP40 0,2% v/v). Os lisados foram incubados por 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados a 1000 xg por 5 minutos em microcentrífuga. O produto de sedimentação foi resuspenso em tampão de extração nuclear (Tris 20 mM pH7,4, glicerol 20% v/v, KCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 0,625 mM) suplementado com solução de inibidores de protease. Os lisados foram incubados por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados a 10000 xg por 10 minutos em microcentrífuga refrigerada. O sobrenadante (extrato nuclear) foi recolhido e armazenado a -80°C.

A concentração de proteína total foi determinada através de ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.7. Ensaios de interação proteína-proteína

4.7.1. (Co)imunoprecipitação de proteínas

Rotinas de coimunoprecipitação foram conduzidas utilizando-se os extratos proteicos obtidos conforme descrito na **seção 4.6**. Resumidamente, os extratos foram incubados com resina de agarose Protein A/G PLUS Agarose (GE Healthcare Lifesciences, Winsconsin, EUA) e o anticorpos primário de interesse (**Quadro 4.2**), conforme orientação do fabricante, em tampão *Mild*-RIPA por 16 horas a 4°C sob agitação. A resina, associada aos complexos proteicos, foi lavada 3 vezes com *Mild*-RIPA por 10 minutos a 4°C, seguido de centrifugação a 1.000 xg por 5 minutos. Por fim, a resina foi ressuspensa em tampão de amostra (Tris-Cl 125mM pH 6,8, glicerol 30% v/v, SDS 4% p/v, 1,4-ditiotreitol 10% v/v, azul de bromofenol 0,004% p/v) e incubadas a 95°C por 5 minutos e submetida a rotinas de *immunoblotting*, conforme descrito na **seção 4.8**.

4.7.2. GST pulldown

Para o ensaio de GST *pulldown*, foi utilizada a resina *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, a resina foi lavada

com *Mild*-RIPA suplementado com DTT (1,4-ditiotreitol) 2,5 mM (Sigma Co.). Foi utilizado 1 mg de extrato proteico total (**seções 4.3 e 4.6**) em *Mild*-RIPA suplementado com DTT e coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma Co.). As suspensões foram incubadas à 4°C por 16 horas. Posteriormente, o material foi lavado três vezes com *Mild*-RIPA suplementado com DTT e coquetel de inibidores de protease. O material ligado à resina foi analisado por *immunoblotting* valendo-se de anticorpos anti-GST e anti-FLAG e/ou anti-HA conforme descrito na **seção 4.8**.

4.8. Immunoblotting

Os produtos obtidos nas **seções 4.3, 4.6 e 4.7**, foram diluídos em tampão de amostra (Tris-Cl 125mM pH 6,8, glicerol 30% v/v, SDS 4% p/v, 1,4-ditiotreitol 10% v/v, azul de bromofenol 0,004% p/v) e incubados a 95°C por 5 minutos.

As amostras foram analisadas por rotinas de SDS-PAGE em concentrações variáveis da matriz de poliacrilamida (de 6 a 10% p/v; Sigma Co.). Após a resolução, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF; Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), usando o sistema Trans-Blot Semidry (BIO-RAD Laboratories). Concluída a transferência as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado ou BSA (albumina sérica bovina; Sigma Co.) 5% p/v em TBS-T (*Tris-Buffered Saline*: Tris base 50 mM, NaCl 150 mM; suplementado com 0,1% v/v de Tween 20; Sigma Co.), por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários e secundários apropriados (**Quadro 4.2**) diluídos em TBS-T suplementado com leite desnatado ou BSA 0,5% p/v, conforme orientação do fabricante. As incubações foram intercaladas por 3 lavagens com TBS-T. O imunocomplexo foi revelado com o kit Amersham ECL *Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences, little chalfont, Reino Unido) mediante exposição ao filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

Quadro 4.2 Lista dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Fabricante	Código
anti-CDK9	<i>Bethyl Laboratories</i>	A303-493A
anti-CDK9 (Figuras 5.5 e 5.7A)	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	C20
anti-CHK2	<i>Merk Millipore</i>	05.649
anti-CHK2 (Figura 5.6.2A)	<i>Abcam</i>	AB47433
anti-HA	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	sc-805
anti-FLAG M2	<i>Sigma Aldrich</i>	F-1804
anti-GST	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	sc-138
anti-RAD51	<i>Thermo Fisher</i>	3C10
anti- β -actina	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	sc-47778
anti-53BP1	<i>Bethyl Laboratories</i>	A300-272A
anti-BRCA1 (imunofluorescencia)	<i>Merk Millipore</i>	SD118
anti-BRCA1 (<i>immunoblotting</i>)	<i>Merk Millipore</i>	MS110
anti-fosfoCDK9 (Thr186)	<i>Cell Signaling technology</i>	2549
anti-PCNA	<i>Cell Signaling technology</i>	D3H8P
anti-fosfoCTD (Ser2)	<i>Abcam</i>	A300-654A-1
anti-GAL4 DBD	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	sc-510
anti-fosfoCHK2 (Thr68)	<i>Cell Signaling technology</i>	C13C1
anti-PLK1	<i>Cell Signaling technology</i>	208G4
anti-Wee1	<i>Cell Signaling technology</i>	D10D2
anti-Mouse-HRP	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	SC-2005
anti-Rabbit-HRP	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>	SC-2301
anti-Mouse-Alexa 488	<i>Life Technologies</i>	A-11008
anti-Mouse-Alexa 546	<i>Life Technologies</i>	A-11035

4.9. Silenciamento da expressão gênica de CDK9

Partículas lentivirais encerrando as construções pLKO.1 shCDK9-1 e pLKO.1 shCDK9-2 (TRC00000494 e TRC00000497, respectivamente; Openbiosystems, Louisiana, EUA) contendo a sequência codificante para RNA do tipo *short hairpin* (shRNA) de reconhecimento do transcrito de CDK9 ou pLKO1 shSCR (*Scrambled* – RHS6848; Openbiosystems) encerrando uma sequência codificante para shRNA de reconhecimento de sequência não relacionada (utilizada como controle negativo) foram geradas através de transfecção de células HEK293FT conforme descrito na **seção 4.5**. Nas rotinas de transfecção foram utilizadas misturas contendo as construções em pLKO.1, em conjunto com as construções pLP1, pLP2 e pLP/VSVG do kit de produção de partículas lentivirais Virapower (Invitrogen).

Após 48 horas da transfecção, o meio de cultura contendo as partículas virais foi recolhido e imediatamente suplementado com brometo de hexadimetrina (Polybrene®, Sigma) 6µg/ml. A suspensão foi utilizada na transdução de células MCF7 ou HCT116 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*). As células transduzidas foram selecionadas com 2 µg/mL de puromicina (Invitrogen) por 5 dias. Os níveis proteicos de CDK9 nas linhagens transduzidas foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* como descrito na **seção 4.8**.

4.10. Análise de imunofluorescência por microscopia confocal

Foram plaqueadas 30.000 células das linhagens MCF7 shSCR, MCF7 shCDK9-1 e MCF7 shCDK9-2 sobre lamínulas de vidro em placas de cultivo de 1,9 cm² de área. Após incubação por 24 horas em condições padrão de cultura, como descrito na **seção 4.4**, as células foram submetidas ou não à radiação ionizante (10 Gy) (X-RAD 320, Precision X-ray, Connecticut, EUA). As células foram recuperadas em diferentes intervalos de tempo para análise.

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% v/v em solução salina PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4; todos reagentes Sigma Co). A permeabilização foi realizada utilizando solução de Triton-X100 0,5% v/v em PBS (todos reagentes Sigma Co.) e o bloqueio foi realizado com solução de BSA 5% p/v em PBS (Sigma Co.). A solução de bloqueio foi removida e substituída por solução de BSA 1% p/v em PBS contendo anticorpo primário específico e, posteriormente,

substituído pelo anticorpo secundário apropriado conforme orientações dos fabricantes (**Quadro 4.2**). As incubações foram intercaladas por 3 lavagens com PBS. As lâminas foram então preparadas com meio de montagem contendo o corante DAPI (Prolong Gold, Invitrogen), segundo instruções do fabricante. As rotinas de marcação para 53BP1 e RAD51 apresentaram uma etapa adicional de extração pré-fixação com solução de lavagem (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7.4, sacarose 300 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM; todos reagentes Sigma Co.) por 2 minutos à 4°C.

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (modelo Fluoview FV10i – Olympus, Tóquio, Japão), as imagens foram processadas e os focos quantificados utilizando-se o programa ImageJ (*National Institute of Health, Maryland, EUA*).

4.11. Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 100.000 células das linhagens HCT116 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 em placas de 57 cm² de área. Após incubação por 24 horas em condições padrão de cultura, como descrito na **seção 4.4**, as células foram expostas a radiação ionizante (6 Gy). As células foram recolhidas 12 e 24 horas após o tratamento, e fixadas em etanol gelado 70% v/v (Merck, Darmstadr, Alemanha) por pelo menos 24 horas. As células foram, então, lavadas com BSA 1% p/v em PBS e incubadas por 16 horas em solução 30 µg/mL de iodeto de propídeo (Life Technologies) na presença 100 µg/mL de RNase A (Sigma Co.) e por fim analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD, Nova Jersey, EUA). A análises do perfil populacional nas diferentes fases do ciclo celular foi realizado através do *software* ModFit LT™

4.12. Ensaio de viabilidade celular

Foram plaqueadas 10.000 células das linhagens HCT116 (*wt* ou *CHEK2^{-/-}*) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 em placas de Petri de 9,5 cm² de área. Após incubação por 24 horas em condições padrão de cultura, como descrito na **seção 4.4**, as células foram expostas à radiação ionizante (1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy, ou 5 Gy) ou 2,5µM de inibidor de PARP (olaparib ou rucaparib). As placas foram mantidas em cultura por 7 dias. Após este período as células foram coradas com solução de cristal violeta (Sigma Co.) 1% p/v em metanol (Merck) por 30 minutos. A descoloração foi feita com sucessivas

lavagens com água. Após secagem, o corante foi eluído em solução de ácido acético 10% v/v e analisadas por espectrofotometria à 570nm.

4.13. Ensaio de formação de colônias

Foram plaqueadas 100 células das linhagens MCF7 shSCR e shCDK9-1 em placas de Petri de 9,5cm² de área. Após incubação por 24 hora sem condições padrão de cultura, como descrito na **seção 4.4**, as células foram expostas à diferentes doses olaparib (0,625µM, 1,25µM, 2,5µM ou 5 µM). As placas foram mantidas em cultura, na presença do inibidor, por 14 dias. Após este período as placas tiveram seus meios removidos e lavadas com solução salina PBS e, posteriormente, as células foram coradas com solução de cristal violeta (Sigma Aldrich) 1% p/v em metanol (Sigma Aldrich) por 30 minutos. A descoloração foi feita com sucessivas lavagens com água. As colônias celulares com mais de 20 células foram quantificadas por microscopia ótica de contraste de fase.

4.14. Ensaio de fosforilação *in vitro*

Os ensaios de fosforilação *in vitro* foram realizados na presença ou ausência de ATP radioativo (γ -³²P). A produção e purificação das cinases efetoras foi realizada através da transfecção de células humanas da linhagem HEK293FT e de rotinas de imunoprecipitação, como descrito nas **seções 4.5 e 4.7.1**, respectivamente. A obtenção dos respectivos substratos foi realizada mediante expressão condicional em bactérias *Escherichia coli*, seguida da purificação através de rotinas de GST *pulldown*, como descrito anteriormente nas **seções 4.3 e 4.7.2**, respectivamente.

As proteínas purificadas foram incubadas na proporção de 1:10 (cinase-substrato) em tampão cinase (TrisCl 25 mM, pH 7,4, DTT 2 mM, MgCl₂ 10mM e ATP 50µM) por 30 minutos à 30°C. As rotinas baseadas em radiodeteção foram realizadas através da suplementação do tampão cinase com 15µCi de ATP radioativo (γ -³²P). As reações foram interrompidas através da adição de tampão de amostra e incubação a 95°C por 5 minutos. Os produtos radioativos foram resolvidos através de rotinas de SDS-PAGE, seguida por secagem do gel e exposição a filme autorradiográfico por pelo menos 16 horas. As reações conduzidas na ausência de ATP radioativo foram analisadas através

de rotinas de *immunoblotting*, como descrito na **seção 4.8**, utilizando anticorpos anti-GST e anti-fosfoCTD.

4.15. Ensaio de transativação transcricional

Foram plaqueadas 1.000 células das linhagens HCT116 (*wt* ou *CHEK2^{-/-}*) ou HEK293FT por poço de placa de 96 poços. Após incubação por 24 horas em condições padrão de cultura, as células foram transfectadas, como descrito na **seção 4.4**, com as construções pHIV-LTR-LUC, phGRTK e pCDNA3-GAL4_{DBD}-CDK9-HA (*wt* ou E369A) como descrito na **seção 4.5**. A capacidade de transativação transcricional da proteína quimérica GAL4_{DBD}-CDK9-HA foi determinada 48 horas após transfecção pela razão da atividade do sistema repórter (Luciferase de *Photinus pyralis*) e do controle interno (Luciferase de *Renilla reniformis*). A quantificação da atividade de luciferase foi obtida através do *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

4.16. Purificação de proteínas por afinidade sequencial seguida por espectrometria de massas (*Tandem Affinity Purification, TAP-MS*)

Células HEK293FT foram transfectadas, conforme descrito na **seção 4.5**, com as construções pNTAP-CDK9-HA ou pNTAP-GFP como controle não relacionado. As células foram expostas, 24 horas pós-transfecção, à radiação ionizante (10Gy) e, depois de 3 horas, foram recuperadas e lisadas utilizando Tampão NETN (Nonidet P40 0,5% v/v, Tris pH8,0 20 mM, NaCl 50 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100 mM, DTT 1mM, PMSF 50 µg/ml; todos reagentes Sigma Co.) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Sigma Co.). A purificação por afinidade sequencial, utilizando o kit *Interplay Mammalian TAP System* (Stratagene, Califórnia, EUA), foi realizada segundo instruções do fabricante. O produto obtido foi analisado em espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF Instrument 4700 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) para identificação de putativas proteínas de interação com CDK9. As purificações e análises de espectrometria de massas foram conduzidas em colaboração com o laboratório do Dr. A. Monteiro e com o núcleo de proteômica do H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute na Flórida, EUA. Foram consideradas interações positivas somente as proteínas referentes aos peptídeos identificados exclusivamente através da interação com CDK9.

4.17. Análise de rede de *interação in silico*

A identificação de parceiras de interação de BRCA1 e CHK2 foi realizada através da ferramenta Bisogenet (MARTIN et al., 2010), através do *software Cytoscape* v3.7.1 tendo como parâmetros de análise apenas os dados públicos do banco de dados *BioGrid* (disponível através do sítio <http://thebiogrid.org>) (OUGHTRED et al., 2019). A elaboração da rede considerou apenas as proteínas de interação de BRCA1 e/ou CHK2, sem interações secundárias entre os alvos identificados e/ou seus parceiros. A identificação das parceiras de interação comuns a CDK9 foi realizada através de curadoria manual dos dados disponíveis no banco de dados *BioGrid*.

4.18. Enriquecimento de vias biológicas *in silico*

A identificação das vias biológicas enriquecidas pelos putativos parceiros de interação de CDK9 no contexto de resposta a danos de DNA, ou de BRCA1 e/ou CHK2, foi realizada através do *software WebGestalt* (disponível no sítio <http://webgestalt.org>) com os parâmetros básicos disponibilizados pelo *software*. Somente os resultados estatisticamente significativos (**Seção 4.20**) foram considerados positivos.

4.19. Alinhamento *in silico*

O alinhamento múltiplo de CDK9 foi realizado através da submissão das sequências proteicas dos diferentes ortólogos (obtidos através do sítio www.ncbi.nlm.nih.gov) ao *software Clustal Omega*, (disponível através do sítio www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

4.20. Análises estatísticas

Todos os dados foram apresentados como a média de valores e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através do teste t de *student*; ANOVA monofatorial e bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni (realizado no programa Graphpad Prism v.5.0[®]; Graphpad, Califórnia, EUA). Foram considerados significativamente diferentes valores com probabilidade de hipótese nula (p) menores que 0,05.

5. Resultados

5.1. Análise do recrutamento de 53BP1 e RAD51 aos sítios de dano ao DNA na ausência de CDK9

Nossos dados prévios demonstraram que o recrutamento de BRCA1 para os sítios de quebra de dupla fita (Double Strand Breaks – DSBs) do DNA é dependente de CDK9 e que, por consequência, gera um fenótipo de deficiência no reparo por HR (NEPOMUCENO, 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Tendo em vista que o direcionamento do reparo de DSBs via HR ou NHEJ se baseia, mecanisticamente, na dicotomia de recrutamento entre BRCA1 e 53BP1 para os sítios de dano ao DNA (DALEY; SUNG, 2014), avaliamos o papel de CDK9 na formação de focos de 53BP1.

Células humanas da linhagem MCF7, previamente transduzidas com partículas virais encerrando sequência codificante do shRNA para interferência na expressão gênica de *CDK9* e controle *scramble* (MCF7 shCDK9-1 e shSCR, respectivamente - NEPOMUCENO, 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**) (**Figura 1.9B; página 23**) foram avaliadas quanto ao recrutamento de 53BP1, 3 horas após o tratamento com radiação ionizante (10 Gy).

Diferente do que foi observado para BRCA1, as células interferidas para *CDK9* não apresentam alteração na formação de focos de 53BP1, quando comparadas ao controle (**Figura 5.1A e B**) (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Corroborando o papel de CDK9 no controle do reparo por HR, mas não via NHEJ (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**).

Uma vez que a células se compromete com o reparo por HR, mediante ressecção da fita lesionada, BRCA1 estimula o recrutamento da recombinase efetora RAD51, através da ação do complexo BRCA1/PALB2/BRCA2. Em seguida, RAD51 promove a invasão da cromátide irmã para que ocorra o reparo de forma fiel, mantendo a integridade do genoma (NEPOMUCENO et al., 2017b). Tendo em vista nossos dados prévios (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**), bem como a função de RAD51 no reparo por HR, avaliamos o papel de CDK9 no recrutamento de RAD51 para os sítios de DSBs.

As células MCF7 shCDK9-1 e shSCR foram analisadas quanto a capacidade de formação de focos de RAD51, 5 horas após o tratamento com radiação ionizante (10 Gy).

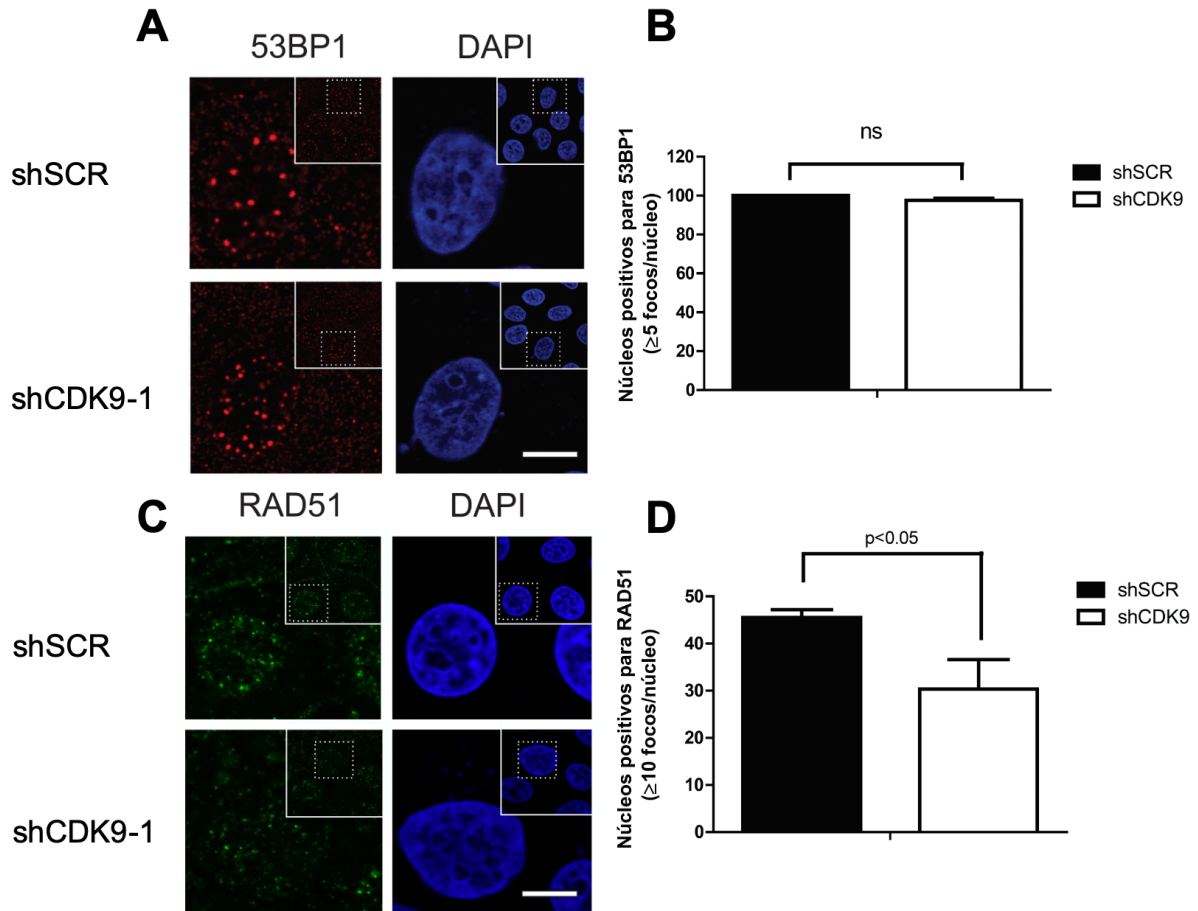


Figura 5.1. CDK9 modula o recrutamento de RAD51, mas não de 53BP1, aos sítios de dano ao DNA. Células MCF7 shSCR e shCDK9-1 foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e a formação de focos de (A) 53BP1 e (C) RAD51, analisada três e cinco horas após o dano, respectivamente. As marcações foram realizadas usando anticorpos anti-53BP1, anti-RAD51 e DAPI. Os gráficos representam a quantificação dos focos de (B) 53BP1 e (D) RAD51 através do *software* ImageJ. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste t de *student*. Escala = 10µm. n=3

Os resultados demonstram que na ausência de CDK9 o recrutamento de RAD51 aos sítios de dano ao DNA ocorre de forma deficiente, com a redução significativa de dos núcleos com mais de 10 *foci* nas células MCF7 shCDK9-1($\cong 35\%$), quando comparadas ao controle (**Figura 5.1C e D**) (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**).

Nossos resultados sugerem que o recrutamento de proteínas relacionadas ao reparo por HR (BRCA1 e RAD51) mas não NHEJ (53BP1) é, em diferentes extensões, dependente de CDK9. Corroborando nossos dados prévios de redução da eficiência do reparo por HR na ausência de CDK9 (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**).

5.2. Avaliação do papel de CDK9 na sensibilidade à inibição de PARP

O fenótipo de letalidade sintética relacionado ao tratamento com inibidores de PARP (iPARP) em modelos *in vitro* e *in vivo* (inclusive na clínica médica) está associado ao comprometimento da RDD vinculada à HR, em especial quando da deficiência em BRCA1, BRCA2, PALB2 ou ATM (BRYANT et al., 2005; EVERS et al., 2010; FARMER et al., 2005; FONG et al., 2009; HORAK et al., 2019; ROTTENBERG et al., 2008).

A deficiência no reparo de danos no DNA nas células interferidas para *CDK9* resulta na redução da resistência ao tratamento com radiação ionizante (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Considerando o papel de CDK9 no reparo por HR, bem como o fenótipo de letalidade sintética mencionado, avaliamos o impacto da ausência de CDK9 no tratamento de células MCF7 com o iPARP, olaparib, através de ensaios formação de colônias. As células MCF7 shSCR e shCDK9-1 foram tratadas com diferentes doses de olaparib (0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M) e tiveram o número de colônias quantificado após 14 dias em cultura (**Figura 5.2A e B**).

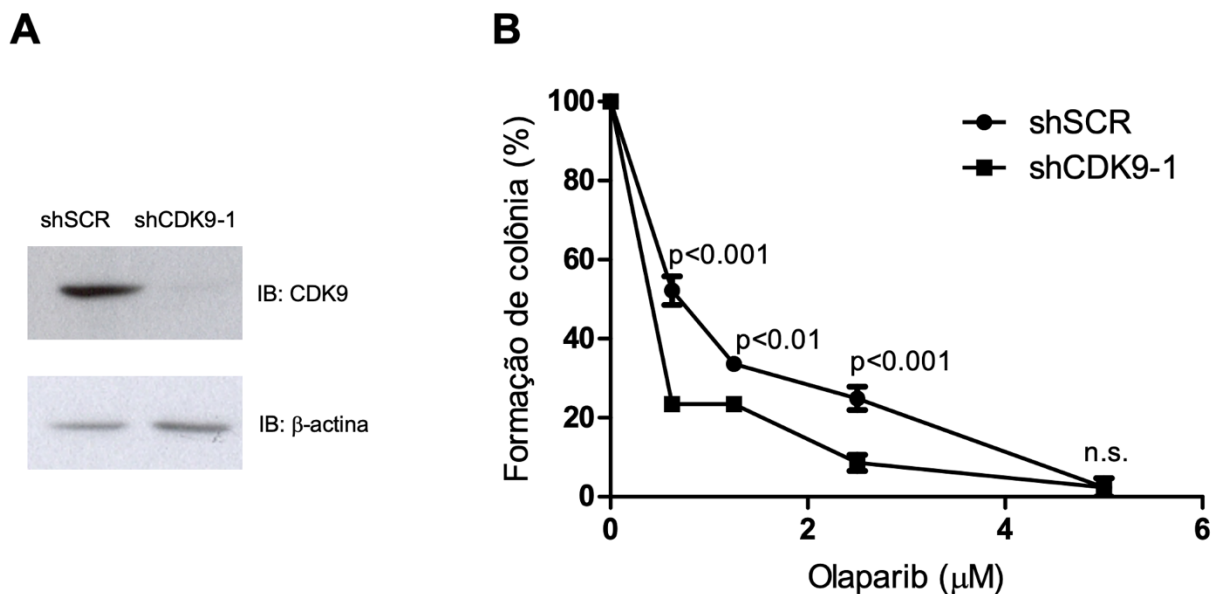


Figura 5.2. A redução dos níveis de CDK9 gera um fenótipo de sensibilidade à inibição de PARP. (A) Os níveis de CDK9 e β -actina (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células MCF7 transduzidas com as construções shSCR (*scrambled*) ou shCDK9-1 por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-CDK9 e anti- β -actina. (B) As células MCF7 shSCR e shCDK9-1 foram plaqueadas em baixa densidade (100 células por 9.5cm²) e expostas a diferentes doses de olaparib (0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M). Após 14 dias em cultura, as células foram coradas com cristal violeta e as colônias com mais de 20 células foram quantificadas. Os dados representam as médias \pm desvio padrão de triplicadas, normalizadas pelos respectivos controles. A análise estatística foi realizada pelo método, ANOVA bifatorial. *n*=3

Os resultados demonstram que a ausência de CDK9 nas células MCF7 resulta na redução da capacidade de formação de colônias após tratamento com 2,5 μ M de olaparib (\cong 65%) quando comparadas com o controle (**Figura 5.2B**). Esse comportamento também é observado nas doses de 1,25 μ M e 0,65 μ M de olaparib, resultando na redução de \cong 30% e \cong 55%, respectivamente. Na dose de 5 μ M, ambas as linhagens exibiram o mesmo perfil de sensibilidade, com redução de \cong 97% do número de colônias observado na situação controle. Esses dados corroboram o papel de CDK9 no reparo por HR, através do recrutamento de BRCA1 e RAD51 para os sítios de dano ao DNA.

5.3. Caracterização estrutural da interação entre CDK9, BRCA1 e BARD1

BRCA1 desempenha suas funções na via de RDD atuando como uma plataforma de coordenação para diferentes complexos proteicos, em diferentes momentos da resposta (SAVAGE, K. e HARKIN, D., 2015). Dentre os complexos formados através de seu domínio tBRCT, destacam-se três: o complexo BRCA1-A (mediado pela interação de BRCA1 com ABRAXAS), BRCA1-B (mediado pela interação com BACH1), BRCA1-C (mediado pela interação com CtIP) (LI, M. e GREENBERG, R., 2012). De forma geral, a formação destes complexos ocorre através do reconhecimento de regiões fosforiladas que respeitam a sequência consenso *pSer-X-X-Phe* pelo domínio tBRCT (FENG; HUANG; CHEN, 2009; WANG et al., 2007).

A região C-terminal de CDK9 encerra quatro resíduos de aminoácido (*Glu₃₆₉-Arg₃₇₀-Val₃₇₁-Phe₃₇₂*) que mimetizam o motivo consenso de reconhecimento pelo domínio tBRCT de BRCA1, sendo que o resíduo de serina fosforilado é substituído por um resíduo de ácido glutâmico. Essa sequência apresenta moderada conservação entre diferentes espécies (**Figura 5.3.1A**). Uma vez que a região C-terminal de CDK9 (do resíduo de aminoácido na posição 207 ao 372) foi originalmente identificada por interagir com o domínio tBRCT de BRCA1 (WOODS et al., 2012), avaliamos o impacto da substituição do resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de alanina na posição 369 da sequência proteica primária de CDK9 (CDK9_{E369A}) (**Figura 5.3.1B e C**)

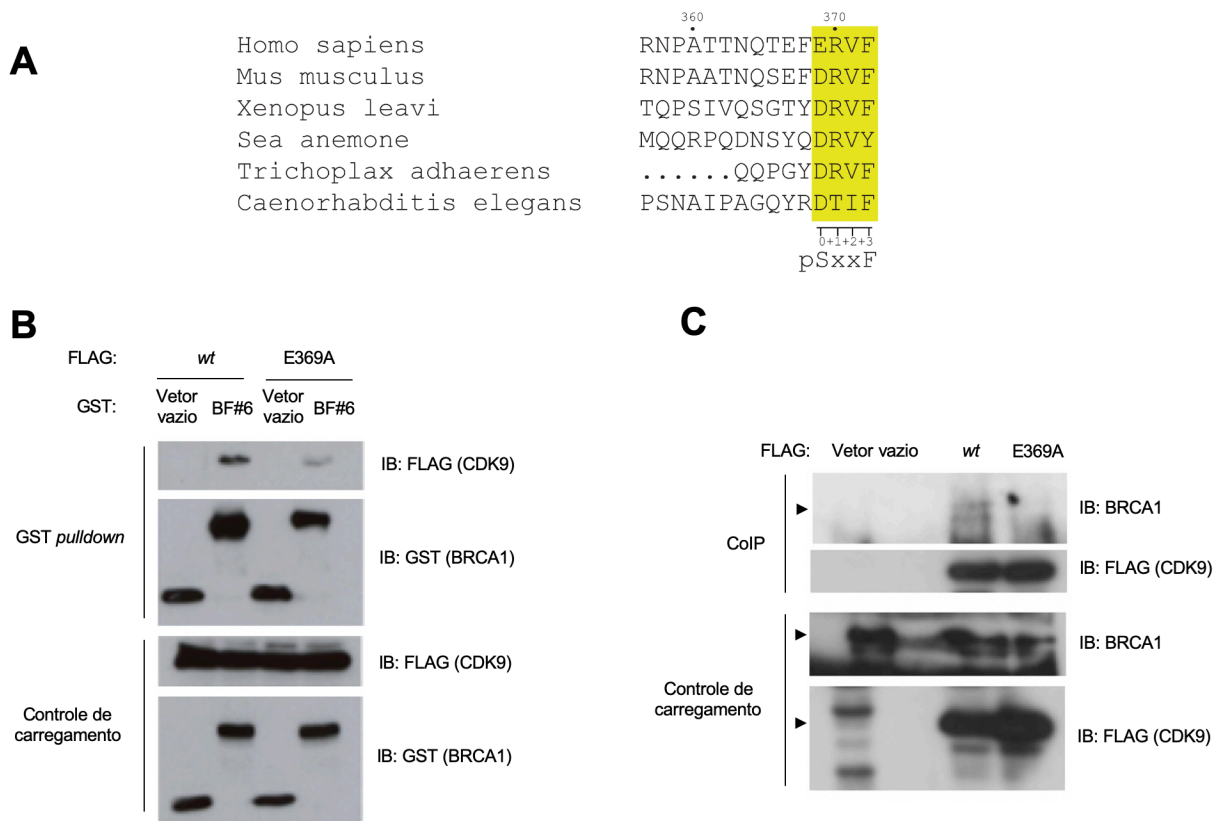


Figura 5.3.1. Caracterização do mutante E369A de CDK9. (A) Alinhamento da região C-terminal (região compreendida entre os resíduos de aminoácido 357 e 372) dos diferentes ortólogos de CDK9. Destaque para a conservação dos quatro últimos resíduos de aminoácidos (em amarelo) e comparação com o motivo consenso de reconhecimento pelo tBRCT de BRCA1 (pS-x-x-F). (B) Ensaio de GST pulldown tendo como isca a porção C-terminal de BRCA1 (região compreendida entre os resíduos de aminoácidos na posição 1314 ao 1863) fusionada ao GST (BF#6), e como presas as proteínas de fusão FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A). As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, solúveis (controle de carregamento) e ligadas à resina Sepharose 4B® (pulldown) foram avaliadas através de rotinas de immunoblotting com anticorpos anti-FLAG e anti-GST. *n*=3 (C) Ensaio de coimunoprecipitação (CoIP) tendo como isca as proteínas de fusão FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A), e como presa BRCA1 constitutivamente expressa em células HEK293FT. As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, solúveis (controle de carregamento) e ligadas à resina A/G plus (CoIP) foram avaliadas através de rotinas de immunoblotting com anticorpos anti-FLAG e anti-BRCA1. As cabeças de setas indicam as bandas na altura esperada. *n*=3

Células humanas da linhagem HEK293FT foram cotransfectadas com as construções pEBG-BF#6 (encerrando os resíduos de aminoácido da posição 1314 ao 1863 de BRCA1, fusionados ao GST) ou controle (vetor vazio), e pFLAG CDK9 selvagem (*wild-type* - *wt*) ou E369A. Os extratos contendo as proteínas de fusão GST-BF#6 ou GST, e FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A) foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-GST e anti-FLAG (**Figura 5.3.1B – Painel da esquerda**).

A capacidade de BRCA1 interagir com ambas as formas de CDK9 foi avaliada através de ensaios de GST *pulldown* (**Figura 5.3.1B**). Nossos resultados sugerem que a interação entre CDK9 e a região C-terminal de BRCA1 ocorre, em grande parte, de forma dependente do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9 (**Figura 5.3.1B**).

Tendo em vista que o ensaio de GST *pulldown* foi realizado no contexto de superexpressão da região C-terminal de BRCA1, avaliamos a interação no contexto de BRCA1 produzido constitutivamente em células humanas. Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções pFLAG CDK9 (*wt* ou E369A) ou controle (vetor vazio). Os extratos nucleares contendo as proteínas FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A) e BRCA1 foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-BRCA1 e anti-FLAG (**Figura 5.3.1C – Painéis inferiores**).

A interação entre BRCA1 e ambas as formas de CDK9 foi avaliada através de ensaios de coimunoprecipitação com anticorpos anti-FLAG, tendo como isca a proteína de fusão FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A) (**Figura 5.3.1C – Painéis superiores**). Nossos resultados, valendo-se de BRCA1 cadeia completa produzido constitutivamente, corroboram os dados obtidos no modelo ectópico, sugerindo que a CDK9_{E369A} não seja capaz de sustentar a interação com BRCA1 (**Figura 5.3.1C**).

Dados de Lee e colaboradores (2010) demonstraram que as mutações de sentido trocado L1664P e A1830T, localizadas no domínio tBRCT de BRCA1, resultam na perda de especificidade de ligação com fosfopeptídeos sem impactar estruturalmente os domínios tBRCTs (**Figura 5.3.2A**) (LEE et al., 2010). Tendo em vista que os resultados sugerem que a interação CDK9/BRCA1 ocorre através do reconhecimento do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9 pelo domínio tBRCT de BRCA1, avaliamos a capacidade das mutações descritas anteriormente (L1664P e A1830T) reestabelecerem a interação com CDK9_{E369A}.

Células humanas da linhagem HEK293FT foram cotransfectadas com as construções pEBG-BF#6 (*wt*, L1664P ou A1830T) ou controle (vetor vazio), e pFLAG CDK9 (*wt* ou E369A). A capacidade da região C-terminal de BRCA1, selvagem ou mutada, interagir com as formas de CDK9 foi avaliada através de ensaios de GST *pull-down* (**Figura 5.3.2B**). Os resultados demonstram que os mutantes L1664P e A1830T são capazes de reestabelecer a interação com CDK9_{E369A}, em diferentes extensões, sem interferir na interação com CDK9 selvagem (**Figura 5.3.2C**). Esses dados corroboram a hipótese de que a interação entre a região C-terminal de BRCA1 e CDK9 ocorra através do reconhecimento do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9.

Entretanto, dados prévios demonstraram que BRCA1 também interage com CDK9 através de seu domínio RING-finger (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Considerando que a heterodimerização de BRCA1 e BARD1 ocorre através de seus domínios RING-finger (ambos em suas porções N-terminais;), e que CDK9 também interage com BARD1 (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**), avaliamos se a interação entre CDK9 e o domínio RING de BRCA1 ocorre de forma dependente da formação do heterodímero BRCA1/BARD1. A interação entre a porção N-terminal de BRCA1 e CDK9 foi avaliada na presença de BARD1 selvagem ou do mutante L44P, previamente descrito por não interagir com BRCA1 (HASHIZUME et al., 2001; MORRIS; KEEP; SOLOMON, 2002).

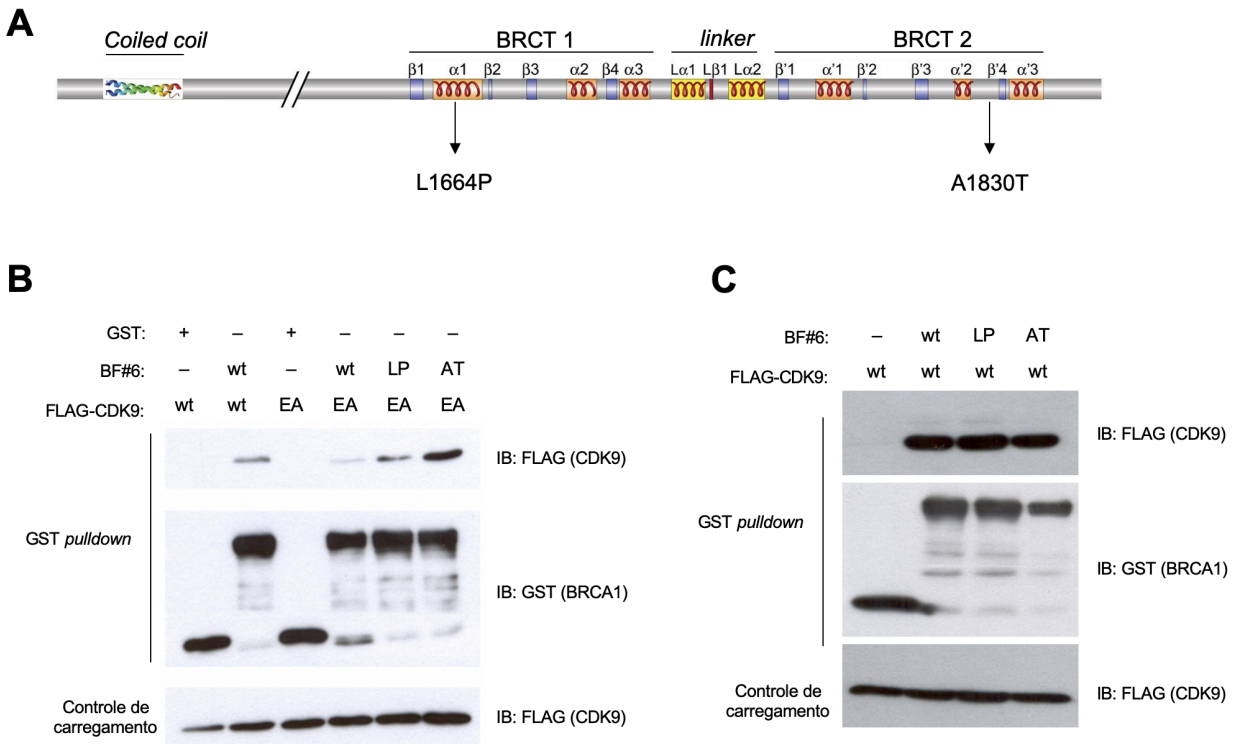


Figura 5.3.2. Mutações no domínio tBRCT de BRCA1 são capazes de reestabelecer a interação com CDK9_{E369A}. (A) Representação esquemática da porção C-terminal de BRCA1 utilizada nos ensaios de GST *pulldown* (adaptado de FERNANDES et al., 2019). Os domínios *Coiled coil* e tBRCT (composto pelo BRCT 1, região do *linker* e BRCT 2) estão representados com suas estruturas secundárias (folha beta, β ; alfa hélice, α). Os números após as letras gregas representam a ordem em que elas aparecem, o apóstrofo indica as estruturas presentes no BRCT2, e a letra L as estruturas presentes na região do *linker*. Os mutantes L1664P e A1830T estão representados conforme sua localização na estrutura secundária da proteína. (B e C) Ensaio de GST *pulldown* tendo como isca a porção C-terminal de BRCA1 (região compreendida entre os resíduos de aminoácidos na posição 1314 ao 1863) fusionada ao GST (BF#6; wt, L1664P ou A1830T), e como presas as proteínas de fusão FLAG-CDK9 (wt ou E369A). Os mutantes E369A, L1664P e A1830T estão representados como EA, LP e AT, respectivamente. As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, solúveis (controle de carregamento) e ligadas à resina Sepharose 4B[®] (*pulldown*) foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-FLAG e anti-GST. $n=3$

Células humanas da linhagem HEK293FT foram cotransfectadas com as construções pEBG-BF#1 (codificando os resíduos de aminoácidos da posição 1 ao 324 de BRCA1, fusionada ao GST), pFLAG CDK9 e pYFP-FLAG-BARD1 (*wt* ou L44P). Os extratos contendo as proteínas de fusão GST-BF#1, FLAG-CDK9, e YFP-FLAG-BARD1 foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-GST e anti-FLAG (**Figura 5.3.3 – Painel da esquerda**).

A capacidade da região N-terminal de BRCA1 interagir com CDK9 na presença de ambas as formas de BARD1 foi avaliada através de ensaios de GST *pulldown*. Os resultados corroboram o comportamento de BARD1 L44P como um mutante incapaz de interagir com o domínio RING de BRCA1 e sugerem que a interação entre CDK9 e a porção N-terminal de BRCA1 é dependente da heterodimerização BRCA1/BARD1 (**Figura 5.3.3**).

5.4. Caracterização funcional do papel da interação CDK9/BRCA1 no controle transcricional mediado por CDK9

Além de sua função central no reparo a danos no DNA por HR, BRCA1 apresenta um papel como coativador transcricional. Dados da literatura sugerem que BRCA1 seja um componente da holoenzima RNA polimerase II. Entretanto, a relevância biológica dessa interação, ainda não está completamente elucidada (GARDINI et al., 2014; ROSEN; FAN; MA, 2006; SCULLY et al., 1997).

Dados prévios demonstraram que CDK9 atua no reparo de quebras de dupla fita de DNA por HR (NEPOMUCENO et al., 2017a). Entretanto, nossos resultados não permitem dissociar a função na RDD do papel canônico de CDK9 na etapa de alongamento da transcrição mediada pela RNA polimerase II. Para entendermos melhor a função do complexo CDK9/BRCA1, avaliamos o impacto dessa interação na função canônica de CDK9.

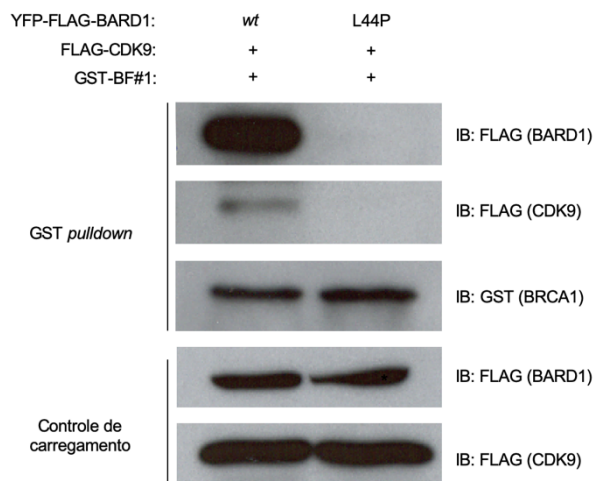


Figura 5.3.3. Caracterização da formação do complexo CDK9-BRCA1-BARD1. Ensaio de GST *pulldown* tendo como isca a porção N-terminal de BRCA1 (região compreendida entre os resíduos de aminoácidos na posição 1 ao 324) fusionada ao GST (BF#1), e como presas as proteínas de fusão FLAG-CDK9 e YFP-FLAG-BARD1 (*wt* ou L44P). As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, em solução (controle de carregamento) e ligadas à resina Sepharose 4B® (GST *pulldown*) foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-FLAG e anti-GST. *n*=3

Em eucariotos, parte do controle da atividade de proteínas da família das CDKs ocorre através da ação da cinase ativadora de CDK (CAK; *CDK-activating kinase*). Essa ativação é mediada pela fosforilação de um resíduo de treonina na alça T próxima ao sítio catalítico da CDK (ALBERTS et al., 2006). Em CDK9, essa ativação ocorre através da fosforilação do resíduo de treonina na posição 186, catalisado pela ação de CDK7 (LAROCHELLE et al., 2012). A fim de entendermos o papel da interação CDK9/BRCA1 na ativação de CDK9, avaliamos os níveis de fosforilação do resíduo de treonina na posição 186 de CDK9_{E369A}.

Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções pFLAG CDK9 (*wt* ou E369A). Os extratos nucleares contendo as proteínas de fusão, FLAG-CDK9 e FLAG-CDK9_{E369A}, foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-FLAG e anti-PCNA (**Figura 5.4.1A**). A fosforilação de CDK9_{E369A} foi avaliada através de rotinas de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-FLAG, seguida de detecção por *immunoblotting* com anticorpos específicos contra a forma fosforilada ativa de CDK9 (fosfo-T186) (**Figura 5.4.1A**). Os resultados demonstram que CDK9_{E369A} apresenta níveis de fosforilação equivalentes à forma selvagem, sugerindo que a perda da interação com BRCA1 não impacte na ativação de CDK9 mediada pela ação da CAK.

Uma vez ativa, CDK9 catalisa a fosforilação do resíduo de serina na posição 2 do heptapeptídeo (*Tyr-Ser₂-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser*) presente na cauda CTD da RNA polimerase II, promovendo o alongamento da transcrição (**Figura 1.7; página 19**). O papel da interação CDK9/BRCA1 na função catalítica de CDK9 foi avaliado através de ensaios de fosforilação *in vitro*, tendo como substrato a cauda CTD da RNA polimerase II. A proteína quimérica GST-CTD, produzida em bactérias *Escherichia coli* (**Seção 4.3; pág. 30**) foi utilizada nos ensaios de fosforilação *in vitro* tendo como cinase efetora as proteínas de fusão FLAG-CDK9 (*wt* ou E369A) produzidas de forma ectópica em células humanas da linhagem HEK293FT (**Figura 5.4.1A**). Os dados demonstram que CDK9_{E369A} é capaz de fosforilar a cauda CTD da RNA polimerase II na mesma extensão da forma selvagem. Sugerindo que a interação CDK9/BRCA1 é dispensável para a função catalítica canônica de CDK9.

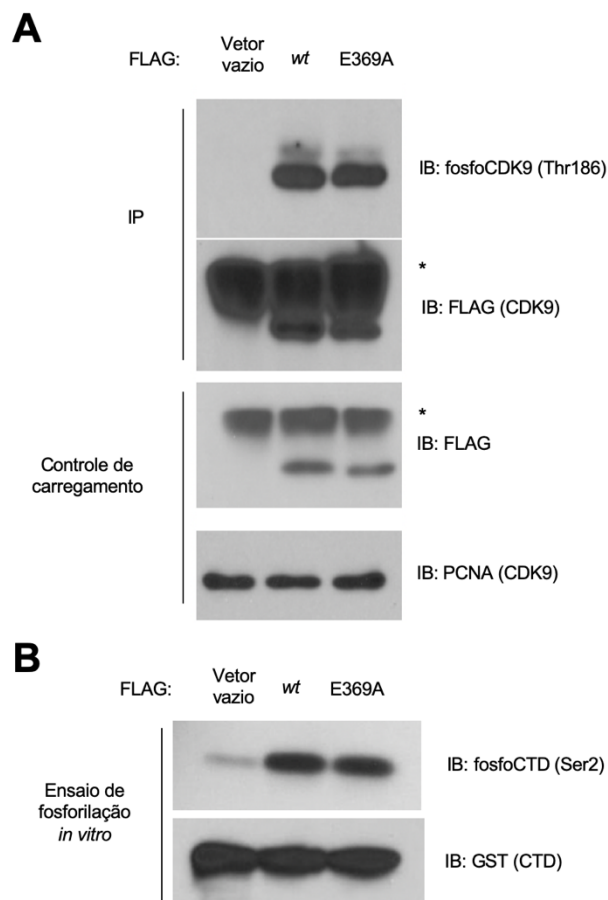


Figura 5.4.1. A interação CDK9/BRCA1 não interfere na ativação e atividade catalítica de CDK9. (A) As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, solúveis (controle de carregamento) foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-PCNA e anti-FLAG. O ensaio de imunoprecipitação (IP) foi realizado utilizando anticorpos anti-FLAG. A presença das proteínas imunoprecipitadas foi identificada através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-FLAG e anti-fosfoCDK9 (Thr186). O asterisco indica o reconhecimento da cadeia pesada (B) As proteínas imunoprecipitadas em “A” foram utilizadas como cinase efetoras para ensaios de fosforilação *in vitro*, tendo como substrato a proteína de fusão GST-CTD produzida em bactérias. O produto do ensaio foi avaliado através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-GST e anti-fosfoCTD (Ser2). *n*=3

CDK9 atua como a subunidade catalítica do complexo PTEF-b, promovendo o aumento da processividade da RNA polimerase II. O complexo PTEF-b apresenta papel importante na patogênese de alguns vírus, como o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Durante a infecção pelo HIV, CDK9 é recrutada para região LTR (*Long Terminal Repeats*) localizada a montante da região codificante do genoma viral, promovendo assim a replicação do vírus (RICE, 2019). A região LTR do HIV encerra um núcleo transcricional basal que encerra três sítios de ligação para o fator transcricional SP1, bem como a sequência regulatória de reconhecimento da maquinaria basal da transcrição (*TATA box*). Mecanicamente, o complexo PTEF-b é recrutado para essa região através da interação entre a ciclina T e a proteína viral Tat (*Trans-activator of transcription*) que, por sua vez, reconhece o RNA regulatório da transativação (TAR) viral, ligado ao LTR. CDK9 é capaz de ativar a transcrição de um gene repórter sob o controle do núcleo basal do LTR de HIV, sem a necessidade do recrutamento por Tat e TAR, mediante fusão com o domínio heterólogo de ligação ao DNA de GAL4 (*GAL4 DNA-binding domain; GAL4_{DBD}*) (TAUBE et al., 2002). O papel da interação CDK9/BRCA1 na transativação transcricional mediada por CDK9 foi avaliado em células humanas da linhagem HEK293FT no contexto do LTR de HIV.

Células humanas da linhagem HEK293FT foram cotransfectadas com as construções pGAL4_{DBD} CDK9 (*wt* ou E369A) ou controle (vetor vazio), pG6 HIV LTR-LUC e pGRTK. Dois dias após a transfecção, as células foram recolhidas e a transativação mediada por CDK9 foi indiretamente avaliada através da quantificação da atividade da luciferase (**Figura 5.4.2B**) Nossos resultados sugerem que, assim como observado para a capacidade de fosforilação da RNA polimerase II, a interação entre BRCA1 e CDK9 é dispensável para a transativação transcricional da porção LTR do HIV, mediada por CDK9. A produção das proteínas de fusão GAL4_{DBD} CDK9 (*wt* ou E369A) foi confirmada através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-GAL4 e anti- β -actina (**Figura 5.4.2C**).

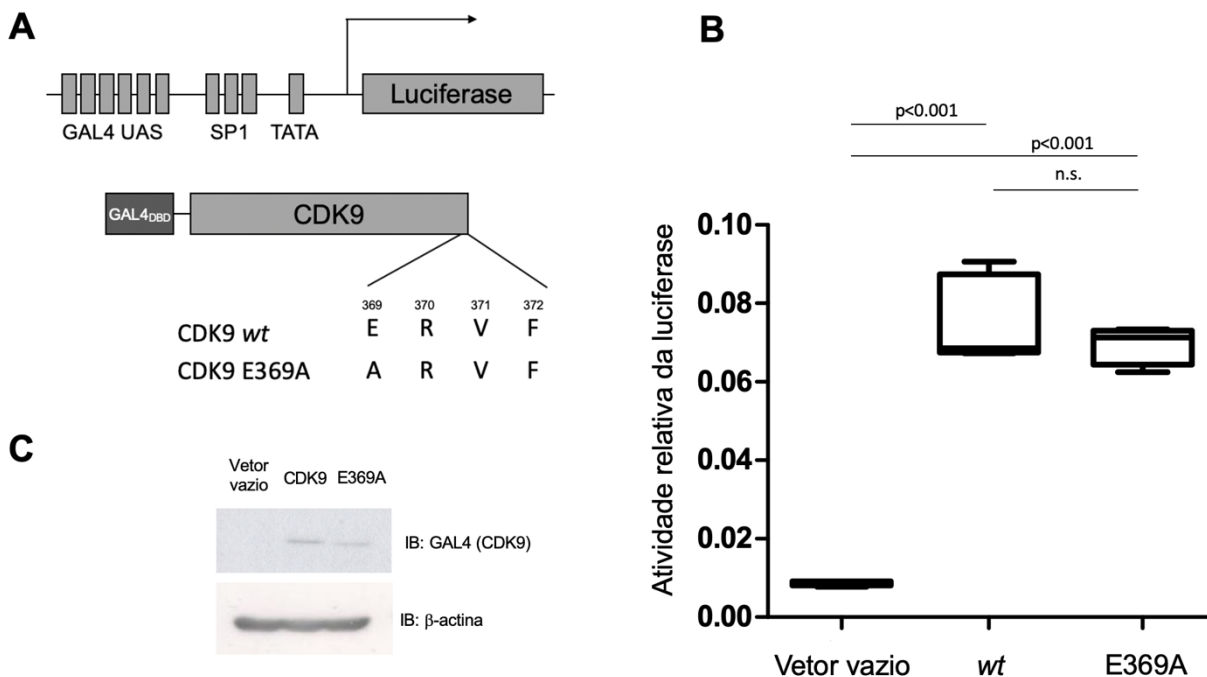


Figura 5.4.2. A interação CDK9/BRCA1 não interfere na transativação transcrricional dependente de CDK9. (A) representação esquemática das construções utilizadas nos ensaios de transativação. GAL4 UAS (*upstream activation sequence*) representa cinco sequências de reconhecimento por GAL4, em tandem. SP1 representa três sequências de reconhecimento pelo fator de transcrição SP1 e TATA indica a sequência de reconhecimento pela proteína TBP (*TATA-box binding protein*). (B) Quantificação da atividade relativa da luciferase. Os níveis de transativação mediados por CDK9 (*wt* ou E369A) foi avaliado em células HEK293FT, 48 horas após a transfecção. Os dados são apresentados como razão do produto da atividade da luciferase de *Photinus pyralis* e *Renilla reniformis*. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA monofatorial. não significativo, n.s. (C) As proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti- β -actina e anti-GAL4 DBD. *n*=3

5.5. Caracterização funcional do papel de CDK9 na resposta a danos no DNA em modelo independente do controle transcricional

Coletivamente, nossos resultados demonstram que CDK9 atua no reparo por HR, através do controle do recrutamento de BRCA1 para os sítios de danos no DNA. Esses dados também indicam que a interação entre CDK9 e BRCA1 é dispensável para o papel catalítico de CDK9, na etapa de alongamento da transcrição. Dessa forma, avaliamos o papel da formação do complexo CDK9/BRCA1 no controle de recrutamento de BRCA1 para as regiões de dano ao DNA.

As células MCF7 shCDK9-1 foram reconstituídas com as construções pFLAG-CDK9 (*wt* ou E369A) ou controle (vetor vazio) e avaliadas quanto a formação de focos de BRCA1, 3 horas após o tratamento com radiação ionizante (10Gy). Como observado anteriormente, as células interferidas para *CDK9* apresentam uma deficiência na formação de focos de BRCA1 (**Figura 5.5A e B**), que é reestabelecida mediante reconstituição da expressão de CDK9 *wt*. É possível observar que as células reconstituídas com FLAG-CDK9_{E369A} apresentam uma marcação difusa mais intensa que as células shCDK9, porém sem a formação de focos, na mesma extensão das células reconstituídas com a sequência selvagem (**Figura 5.5C e D**). Apesar de preliminares ($n=1$), esses dados corroboram a hipótese de que o recrutamento de BRCA1 para os sítios de danos ao DNA ocorre de forma dependente da interação com CDK9.

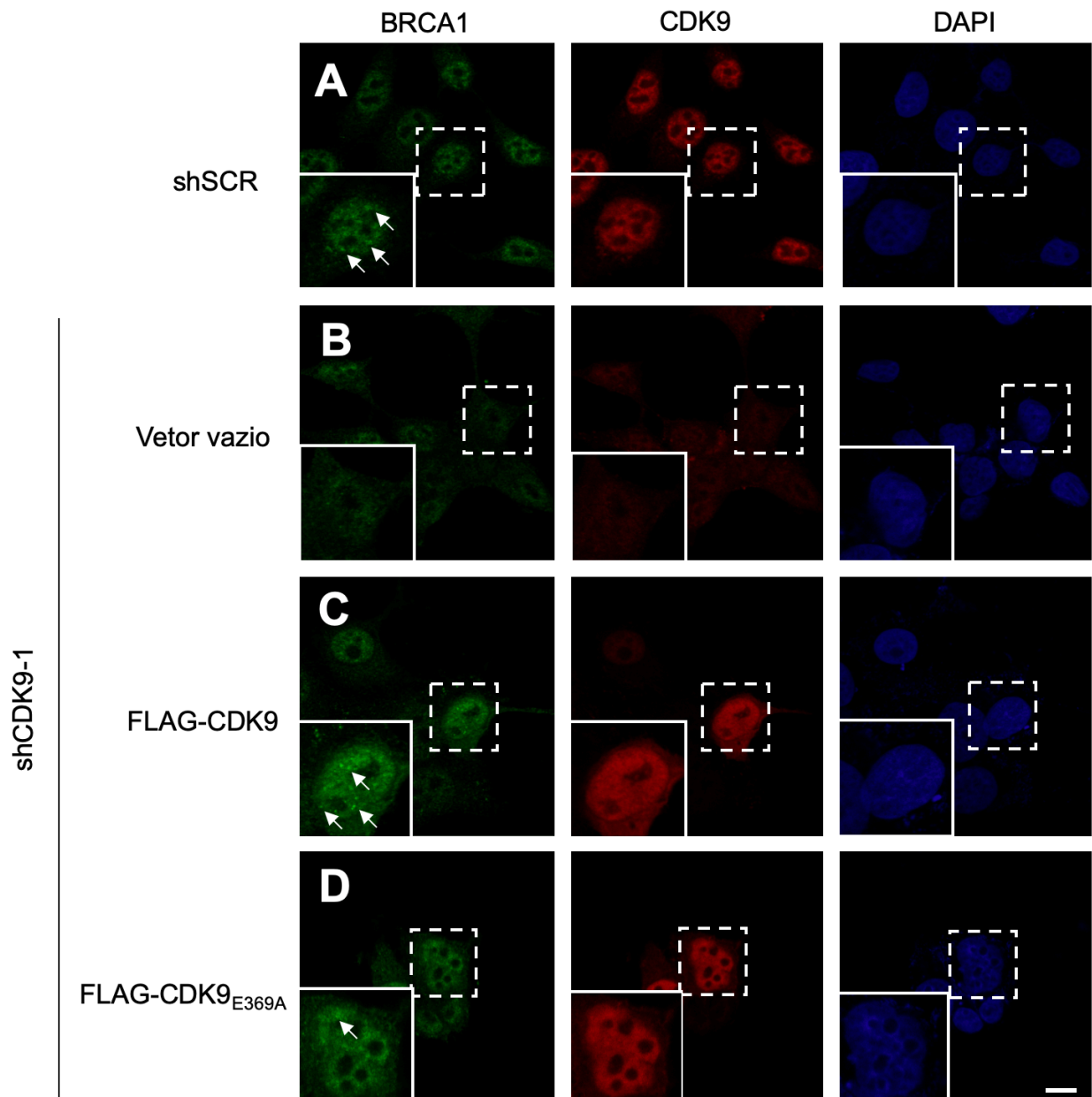


Figura 5.5. A interação CDK9/BRCA1 modula o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA. Células MCF7 shSCR (A), shCDK9-1 (B) e shCDK9 reconstituídas com CDK9 wt (C) ou CDK9_{E369A} (D) foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e a formação de focos de BRCA1 (indicados pelas setas brancas), analisada três horas após o dano, utilizando anticorpos anti-BRCA1, anti-CDK9 e comarcadas com DAPI. Escala = 10 μ m. $n=1$.

5.6. Caracterização da interação entre CDK9 e CHK2

Nossos dados prévios indicaram que CDK9 desempenha um papel importante nos mecanismos de manutenção da integridade genômica através do reparo de danos no DNA por HR (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Porém, o papel exato de CDK9 nesse contexto ainda não está completamente elucidado, principalmente no que diz respeito às suas relações com outras proteínas associadas à RDD.

Dados da literatura mostraram que, em *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 é capaz de fosforilar Bur1 (ortólogos funcionais de CHK2 e CDK9, respectivamente) (BASTOSDEOLIVEIRA et al., 2015; SMOLKA et al., 2007). A conservação dessa relação em humanos poderia explicar parte dos fenótipos observados em nosso modelo, bem como nos ajudar a compreender o papel de CDK9 na RDD.

Para confirmar esta hipótese, avaliamos através de ensaios de *GST pulldown*, a capacidade da proteína quimérica GST-CHK2, produzida em bactérias *Escherichia coli* (**Seção 4.3, página 30**), interagir com a proteína FLAG-CDK9 produzida de forma ectópica em células humanas da linhagem HEK293FT (**Figura 5.6.1A**). Nossos resultados mostram que CHK2 é capaz de interagir com CDK9. Indicando a possibilidade da conservação da relação observada em levedura.

A validação da interação CDK9/CHK2 foi realizada valendo-se de proteínas produzidas de forma ectópica em células humanas, na presença ou ausência de danos no DNA (radiação ionizante, 10Gy) (**Figura 5.6.1B**). As construções pEBG-CHK2, ou controle (vetor vazio), e pFLAG-CDK9 foram cotransfectadas em células humanas da linhagem HEK293FT. Os extratos contendo as proteínas de fusão GST-CHK2, ou GST, e FLAG-CDK9 foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos anti-GST e anti-FLAG. (**Figura 5.6.1B – Painel da esquerda**).

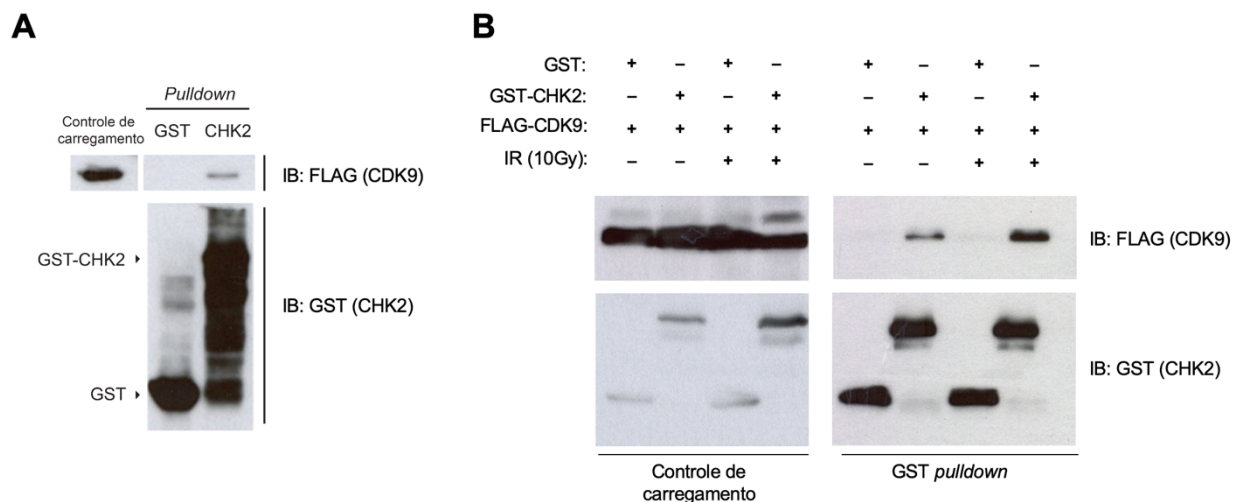


Figura 5.6.1. CHK2 é capaz de interagir com CDK9. (A) Ensaio de GST *pulldown* valendo-se de CHK2 produzido em bactérias. O controle de carregamento de FLAG-CDK9 produzida em células humanas da linhagem HEK293FT foi realizado através de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-FLAG. Os ensaios de GST *pulldown* foram conduzidos com as proteínas GST e GST-CHK2 produzidas em bactérias *E.coli*. O resultado dos ensaios foi avaliado através de *immunoblotting* usando anticorpos anti-FLAG e anti-GST. *n*=2 (B) Ensaio de GST *pulldown* valendo-se de proteínas produzidas em células humanas. As proteínas produzidas na linhagem HEK293FT, em solução (controle de carregamento) e ligadas à resina Sepharose 4B® (GST *pulldown*) foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* com anticorpos anti-FLAG e anti-GST. *n*=3

A interação CDK9/CHK2 na presença ou ausência de danos no DNA foi avaliada através de ensaios de GST *pulldown*. Nossos resultados demonstram que CHK2 interage com CDK9, em células humanas, independentemente do tratamento com radiação ionizante (**Figura 5.6.1B – Painel da direita**).

A interação entre CDK9 e CHK2 também foi avaliada no contexto de proteínas produzidas constitutivamente em células humanas. Os níveis proteicos de CDK9 e CHK2 foram avaliados em extratos proteicos de células da linhagem MCF7 (**Figura 5.6.2A**) através de *immunoblotting*, valendo-se de anticorpos anti-CDK9 e anti-CHK2. A confirmação da interação foi realizada através de ensaios de coimunoprecipitação, onde CHK2 foi imunoprecipitada e o complexo proteico recuperado analisado através de rotinas de *immunoblotting*, com anticorpos anti-CDK9 e anti-CHK2 (**Figura 5.6.2A**). O mesmo foi realizado utilizando células humanas da linhagem HCT116, proficientes e deficientes para CHK2 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*, respectivamente). Os níveis proteicos de CDK9 e CHK2 foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting*, e a interação confirmada através da coimunoprecipitação com anticorpos anti-CDK9 seguido por *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-CDK9 e anti-CHK2 (**Figura 5.6.2B**). Ambos os ensaios de coimunoprecipitação valeram-se do controle negativo utilizando anticorpos específicos para o epítipo FLAG (IgG).

Nossos resultados demonstram que CDK9 e CHK2 interagem constitutivamente em células humanas, independente da indução de danos no DNA. Corroborando a hipótese de conservação da putativa relação cinase-substrato, identificada originalmente em leveduras, em células humanas.

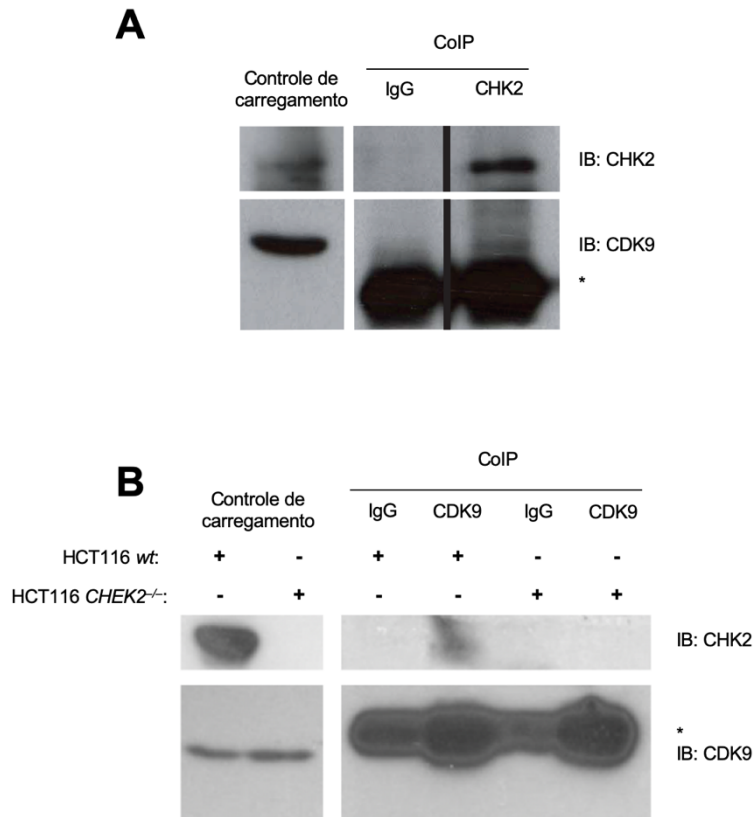


Figura 5.6.2. CHK2 interage com CDK9 em células humanas. Os níveis proteicos de CDK9 e CHK2 foram avaliados em extratos proteicos de células humanas da linhagem MCF7 (**A**) e HCT116 (*wt* e *CHEK2^{-/-}*) (**B**), através de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-CDK9 e anti-CHK2. O ensaio de coimunoprecipitação (CoIP) foi realizado utilizando anticorpos anti-FLAG (IgG), anti-CHK2 (**A**) ou anti-CDK9 (**B**). A presença das proteínas coimunoprecipitadas foi identificada através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-CHK2 e anti-CDK9. O asterisco indica o reconhecimento da cadeia leve (**A**) e pesada (**B**) dos anticorpos utilizados no ensaio de CoIP. *n*=3

Dessa forma, buscamos avaliar essa relação através de ensaios de fosforilação *in vitro*. A sequência primária definida com consenso de fosforilação por CHK2 é determinada pelo resíduo de serina ou treonina (posição 0) antecedido por dois resíduos de aminoácidos não específicos nas posições -1 e -2, e por um resíduo de arginina na posição -3 (*Arg-X-X-Ser/Thr*; **Figura 5.6.3A** (MOHAMMAD; YAFFE, 2009; UTO et al., 2004). CDK9 apresenta em sua sequência proteica primária dois putativos sítios de fosforilação por CHK2, um no resíduo de serina na posição 175 e outro no resíduo de treonina na posição 191 (S175 e T191). A fosforilação da S175 já foi observada durante a progressão mitótica e mediante infecção viral por HIV. O impacto dessa fosforilação na atividade cinase de CDK9 ainda não está completamente elucidado, tendo sido atribuída a ela a capacidade de ativar e inibir CDK9 (AMMOSOVA et al., 2011a, 2011b; DULLA et al., 2010; MBONYE et al., 2013)

A putativa relação cinase-substrato entre CHK2 e CDK9 foi avaliada através de ensaios de fosforilação *in vitro* na presença de ATP radioativo ($\gamma^{32}\text{P}$). Para minorar a possibilidade de autofosforilação de CDK9, substituímos o resíduo de ácido aspártico na posição 167 por um resíduo de asparagina (CDK9_{D167N}) que, segundo dados da literatura, resulta na perda de sua atividade cinase (YU et al., 2010; ZHANG et al., 2013). A proteína quimérica GST-CDK9_{D167N}, produzida em bactérias *Escherichia coli* (**Seção 4.3; página 30**), foi utilizada como substrato nos ensaios de fosforilação *in vitro* tendo como cinase efetora a proteína de fusão FLAG-CHK2, produzida de forma ectópica, em células humanas da linhagem HEK293FT (**Figura 5.6.3B**). A ativação de CHK2 foi realizada através do tratamento com radiação ionizante (6Gy), uma hora antes da obtenção do extrato proteico. A proteína de fusão FLAG-CHK2 foi purificada através de imunoprecipitação com anticorpos anti-FLAG, e avaliadas quanto a sua ativação por *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-FLAG e anti-fosfoCHK2 (*Thr68*) (**Figura 5.6.3B**). Os resultados confirmam a ativação de CHK2 mediante tratamento com radiação ionizante e indicam que a proteína purificada apresenta atividade cinase, tendo em vista a sua autofosforilação, já descrita na literatura (CHO; SCHROEDER; OTT, 2010). A proteína FLAG-CHK2 purificada foi, então, utilizada como cinase efetora nas rotinas de fosforilação *in vitro*.

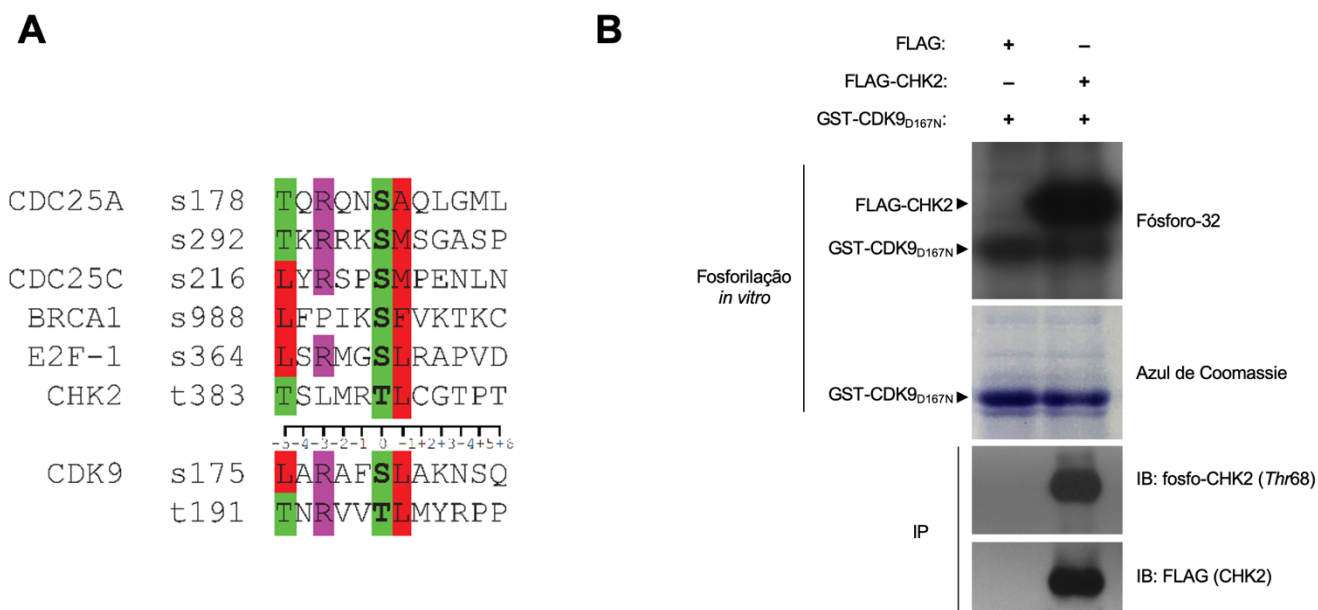


Figura 5.6.3. Avaliação da putativa relação cinase-substrato entre CHK2 e CDK9. (A) Alinhamento de substratos de CHK2, previamente descritos, e de dois putativos sítios de fosforilação em CDK9 (s175 e t191). Destaque para os resíduos de serina e/ou treonina alvos da fosforilação, em negrito (posição 0). Os resíduos de aminoácidos mais conservados estão agrupados em três grupos: cadeia lateral apolar (vermelho), básica (roxo) ou polar não carregada (verde). (B) A proteína de fusão FLAG-CHK2 ou controle (vetor vazio; FLAG) produzida em células humanas da linhagem HEK293FT foi utilizada como cinase efetora para ensaios de fosforilação *in vitro*, tendo como substrato a proteína de fusão GST-CDK9_{D167N}, produzida em bactérias, na presença de ATP radioativo ($\gamma^{32}\text{P}$). O produto do ensaio de fosforilação *in vitro* foi resolvido através de rotinas de eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por coloração com azul de coomassie e radiodeteção. A proteína cinase foi obtida uma hora após tratamento com radiação ionizante (6Gy) e purificada por imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-FLAG. O produto da IP foi avaliado através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-FLAG e anti-fosfoCHK2 (Thr68). As cabeças de seta indicam as bandas de interesse. $n=3$

Os resultados observados são inconclusivos quanto a fosforilação de CDK9 por CHK2, uma vez que percebemos a putativa autofosforilação de GST-CDK9_{D167N} mesmo na ausência de CHK2 (**Figura 5.6.3B**). Tendo em vista a limitação para confirmação da putativa relação cinase-substrato, buscamos caracterizar o papel biológico da interação entre as duas proteínas, utilizando modelos celulares proficientes e deficientes para CDK9 e/ou CHK2.

5.7. Avaliação do papel de CHK2 na sensibilidade à radiação ionizante de células interferidas para CDK9.

Nossos dados prévios demonstraram que o papel de CDK9 no reparo ao dano de DNA é acompanhado por um aumento na sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante (NEPOMUCENO, 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Dados da literatura indicam que danos ao DNA resultam na ativação de CHK2 e consequente fosforilação de seus substratos (ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014). Com a finalidade de avaliar os efeitos da ausência de CDK9 e/ou CHK2 na RDD, células humanas da linhagem HCT116 (*wt* e *CHEK2*^{-/-}) foram transduzidas com partículas virais contendo construções para interferência da expressão gênica de *CDK9*, assim como com a construção controle, shSCR. Os níveis proteicos de CDK9 e CHK2 foram avaliados nas linhagens HCT116 (*wt* ou *CHEK2*^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 através de rotinas de *immunoblotting* (**Figura 5.7A**). Nossos resultados demonstram que os níveis de CDK9 foram reduzidos independentemente dos níveis de CHK2, e de forma mais eficiente mediante transdução com a construção shCDK9-1, quando comparado com a construção shCDK9-2 e shSCR (**Figura 5.7A – exposições longas e curtas**).

Tendo em vista a interação entre CDK9 e CHK2, avaliamos o impacto da ausência de CHK2 no fenótipo de sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante associado ao silenciamento gênico de *CDK9*. As células HCT116 (*wt* ou *CHEK2*^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 foram tratadas com diferentes doses de radiação ionizante e avaliadas quanto a viabilidade após 7 dias em cultura.

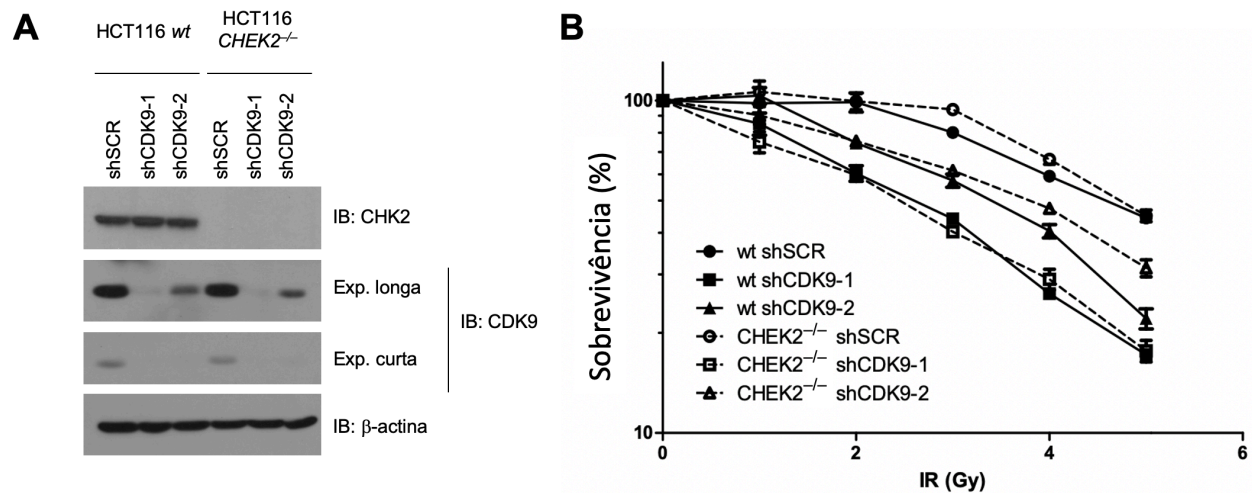


Figura 5.7 A redução dos níveis de CDK9 resultam no aumento da sensibilidade à radiação ionizante, de forma independente de CHK2. (A) Os níveis de CDK9 e β -actina (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células humanas da linhagem HCT116 (wt e CHEK2^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 ou shCDK9-2, por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-CHK2, anti-CDK9 e anti- β -actina. (B) As células interferidas para CDK9 e controle (shSCR) foram plaqueadas em baixa densidade (10⁴ células por 9,5cm²) e expostas a doses crescentes de radiação ionizante (1Gy, 2Gy, 3Gy, 4Gy e 5Gy). Após 7 dias em cultura, as células foram coradas com cristal violeta e quantificadas por espectrofotometria a 570nm. Os dados representam as médias \pm desvio padrão de triplicadas, normalizadas pelos respectivos controles. A análise estatística foi realizada pelo método, ANOVA bifatorial. $n=3$

Os resultados apresentados corroboram nossos dados prévios (NEPOMUCENO, 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**), demonstrando que a ausência de CDK9 resulta em uma maior sensibilidade a DSBs (**Figura 5.7B; linhas contínuas**). Entretanto, a ausência de CHK2 não impacta nessa sensibilidade (**Figura 5.7B; linhas tracejadas**). Os resultados também indicam que, de forma independente de CDK9, o status de CHK2 não está relacionado à sensibilidade das células HCT116 ao tratamento com radiação ionizante (**Figura 5.7B; círculos pretos e brancos**). Além disso, esses dados sugerem que variações mais sutis nos níveis de CDK9, resultam em uma menor sensibilidade a danos no DNA, indicando um putativo comportamento dose-dependente entre os níveis de CDK9 e a sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante (**Figura 5.7B; quadrados e triângulos**). Esses dados apontam para um papel de CDK9 no reparo a danos no DNA de forma independente de CHK2.

5.8. Avaliação do papel de CHK2 na sensibilidade à inibição de PARP de células interferidas para CDK9.

Dados da literatura demonstraram que CHK2 modula o reparo por HR através da fosforilação do resíduo de serina na posição 988 de BRCA1 (ZHANG et al., 2004). Nossos resultados indicam que células silenciadas para *CDK9* apresentam uma redução na eficiência do reparo por HR, resultando em um aumento da sensibilidade ao tratamento com iPARP (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**) (**Figura 5.2**).

A fim de caracterizar indiretamente a participação da interação CDK9/CHK2 no reparo por HR, avaliamos o papel de CHK2 na sensibilidade ao tratamento com dois iPARP (olaparib e rucaparib) nas células interferidas para *CDK9*. As células HCT116 (*wt* ou *CHEK2*^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 foram tratadas com 2,5µM de olaparib ou rucaparib e avaliadas depois de 7 dias (**Figura 5.8A e B**). Os resultados demonstram que a ausência de CDK9 nas células HCT116 *wt* shCDK9-1 resulta numa diminuição da sobrevivência das células ao tratamento com olaparib e rucaparib de $\cong 30\%$ e $\cong 45\%$, respectivamente. O mesmo pode ser observado nas células deficientes para CHK2 ($\cong 35\%$ e $\cong 50\%$). Entretanto, o silenciamento menos efetivo de CDK9 (shCDK9-2; **Figura 5.7A**) não parece ser suficiente para a sensibilização das células HCT116 (*wt* e *CHEK2*^{-/-}) ao tratamento com iPARP.

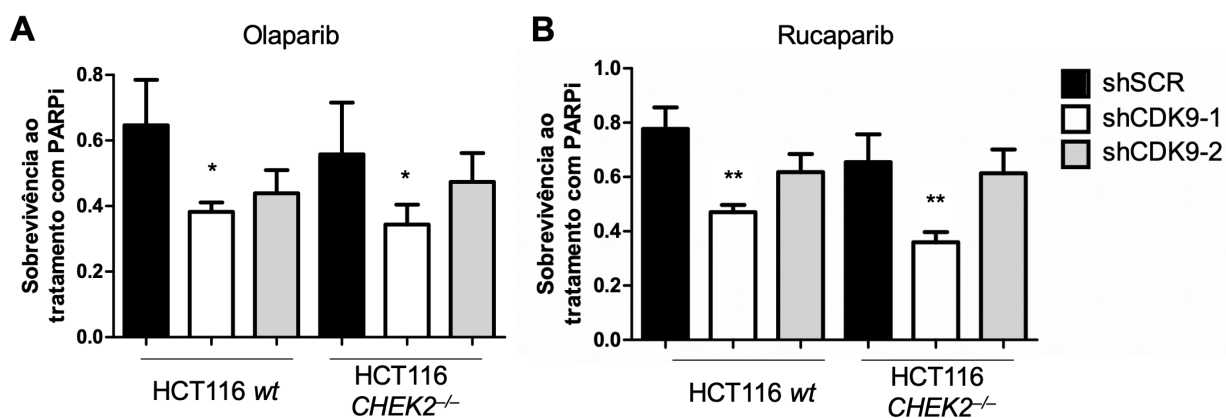


Figura 5.8. A redução dos níveis de CDK9 resulta no aumento da sensibilidade à inibição de PARP, de forma independente de CHK2. As células interferidas para CDK9 e controle (shSCR) foram plaqueadas em baixa densidade (10^4 células por $9,5\text{cm}^2$) e expostas a $2,5\mu\text{M}$ de (A) olaparib e (B) rucaparib. Após 7 dias em cultura, as células foram coradas com cristal violeta e quantificadas por espectrofotometria a 570nm . Os dados representam as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo método, ANOVA bifatorial. * representa $p < 0.01$. ** representa $p < 0.001$. $n=3$

Esses dados corroboram nossa observação de que CHK2 é dispensável para a sensibilização ao tratamento com radiação ionizante das células silenciadas para *CDK9* (**Figura 5.7**). Sugerindo que o papel da interação CDK9/CHK2 não esteja diretamente relacionado ao reparo a danos no DNA.

5.9. Avaliação do papel de CDK9 no controle do ciclo celular mediante danos ao DNA

A descrição original de CDK9 sugeria um papel conjunto com RB e p53 no controle do ciclo celular (GRAÑA et al., 1994; RADHAKRISHNAN; GARTEL, 2006). Entretanto, a hipótese da participação de CDK9 nos mecanismos de controle de transição das fases do ciclo celular foi descartada e um papel central no controle da etapa de alongamento da transcrição foi consolidado (PAPARIDIS; DURVALE; CANDURI, 2017). Por outro lado, dados da literatura sugerem que CDK9 atue na progressão da fase S mediante estresse replicativo (YU et al., 2010).

Em células de mamíferos, CHK2 atua na manutenção da integridade genômica, principalmente através do controle do ciclo celular na RDD (ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014). Tendo em vista a interação CDK9/CHK2, avaliamos a proficiência dos pontos de controle do ciclo celular mediante danos ao DNA nas células interferidas para *CDK9* no contexto de proficiência e deficiência de CHK2.

As células HCT116 (*wt* ou *CHEK2*^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 foram submetidas ao tratamento com radiação ionizante (6Gy) e tiveram o perfil de distribuição de subpopulações nas fases do ciclo celular avaliado, 12 e 24 horas após o tratamento (**Figura 5.9A**). Os resultados demonstram que, 12 horas após a indução de danos no DNA, as células HCT116 shSCR proficientes para CHK2 acumulam na fase G2/M (de $\cong 20\%$ para $\cong 60\%$). As células shSCR deficientes em CHK2 apresentam um perfil semelhante, porém com a redução drástica da população em S (de $\cong 30\%$ para 0%). (**Figura 5.9A e B**). Após 24 horas, o perfil se altera, podendo-se observar uma progressão das células previamente arrestadas em G2/M para G1, independente dos níveis CHK2. Entretanto, um maior número de células *CHEK2*^{-/-} se mantêm em G2/M nesse tempo ($\cong 45\%$ contra $\cong 30\%$ nas células *wt*) (**Figura 5.9A e B**).

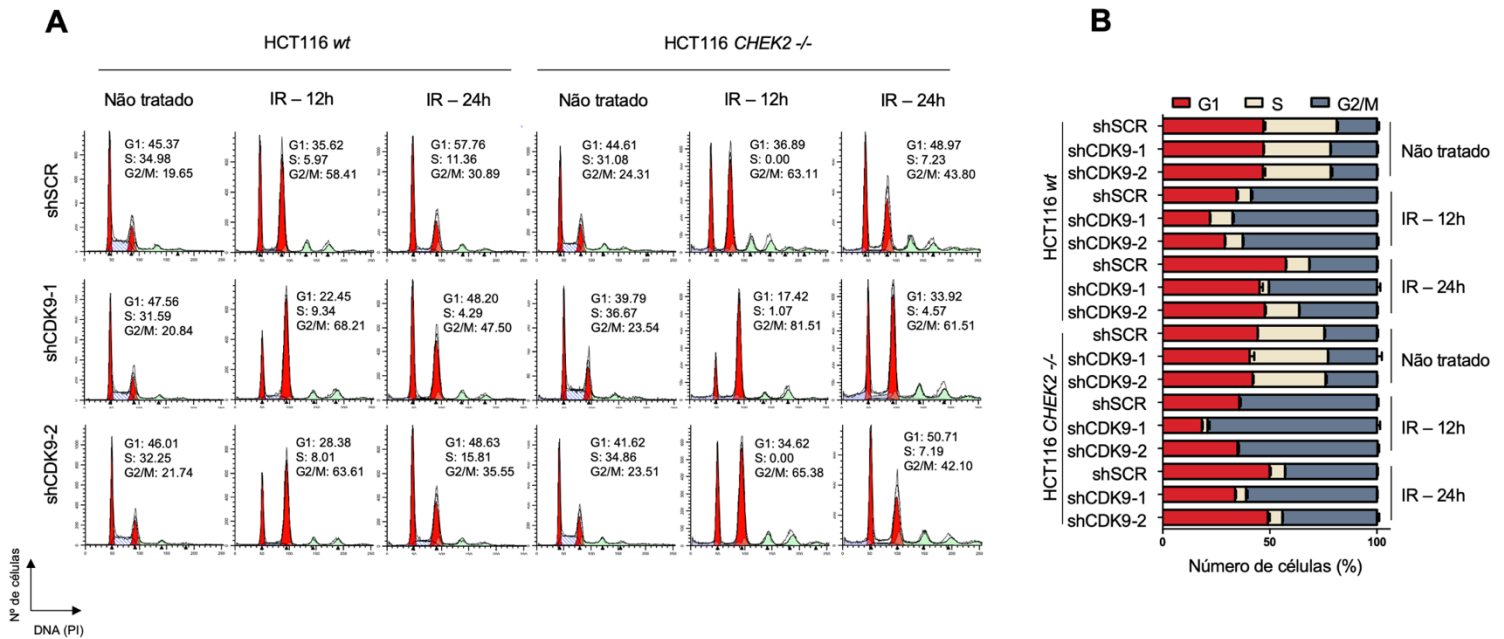


Figura 5.9. CDK9 participa do controle de parada do ciclo celular mediante danos no DNA, de forma independente de CHK2. (A) O perfil de distribuição das células HCT116 (wt e CHEK2^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 ou shCDK9-2, foi avaliado 12 e 24 horas após o tratamento com radiação ionizante (6Gy). A quantificação das populações nas diferentes fases do ciclo celular foi realizada com o *software* Modfit. (histogramas hachurados em vermelho e branco). **(B)** Os dados representam as médias \pm desvio padrão de triplicadas. $n=3$

A linhagem com maior redução dos níveis de CDK9 (shCDK9-1; **Figura 5.7A**) apresenta um acúmulo maior de células em G2/M, 12 ($\cong 70\%$) e 24 ($\cong 48\%$) horas após o tratamento (**Figura 5.9A e B**). Esse comportamento ocorre de forma mais intensa nas células deficientes para CHK2 ($\cong 81\%$ e $\cong 62\%$). Como observado anteriormente, as células com menor redução dos níveis de CDK9 (shCDK9-2; **Figura 5.7A**) apresentam o fenótipo de forma mais sutil, nas células proficientes para CHK2 ($\cong 64\%$ e $\cong 36\%$). Entretanto, na ausência de CHK2, a manutenção de baixos níveis de CDK9 parece ser o suficiente para sustentar o perfil populacional das células controle (**Figura 5.9A e B**).

Os dados apresentados corroboram a hipótese de que CDK9 atue no controle do ciclo celular, apenas na RDD, e de forma independente de CHK2.

5.10. Caracterização da rede de interação comum à BRCA1, CHK2 e CDK9

Os dados apresentados até aqui, sugerem que CDK9 atue na RDD através do reparo por HR e controle do ciclo celular. Apesar do papel desempenhado juntamente a BRCA1, a relevância da interação CDK9/CHK2 ainda não está clara.

Tendo em vista a relação funcional entre BRCA1 e CHK2, identificamos, por meio de ferramentas *in silico*, parceiros de interação comuns a ambas as proteínas que apresentam alguma relação funcional com CDK9. Utilizamos a plataforma *Bisogenet* disponível através do software *Cytoscape* (**Seção 4.17; página 39**) para construir a rede de interação composta por parceiros de interação de BRCA1 e CHK2 (**Figura 10.1A**). O interatoma obtido é composto por 602 proteínas, sendo apenas 28 ($\cong 5\%$) parceiras de interação comuns a BRCA1 e CHK2. Estas 28 proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento de ontologia de processos celulares *in silico*, através da plataforma *online Webgestalt*. Como esperado, os resultados apontaram para as vias diretamente relacionadas à RDD, como (1) controle de pontos de checagem do ciclo celular, (2) reparo de quebra de dupla-fita do DNA, (3) reparo por vias não recombinantes e (4) transdução de sinal em resposta a danos no DNA (**Figura 5.10.1A; Anexo II**). Das 28 proteínas que interagem com BRCA1 e CHK2, 8 (CCAR2, p53, PLK1, RB, ATR, MSH2, NBN e ATM) já foram descritas por interagir com CDK9 (CLAUDIO et al., 2006; FANG et al., 2014; JERONIMO et al., 2007; JIANG et al., 2013; MAK et al., 2010; SIMONE et al., 2002; SU et al., 2018) (**Figura 10.1B**).

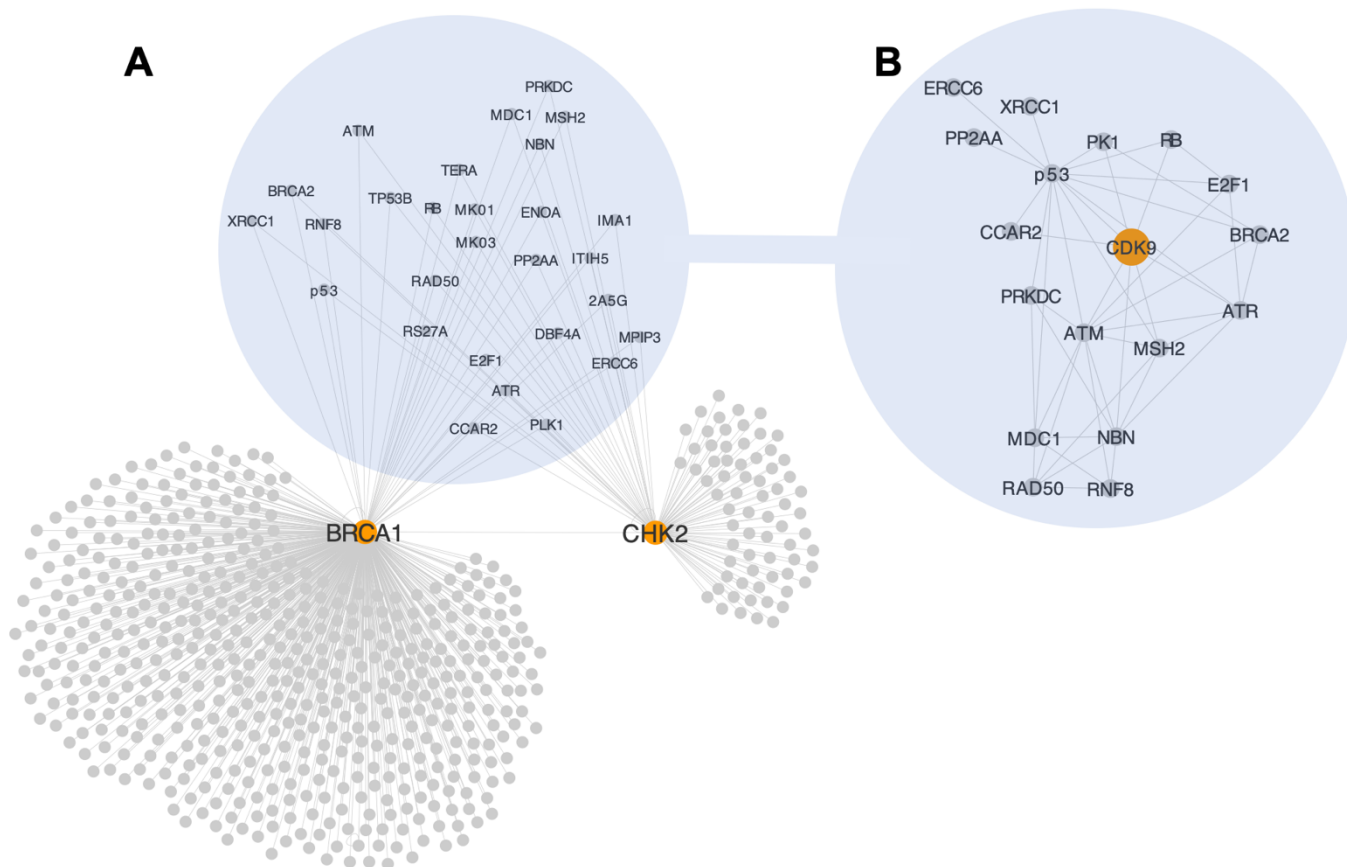


Figura 5.10.1. CDK9 apresenta parceiros de interação comuns a BRCA1 e CHK2. (A) Rede de interação de proteínas de BRCA1 e CHK2 obtida através de dados públicos depositados no banco de dados *thebiogrid*, através da plataforma *Bisogenet*. Foram identificados 600 interatores, sendo 502 e 70 parceiros únicos de BRCA1 e CHK2, respectivamente, e 28 comuns às duas proteínas. **(B)** Sub-rede de interações entre BRCA1, CHK2 e CDK9. Das 28 proteínas de interação comuns a BRCA1 e CHK2, apenas 8 (CCAR2, p53, PLK1, RB, ATR, MSH2, NBN e ATM) já foram descritas por interagir com CDK9, segundo dados do *thebiogrid*.

Destas, apenas PLK1 e ATR foram caracterizadas funcionalmente no contexto da interação com CDK9 (JIANG et al., 2013; YU et al., 2010).

Como discutido anteriormente, a interação entre CDK9 e ATR foi relacionada ao controle de parada na fase intra-S mediante estresse replicativo (YU et al., 2010). Diferente de ATR, PLK1 foi descrita por modular o papel de CDK9 durante a transcrição, sendo responsável por reprimir a transativação da região LTR do HIV, bem como inibir a fosforilação da cauda CTD da RNA polimerase II (JIANG et al., 2013). Tendo em vista que os resultados apresentados sugerem um papel para CDK9 na RDD de forma independente de CHK2, optamos por avaliar o putativo papel de PLK1 no contexto da relação CDK9-CHK2.

Para caracterizar a suposta relação entre CDK9, PLK1 e CHK2, avaliamos os níveis de PLK1 em células MCF7 interferidas para *CDK9*. Os resultados demonstram que a ausência de CDK9 é acompanhada pela redução dos níveis de PLK1 (**Figura 10.2A**). O mesmo foi observado nas células HCT116 *wt* shCDK9-1, e em menor extensão nas células shCDK9-2 (**Figura 10.2B**). As células deficientes para CHK2 apresentam níveis elevados de PLK1, quando comparadas as células proficientes. Entretanto, a redução dos níveis de CDK9 não é acompanhado pela redução dos níveis de PLK1 na ausência de CHK2 (**Figura 10.2B**).

PLK1 atua na RDD através do controle de reentrada em mitose, após reparo dos danos no DNA. A função de PLK1 é antagonizada pela ação da cinase WEE1, que mediante ativação da RDD, induz a parada em G2/M (DE GOOIJER et al., 2017). Considerando a relação antagônica de PLK1 e WEE1 no controle do ciclo celular, bem como o papel de CDK9 na RDD, avaliamos o impacto da presença de danos no DNA nos níveis de PLK1 e WEE1 nas células interferidas para *CDK9*, na presença e na ausência de CHK2 (**Figura 10.2C**). Os resultados demonstram que os níveis de PLK1 não variam mediante danos ao DNA, independente do contexto de CDK9 e CHK2 (**Figura 10.2C**). Os dados também sugerem que, ao contrário do observado para PLK1, a interferência de *CDK9* não resulta na alteração dos níveis de WEE1, sugerindo que essa variação seja específica para PLK1.

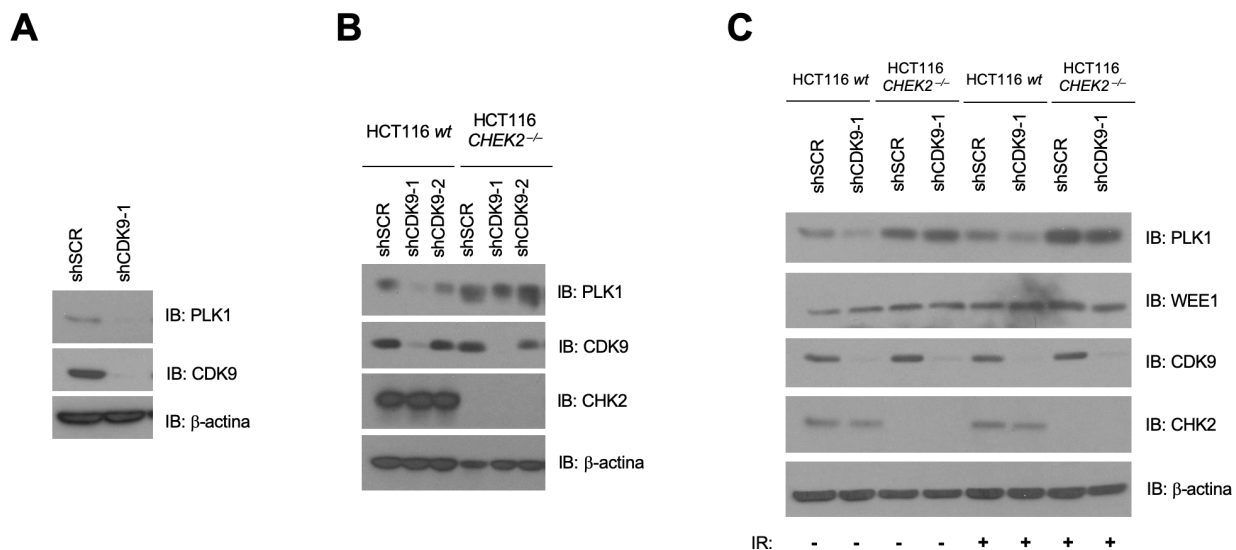


Figura 5.10.2. Os níveis proteicos de PLK1 variam mediante interferência para CDK9, de forma dependente de CHK2. (A) Os níveis de PLK1, CDK9 e β -actina (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células humanas da linhagem MCF7 shSCR e shCDK9-1 por *immunoblotting* utilizando os anticorpos indicados. (B) Os níveis de PLK1, CDK9, CHK2 e β -actina (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células humanas da linhagem HCT116 (wt e CHEK2^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 por *immunoblotting* utilizando os anticorpos indicados. (C) Os níveis proteicos de PLK1, WEE1, CDK9, CHK2 e β -actina (controle de carregamento) foram avaliados 3 horas após o tratamento com radiação ionizante (6Gy) de células humanas da linhagem HCT116 (wt e CHEK2^{-/-}) shSCR, shCDK9-1 e shCDK9-2 por *immunoblotting* utilizando os anticorpos indicados. *n*=3

5.11. Avaliação do papel de CHK2 na transativação transcricional mediada por CDK9

Os dados apresentados apontam que a interação CDK9/CHK2 não esteja relacionada ao controle desempenhado por CDK9 na RDD. Entretanto, a variação dos níveis proteicos de PLK1 ocorre de forma dependente dos níveis de CDK9 e CHK2. Tendo em vista o aumento dos níveis de PLK1 nas células HCT116 *CHEK2*^{-/-}, bem como seu papel na inibição da atividade de CDK9 durante a transcrição, avaliamos a capacidade de CDK9 transativar transcricionalmente a região LTR do HIV nas células HCT116 proficientes e deficientes para CHK2.

Células humanas da linhagem HCT116 (*wt* ou *CHEK2*^{-/-}) foram cotransfectadas com as construções pGAL4-DBD CDK9, pG6 HIV LTR-LUC e pGRTK (**Seção 4.15; página 38**). Como descrito anteriormente, 48 horas após a transfecção, as células foram recolhidas e a transativação mediada por CDK9 foi indiretamente quantificada através da atividade da luciferase (**Figura 5.11**) Apesar de preliminares (*n*=2), os dados sugerem que a capacidade de CDK9 promover a transcrição da região LTR do HIV é, em alguma extensão, dependente de CHK2.

5.12. Determinação da rede de interação proteica mediada por CDK9 no contexto de dano ao DNA

As evidências acumuladas até o momento indicam que CDK9 ocupa uma posição de destaque na RDD, seja através do controle do reparo por HR ou no controle de parada do ciclo celular. Parte das informações conhecidas sobre a via de RDD proveem do estabelecimento das interações proteína-proteína entre diferentes componentes desta via. Não existe na literatura uma avaliação dos parceiros de interação de CDK9 em resposta a danos no DNA.

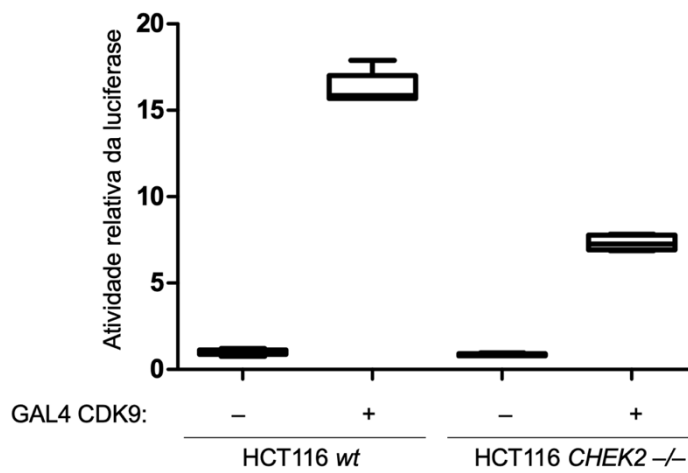


Figura 5.11. CHK2 modula a transativação transcricional mediada por CDK9. Quantificação da atividade relativa da luciferase. Os níveis de transativação mediado por CDK9 foram avaliados em células HCT116 (*wt* ou *CHEK2^{-/-}*), 48 horas após a transfecção. Os dados são apresentados como a razão do produto da atividade da luciferase de *Photinus pyralis* e *Renilla reniformis*. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA monofatorial. não significativo, n.s.. $n=2$.

A fim de compreender melhor o papel de CDK9 na RDD, realizamos uma varredura de interações proteicas mediante tratamento com radiação ionizante, por TAP-MS. Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções pNTAP-CDK9-HA ou pNTAP-GFP, contendo as sequências codificantes das proteínas de fusão CBP-SBP-CDK9-HA e CBP-SBP-GFP respectivamente. Os extratos proteicos foram obtidos 3 horas após o tratamento com radiação ionizante (10Gy) e, então, submetidos a etapas sucessivas de purificação para posterior identificação dos complexos proteicos obtidos por espectrometria de massas.

Foram consideradas putativas parceiras de interação somente as proteínas não identificadas no ensaio controle utilizando GFP. Dessa análise foram identificadas 155 putativas proteínas de interação com CDK9 (**Anexo III**).

As referidas proteínas de interação foram submetidas à análise de enriquecimento de ontologia de processos celulares *in silico*, através da plataforma *online* Webgestalt. Os resultados apontaram para as vias de (1) reparo a danos ao DNA, (2) divisão celular mitótica, (3) organização telomérica, (4) regulação positiva da localização celular de proteínas e (5) processos biossintéticos de DNA, (**Figura 5.12; Anexo IV**).

Individualmente, destacam-se as proteínas p53, MSH2, diferentes membros das famílias 14-3-3 (14-3-3 σ /Stratifin, 14-3-3 γ e 14-3-3 η), SMC (SMC2 e SMC3) e MCM (MCM3, MCM6 e MCMBP). Também foram identificadas as cinases mediadoras ATM e DNAPKcs (codificada pelo gene *PRKDC*), além de FAM175B/ABRAXAS2 e BABAM1/MERIT40, componentes do complexo BRISC (que controla a formação do fuso mitótico) e BRCA1-A. Outros putativos parceiros observados, foram as proteínas da família das deubiquitinases, USP7 e USP9X, responsáveis pelo controle de recrutamento de RNF168 e pela manutenção da estabilidade da forquilha de replicação, respectivamente. Além de SLFN11, que modula o reparo por HR através da estabilidade da interação de RPA com a simples fita de DNA gerada pela ressecção (FENG; HUANG; CHEN, 2009; KASHIWABA et al., 2015; KIM; SIXMA, 2017; MCGARRY et al., 2016; MOHAMMAD; YAFFE, 2009; O'DEA; SANTOCANALE, 2020; PENG et al., 1997; VILLA-HERNÁNDEZ; BERMEJO, 2018; YAN et al., 2015; ZHU et al., 2015)

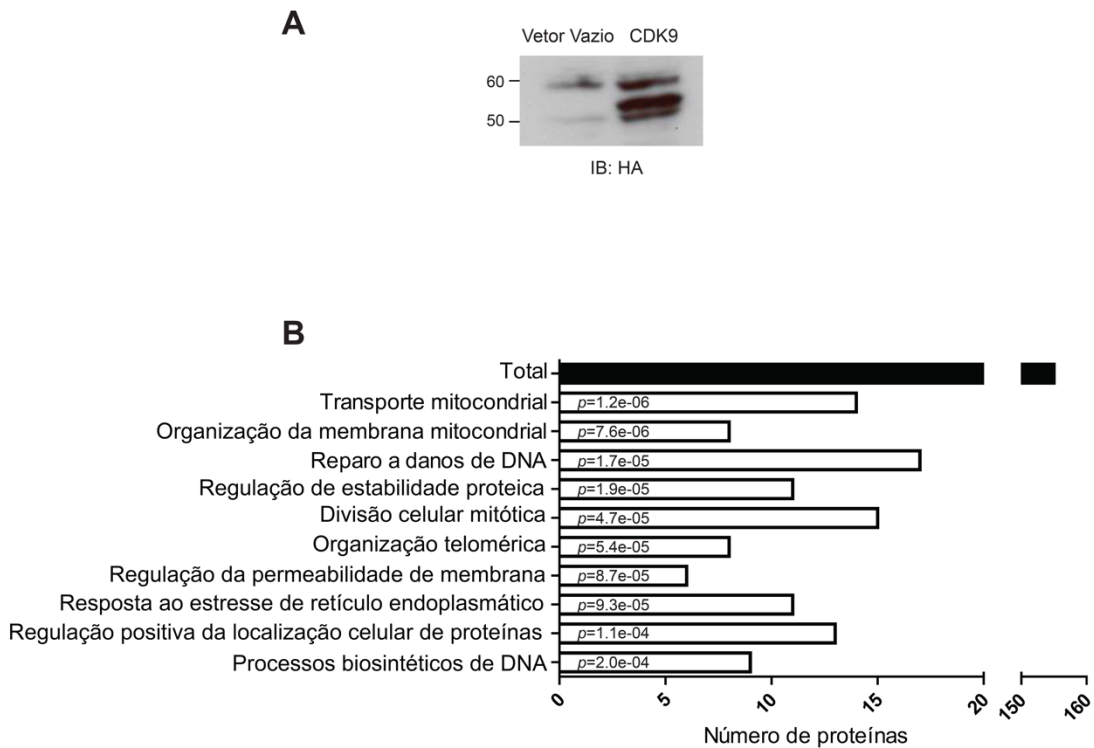


Figura 5.12. Caracterização dos parceiros de interação com CDK9 no contexto de danos ao DNA. (A) Avaliação da produção, em células humanas da linhagem HEK293FT, da proteína de fusão CBP-SBP-CDK9-HA, utilizada nos ensaios de TAP-MS. (B) representação gráfica do enriquecimento ontológico (processos biológicos não redundantes), conduzido pelo *software* WebGestalt, dos putativos parceiros de interação identificados nos ensaios de TAP-MS. $n=2$

É importante ressaltar que parceiros de interação clássicos de CDK9, como AFF4 (componente do complexo PTEF-b) e a subunidade H da RNA polimerase II (POLR2H), também foram identificados nessa varredura de interação. Esses dados suportam o papel de CDK9 na RDD.

6. Discussão

CDK9 é descrita por atuar como subunidade catalítica do complexo PTEF-b durante a etapa de alongamento da transcrição. Entretanto, na última década, estudos independentes demonstraram que CDK9 participa de diversos processos biológicos que visam a manutenção da integridade genômica (CAIRNS et al., 2015; DONNIO et al., 2019; NEPOMUCENO et al., 2017a; YU et al., 2010; ZHANG et al., 2013).

A identificação de CDK9 como putativa parceira de interação com o domínio tBRCT de BRCA1 e BARD1, descrita por Woods e colaboradores (2012), nos levou a investigar funcionalmente a relação entre CDK9 e essas proteínas (WOODS et al., 2012). Dados prévios do nosso grupo confirmaram as interações CDK9/BRCA1 e CDK9/BARD1. Demonstramos, ainda, que CDK9 é recrutada aos sítios de dano no DNA, onde colocaliza com BRCA1. Também mostramos que o recrutamento de BRCA1, bem como o reparo por HR, são dependentes de CDK9 e, por consequência, as células silenciadas para *CDK9* apresentam maior sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**).

No trabalho atual, aprofundamos a caracterização do papel de CDK9 na RDD, demonstrando que o recrutamento da recombinase efetora, RAD51, para os sítios de quebra de dupla fita também ocorre de forma dependente de CDK9 (**Figuras 5.1; página 41**). Os dados de redução dos focos de RAD51 corroboram mecanisticamente nossos resultados prévios. Porém, o comprometimento do recrutamento de RAD51 ocorre em menor extensão do que o previamente observado para BRCA1. Dados da literatura sugerem que RAD51 possa ser recrutada para os sítios de dano ao DNA de forma independente de BRCA1, o que explicaria a proficiência no reparo por HR de células deficientes em BRCA1 e 53BP1 (BELOTSERKOVSKAYA et al., 2020; BUNTING et al., 2010; NAKADA; YONAMINE; MATSUO, 2012; ZONG et al., 2019).

Por outro lado, os resultados apresentados aqui sugerem que o recrutamento de 53BP1 não é dependente de CDK9 (**Figura 5.1; página 41**), indicando que CDK9 atue no reparo a danos no DNA independentemente da via de NHEJ. Dados de Storch e colaboradores (2016) mostraram que o silenciamento de *CDK9* é acompanhado por um aumento do número de focos de 53BP1 que colocalizam com γ H2AX, em modelos de linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

(STORCH; CORDES, 2016), sugerindo que CDK9 não atue alheio ao reparo por NHEJ, mas sim que favoreça o reparo por HR, em detrimento do reparo por NHEJ.

Mecanicamente, o balanço entre as funções de BRCA1 e 53BP1 passa pelo controle da etapa de ressecção. BRCA1, juntamente com CtIP, favorece as etapas iniciais desse processo. Ao passo que 53BP1, numa ação conjunta com RIF1, PTIP e o complexo Shild, atua inibindo a ação das exonucleases responsáveis pela extensão da ressecção inicial (CALLEN et al., 2020; CRUZ-GARCÍA; LÓPEZ-SAAVEDRA; HUERTAS, 2014). Além de atuar com CtIP, BRCA1 é recrutado para os sítios de danos em diferentes momentos, por diversos complexos proteicos. Nossos dados não nos permitem concluir precisamente em qual etapa da via de HR CDK9 atua.

Dados da literatura mostraram que, mediante estresse replicativo, a ausência de CDK9 resulta no acúmulo de RPA na cromatina (YU et al., 2010), sugerindo um papel no controle do recrutamento de RPA para regiões de exposição de fita simples de DNA – como no que ocorre na ressecção das fitas lesionadas.

Durante a sinalização de reparo, proteínas da família das CDKs fosforilam diferentes alvos importantes para a promoção da HR. Dentre essas, destacam-se a fosforilação de NBN, CtIP e Exo1, que promovem a retirada inicial e tardia dos nucleotídeos da fita lesionada (HUSTEDT; DUROCHER, 2016). Uma vez que o controle do processo de ressecção passa pela ação de cinases dependente de ciclinas, e que o silenciamento de CDK9 já foi relacionado à desregulação de etapas subsequentes à exposição da fita simples, seria interessante avaliar o impacto da redução dos níveis de CDK9 na formação de focos de RPA mediante danos ao DNA. Analogamente, também interrogar o efeito do silenciamento concomitante de *CDK9* e *TP53BP1*. Considerando a putativa participação de CDK9 na etapa de ressecção das fitas lesionadas, a redução dos níveis de 53BP1 deveria reverter a deficiência no reparo por HR e a sensibilidade ao tratamento com inibidor de PAPER observado mediante a interferência para *CDK9*. Ainda nesse cenário, poderíamos caracterizar os fenótipos dependentes de CDK9 nas etapas finais do reparo por HR, semelhando ao já observado para PALB2 e RNF168 (BELOTSEKOVSKAYA et al., 2020; ZONG et al., 2019).

Como mencionado anteriormente (**Seção 1 – Introdução**), esses dados compõem parte do manuscrito “*BRCA1 recruitment to DNA damaged sites is dependent*

on CDK9”, publicado no periódico *Cell Cycle* em abril de 2017 (NEPOMUCENO, T. et al., 2017; **Anexo I**).

O trabalho subsequente apresentado aqui é composto por três frentes que buscam caracterizar o papel de CDK9 na via de RDD: (1) a avaliação do papel do complexo CDK9/BRCA1 na sinalização do reparo; (2) a avaliação estrutural e funcional da interação CDK9/CHK2; e (3) a identificação dos putativos parceiros de interação de CDK9 no contexto da RDD.

(1) As evidências acumuladas até aqui, suportam a hipótese de que CDK9 desempenhe um papel importante na via de HR. A deficiência no reparo por HR, está diretamente relacionada ao aumento da sensibilidade ao tratamento com iPARP (BRYANT et al., 2005; EVERS et al., 2010; FARMER et al., 2005; FONG et al., 2009; HORAK et al., 2019; ROTTENBERG et al., 2008). Os resultados apresentados (**Figura 5.2; página 43**) demonstram que o silenciamento de *CDK9* resulta em uma maior sensibilidade ao tratamento com olaparib, corroborando os dados prévios que mostraram a dependência de CDK9 para o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano e conseqüentemente para o reparo por HR. Isoladamente, esses resultados não permitem concluir se o papel desempenhado por CDK9 no reparo de danos no DNA é, de alguma forma, dependente de sua atividade catalítica. Caso a função cinase de CDK9 se mostre necessária para seu papel no contexto de danos no DNA, seria interessante avaliar o impacto da inibição de CDK9 na sensibilização ao tratamento com iPARP, como observado para ATM (MAK; MA; POON, 2020).

Dados prévios mostraram que CDK9 é capaz de interagir de forma independente com duas porções de BRCA1 (domínio RING-finger e tBRCT), bem como com BARD1 (NEPOMUCENO et al., 2017a; **Anexo I**). Entretanto, essas interações foram avaliadas isoladamente. Os dados apresentados na **Figura 5.3.3. (página 50)** demonstram que a interação de CDK9 com a porção N-terminal de BRCA1, ocorre de forma dependente da formação do heterodímero BRCA1/BARD1. Sugerindo que essas proteínas sejam parte de um complexo maior, formado por CDK9, BRCA1 e BARD1. Entretanto, ainda não está claro se a formação desse complexo ternário ocorre somente através do reconhecimento de CDK9 pelos domínios tBRCTs de BRCA1 e BARD1.

A porção C-terminal de CDK9 (região compreendida entre os resíduos de aminoácidos na posição 207 ao 372) foi originalmente identificada por interagir com o domínio tBRCT de BRCA1 (WOODS et al., 2012). CDK9 apresenta nessa região, quatro resíduos de aminoácido (*Glu₃₆₉-Arg₃₇₀-Val₃₇₁-Phe₃₇₂*) que mimetizam a sequência consenso de reconhecimento do domínio tBRCT de BRCA1 (*pSer₀-X₊₁-X₊₂-Phe₊₃*). Os resultados apresentados na **Figura 5.3.1 (página 45)** sugerem que a interação entre BRCA1 e CDK9 ocorra através do reconhecimento do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9 pelo domínio tBRCT de BRCA1.

A escolha da alanina na substituição do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 (CDK9_{E369A}) para avaliar a interação entre CDK9 e BRCA1 baseou-se em estudos mecanísticos que fazem uso dessa ferramenta para avaliar o impacto da inibição de fosforilações de maneira resíduo-específico (CALLEN et al., 2020; ORTHWEIN et al., 2015). Porém, a alanina apresenta grandes diferenças físico-químicas (tamanho, estrutura e polaridade), quando comparada ao ácido glutâmico. Dessa forma, a perda da interação com BRCA1 poderia ser o resultado de alterações mais grosseiras, não restrita à perda da cadeia lateral carregada negativamente que descaracteriza o consenso de reconhecimento pelo tBRCT. Entretanto, os dados apresentados na **Figura 5.3.2 (página 48)** refutam essa hipótese, visto o reestabelecimento da interação entre CDK9_{E369A} e os mutantes L1664P e A1830T de BRCA1. Esses mutantes foram previamente descritos por resultarem na perda de especificidade de reconhecimento de fosfopeptídeos pelo domínio tBRCT, sem desestruturar o domínio (**Figura 5.3.2C; página 48**) (LEE et al., 2010). Por outro lado, ainda se faz necessário avaliar o impacto de mutações que mantenham a especificidade de ligação, bem como e a integridade do domínio tBRCT, na interação com CDK9_{E369A} para confirmar a especificidade do fenômeno observado.

Segundo dados do atlas do genoma do câncer, o resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9 já foi observado mutado para um resíduo de glutamina (CDK9_{E369Q}) em carcinoma urotelial de bexiga (CERAMI et al., 2012; ELLROTT et al., 2018). Diferente da alanina, a glutamina se assemelha ao ácido glutâmico em tamanho, estrutura e polaridade, porém, sem apresentar carga; o que pode corroborar a importância desse resíduo nos processos relacionados a RDD. Tendo em vista a

semelhança entre a glutamina e o ácido glutâmico, bem como a observação em amostra tumoral, seria interessante avaliar o impacto dessa mutação em nossos modelos, enriquecendo o entendimento da interação da porção C-terminal de CDK9 e o domínio tBRCT de BRCA1.

A transdução do sinal ao longo da via de reparo a danos no DNA ocorre através da formação de diferentes complexos proteicos, modulados por modificações pós-traducionais (MPT), como fosforilações e ubiquitinações. BRCA1, por exemplo, atua através da interação com Abraxas, BACH1 e CtIP, mediante reconhecimento de resíduos fosforilados nessas proteínas (SAVAGE; HARKIN, 2015). Esse controle dinâmico é fundamental para que a via não se mantenha constitutivamente ativa, evitando a recombinação indesejada de regiões do genoma (ORTHWEIN et al., 2015). Nossos resultados sugerem que a interação entre BRCA1 e CDK9 não seja modulada por MPTs (**Figura 5.3.2B; página 48**). No entanto, a porção C-terminal de CDK9 apresenta sítios canônicos de fosforilação por ATM/ATR e CHK2. Assim como BRCA1, que apresenta sítios para as mesmas cinases na região próxima ao domínio tBRCT. Não podemos descartar a possibilidade de que a modulação da interação CDK9/BRCA1 passe pelo controle de interação entre CDK9 e/ou BRCA1 com outros parceiros e, eventualmente, a estabilização de um complexo proteico maior.

Tanto BRCA1 quanto CDK9 apresentam relação funcional com processos relacionados a transcrição. BRCA1 já foi identificada como componente da holoenzima RNA polimerase II, além de ser considerada coativadora transcricional de genes relacionados à RDD, como *GADD45A* e *CDKN1A* (DAINO; ICHIMURA; NENOI, 2002). Dados da enciclopédia de elementos do DNA (ENCODE) demonstram o acúmulo de BRCA1 em regiões de iniciação da transcrição (NGUYEN et al., 2018). BRCA1 também é capaz de interagir com COBRA1, componente do complexo de inibição do alongamento da transcrição (NELF) (NAIR et al., 2016; YE et al., 2001). CDK9, por sua vez, atua como subunidade catalítica do complexo que promove o alongamento transcrição (PTEF-b) através da fosforilação da cauda CTD da RNA polimerase II (PAPARIDIS; DURVALE; CANDURI, 2017).

A desestruturação do complexo CDK9/BRCA1, por meio da mutação de um único resíduo de aminoácido na porção C-terminal de CDK9, nos permitiu interrogar o impacto

dessa interação no contexto celular de controle da transcrição e da RDD. Os dados apresentados aqui demonstram que a interação entre CDK9 e BRCA1 é dispensável para a ativação de CDK9 por meio da fosforilação de sua alça T, bem como para a fosforilação da cauda CTD, mediada por CDK9 (**Figura 5.4.1.; página 52**) e para o papel de CDK9 no controle da transcrição, no contexto da região LTR do HIV (**Figura 5.4.2.; página 54**).

Esses resultados permitiram o uso da variante CDK9_{E369A} na avaliação do papel de CDK9 na RDD de forma independente de seu papel na transcrição, restringindo a observação ao impacto da perda de sua interação com BRCA1. Apesar de preliminares ($n=1$), nossos resultados sugerem que a formação do complexo CDK9/BRCA1 é essencial para o recrutamento de BRCA1 aos sítios de danos (**Figura 5.5; página 55**). Dessa forma, se confirmados, eles permitirão dissociar, de forma inédita, a função canônica de CDK9 como subunidade catalítica do complexo PTEF-b, de seu papel no reparo por HR através do recrutamento de BRCA1.

Os resultados apresentados na **Figura 5.5 (página 56)** sugerem que a reconstituição da expressão de *CDK9* usando a variante CDK9_{E369A}, nas células interferidas resulta no modesto reestabelecimento dos focos de BRCA1 pós-dano. Devemos considerar que nosso modelo é de superexpressão e, possivelmente, dada a abundância de CDK9_{E369A} ainda ocorra interação com BRCA1, mesmo que em menor extensão (**Figura 5.3.1; página 45**). Seria interessante avaliar o impacto funcional do comprometimento da interação CDK9/BRCA1 em um modelo de edição genômica (CRISPR/Cas9), de linhagens que expressem *CDK9*_{E369A} sob o controle do promotor natural do gene. Nesse cenário, avaliaríamos o reestabelecimento das funções de BRCA1 através da edição das mesmas células para obtenção dos mutantes BRCA1_{L1664P} ou BRCA1_{A1830T}, no contexto de CDK9_{E369A} constitutivo.

Dados da literatura indicam que proteínas relacionadas à transcrição apresentam papel inicial na RDD. Recentemente, Micheli e colaboradores (2017) mostraram a existência de transcrição, dependente da RNA polimerase II, de regiões adjacentes aos danos no DNA mesmo na ausência de sequência promotora aparente (MICHELINI et al., 2017). Mediante quebra de dupla fita, ocorre o recrutamento rápido da forma fosforilada (no resíduo de serina 2 do heptapeptídeo presente na cauda CTD) da RNA polimerase

II (PESSINA et al., 2019), sugerindo que CDK9 possa atuar nas etapas primordiais de percepção/sinalização do dano. Diferente disso, nossos dados sugerem que células silenciadas para CDK9, e reconstituídas com o mutante E369A, não são capazes de recrutar BRCA1 para os sítios de dano no DNA, apontando que a participação de CDK9 na sinalização seja independente da fosforilação da cauda CTD e, conseqüentemente não relacionada à essa sinalização inicial. Esse dado corrobora a ideia discutida anteriormente, da participação de CDK9 nos processos de ressecção ou etapas imediatamente posteriores.

Vale ressaltar que não podemos descartar a hipótese de que o papel da interação CDK9/BRCA1 passe por outras funções relacionadas à transcrição, desempenhadas por ambas as proteínas e não avaliadas em nosso trabalho, como o controle de formação de híbridos de RNA e DNA (*R-loops*) ou mesmo a aproximação de regiões promotoras e acentuassomos (BACON; D'ORSO, 2019; ZHANG et al., 2019).

(2) A literatura sugere que, em *Saccharomyces cerevisiae*, o ortólogo funcional de CDK9 (Bur1) seja fosforilado pelo ortólogo funcional de CHK1/2 (Rad53) (BASTOSDEOLIVEIRA et al., 2015; SMOLKA et al., 2007). Isso nos levou a investigar a conservação desse mecanismo em modelos de células humanas. Os resultados apresentados nas **Figuras 5.6.1 e 5.6.2 (páginas 58 e 60)** sugerem que a interação CDK9/CHK2 ocorre em células humanas, porém não fomos capazes de mostrar a possível relação cinase-substrato entre CHK2 e CDK9, respectivamente (**Figura 5.6.3, página 62**). Não podemos afirmar com segurança se o resultado observado é decorrente da autofosforilação basal de CDK9_{D167N} ou não. Por outro lado, a eventual independência de CHK2 nos fenótipos relacionado a CDK9 na RDD sugere que a ativação de CHK2 mediante radiação ionizante não seja o melhor modelo para avaliar essa putativa relação cinase-substrato.

Tendo em vista essa limitação, buscamos estabelecer relações circunstanciais que pudessem sustentar nossa hipótese inicial de um papel comum a ambas as proteínas na RDD. Então, avaliamos o impacto da interferência na expressão de *CDK9*, no contexto de proficiência e deficiência de CHK2, em resposta a danos no DNA (**Figura 5.7; página 64**). Os resultados demonstram que a sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante ou iPARP (**Figura 5.8; página 66**), decorrentes da redução dos níveis

de CDK9 são independentes do papel de CHK2. Corroborando a ideia de que o papel da interação CDK9/CHK2 não esteja necessariamente associado ao reparo de danos no DNA.

A família das cinases dependentes de ciclinas pode ser didaticamente dividida em dois grandes grupos. O primeiro, responsável pela transição das diferentes fases do ciclo celular, tendo como componentes canônicos: CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. O outro grupo está relacionado ao controle de processos transcricionais (iniciação e alongamento da transcrição e processamento de RNA, por exemplo), sendo composto, entre outras, por CDK7, CDK8, CDK9, CDK11, CDK12 e CDK13. Dados mais recentes sugerem que as CDKs associadas à transcrição também desempenham papel importante na manutenção da integridade genômica através de mecanismos associados, ou não, ao controle de expressão gênica (GREENLEAF, 2019; NAKAMURA et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

Os dados apresentados na **Figura 5.9** apontam para um papel de CDK9 no controle de parada do ciclo celular mediante tratamento com radiação ionizante. A análise da população de células nas diferentes fases do ciclo celular foi realizada mediante tratamento com 6Gy de radiação ionizante, considerando dados da literatura que demonstraram um pico de atividade cinase de CHK2 com essa dose (DUTIL et al., 2019). Como mostra a **Figura 5.9 (página 68)**, as células HCT116 proficientes para CHK2 e silenciadas para *CDK9* apresentam um acúmulo de células em G2/M (12 e 24 horas após a irradiação), quando comparadas ao controle. Esse acúmulo é exacerbado nas células deficientes para CHK2, indicando que essas células apresentam uma maior dependência dos mecanismos controlados por CDK9. Esses dados corroboram a hipótese de que CDK9 e CHK2 não atuem juntas no controle do ciclo celular na RDD. Nossos dados não permitem estabelecer exatamente em qual ponto de checagem do ciclo CDK9 exerce seu papel no controle do ciclo celular. Também não fica claro se o papel de CDK9 no controle do ciclo celular está relacionado à sua interação com BRCA1.

Considerando dados de Yu e colaboradores (2010), que apontam um papel para CDK9 no controle da fase S do ciclo, mediante estresse replicativo (YU et al., 2010; ZHANG et al., 2013), em conjunto com nossos resultados, seria razoável especular que CDK9 atue na manutenção da integridade genômica não só pelo reparo a danos no DNA,

como também através do controle do ciclo celular em resposta a diferentes estímulos genotóxicos.

Com o intuito de entender melhor a relação entre CDK9, BRCA1 e CHK2, avaliamos a rede de interação comum a estas proteínas (**Figura 5.10.1; página 70**). Dentre os parceiros de interação identificados, a relação com a cinase PLK1 chamou nossa atenção. PLK1 apresenta funções relacionadas à manutenção da integridade genômica e também já foi identificada por controlar o papel de CDK9 durante a transcrição (JIANG et al., 2013).

PLK1 atua no controle de parada em G2/M, mediante danos ao DNA. Após a parada do ciclo celular na fase G2, e reparo efetivo dos danos no DNA, a célula retorna ao ciclo celular. Esse processo de reentrada em mitose, é primordialmente controlado pela ação do complexo formado por BORA, Aurora A e PLK1 (LINDQVIST; RODRÍGUEZ-BRAVO; MEDEMA, 2009; MACŮREK et al., 2008; QIN et al., 2013; SHALTIEL et al., 2015; VAN VUGT et al., 2010). Curiosamente, já foi demonstrado que CDK9 modula a interação entre BORA com MDC1 na RDD (CAIRNS et al., 2015).

Além de seu papel no controle de ciclo celular, PLK1 interage e inibe a atividade transcricional de CDK9. Dados de Jiang e colaboradores (2013) mostraram que PLK1 fosforila a ciclina T, inibindo a fosforilação da cauda CTD promovida pelo complexo PTEF-b, além de reduzir a transativação da porção LTR do HIV, mediada por CDK9. Os dados apresentados na **Figura 5.10.2 (página 72)** sugerem que os níveis de PLK1 respondem a oscilações nos níveis de CDK9 e CHK2, sendo observado reduzido nas células interferidas para *CDK9*. Curiosamente, as células deficientes para CHK2 apresentam níveis elevados de PLK1, que não se alteram mediante silenciamento de *CDK9*. Esses resultados não nos permitem concluir se a variação dos níveis de PLK1 é decorrente de um controle transcricional, traducional ou pós-traducional. Porém, dados do ENCODE indicam um acúmulo de ciclina T2 na região de iniciação da transcrição de *PLK1* (DAVIS et al., 2018). Isso pode sugerir que o complexo PTEF-b apresente algum papel no controle transcricional desse gene, o que poderia representar um putativo eixo de sinalização composto por CHK2, CDK9 e PLK1.

Adicionalmente, CHK2 foi descrita por promover o processamento do RNA mensageiro mediante fosforilação de CDK11. Sugerindo que CHK2 também participe do

processo de controle de expressão gênica através da interação com um membro da família das CDKs associado à transcrição, assim como CDK9 (CHOI et al., 2014).

Tendo em vista essa variação nos níveis de PLK1, bem como seu papel na inibição de CDK9, avaliamos os níveis de transativação da região LTR do HIV, mediada por CDK9, nas células HCT116 nos diferentes contextos de proficiência para CHK2 (**Figura 5.11; página 74**). Os resultados indicam que a ausência de CHK2 é acompanhada pela diminuição da atividade de transativação, corroborando a hipótese de que possa existir algum eixo de controle mediado por CHK2-CDK9-PLK1. Seria interessante caracterizar essa putativa relação através de ensaios de fosforilação *in vitro*, bem como de reconstituição de CDK9, ciclina T1, CHK2 e/ou PLK1 em nossos modelos celulares. Importante ressaltar que não podemos descartar a hipótese de que os níveis da proteína de fusão GAL4-CDK9, utilizada como transativadora transcricional, não estejam equivalentes nas duas linhagens avaliadas.

Dados da literatura indicam que a fosforilação de CDK9 no resíduo de serina na posição 175 resulta no aumento da transcrição do HIV, em linfócitos T CD4⁺ (MBONYE et al., 2013). Como mostrado na **Figura 5.6.3 (página 62)**, esse resíduo de serina se encontra no contexto de fosforilação por CHK2, o que poderia justificar a redução da transativação mediada por CDK9 nas células HCT116 CHEK2^{-/-}. Considerando essa putativa regulação mediante a fosforilação de CDK9 por CHK2, seria interessante avaliar a capacidade de mutantes fosfomiméticos e/ou dominantes negativos nessa posição (S175) reverterem o fenótipo observado na **figura 5.6.3**.

Coletivamente, nossos resultados sugerem que CDK9 atue na RDD não apenas pelo reparo de danos no DNA, como através do controle de parada do ciclo celular. Por outro lado, a relação CDK9/CHK2 parece estar relacionada a seu papel na transcrição, através da relação com PLK1. Também não podemos ignorar que essa putativa relação CDK9-CHK2-PLK1 apresente algum impacto em funções relacionadas a RDD ainda não avaliadas.

(3) De forma geral, a identificação de novos parceiros de interação (**Anexos III e IV**), bem como o enriquecimento das vias celulares das quais estas proteínas fazem parte (**Figura 5.12; página 76**), possibilitam uma visão mais larga das possíveis funções desempenhadas por CDK9 no contexto da RDD. A identificação de MERIT40 na

varredura por TAP-MS (**Anexo II**), por exemplo, sugere a participação de CDK9 no complexo BRCA1-A, que já foi descrito por modular o recrutamento de BRCA1, o reparo por HR e o controle do ciclo celular em situações de dano ao DNA (FENG; HUANG; CHEN, 2009; HU et al., 2011; SAVAGE; HARKIN, 2015).

Paralelamente, a confirmação da interação, previamente descrita, com p53 (**Anexo II**) pode se apresentar como um caminho para elucidação do papel de CDK9 no controle do ciclo celular. CDK9 foi descrita por fosforilar p53 *in vitro*, nos resíduos de serina nas posições 33, 315 e 392. A fosforilação de p53 e Pirh2, mediada por CDK9, se mostraram importantes para o controle de estabilidade de p53 (BAGASHEV et al., 2013; RADHAKRISHNAN; GARTEL, 2006). Sugerindo que CDK9 possa atuar, mediante danos no DNA, promovendo a estabilização de p53 e promovendo indiretamente o controle do ciclo celular em RDD.

A confirmação e caracterização destas interações são dados importantes para elucidarmos as funções moleculares de CDK9 nesse contexto.

7. Conclusões

Neste trabalho, consolidamos a participação de CDK9 no reparo a danos no DNA através da sinalização de HR, mas não NHEJ. Demonstramos também que a ausência de CDK9 resulta na sensibilização das células à inibição de PARP, corroborando sua participação no reparo por HR.

Os dados apresentados indicam que CDK9 participe de um complexo composto por BRCA1 e BARD1, e que a interação entre CDK9 e BRCA1 seja mediada pelo reconhecimento do resíduo de ácido glutâmico na posição 369 de CDK9, pelo domínio tBRCT de BRCA1. Os resultados estabelecem que a interação CDK9/BRCA1 é dispensável para as funções canônicas de CDK9 no processamento transcricional, entretanto, parece ser importante para o recrutamento de BRCA1 para os sítios de dano no DNA.

Confirmamos a hipótese de conservação da interação entre CDK9 e CHK2, em células humanas. Porém, CHK2 não se mostrou importante na sensibilização de células à tratamentos genotóxicos, mediada por CDK9. Nossos dados indicam um papel de CDK9 no controle de parada do ciclo celular mediante danos no DNA, de forma independente de CHK2. Por outro lado, caracterizamos a relação entre CDK9 e CHK2 no controle dos níveis de PLK1 e no processo transcricional mediados por CDK9.

Identificamos também a rede de interação proteica de CDK9 mediante quebra de dupla fita, corroborando sua participação na RDD através da interação com proteínas relacionadas a processos de reparo a danos no DNA e controle do ciclo celular.

Coletivamente, nossos dados estabelecem CDK9 como uma proteína importante na manutenção da integridade genômica através da sinalização do reparo e controle do ciclo celular, e apontam para uma função de CHK2 no controle transcricional mediado por CDK9.

8. Referências bibliográficas

- AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. **Causes of Genome Instability**. Annual Review of Genetics, v. 47, n. 1, p. 1–32, 23 nov. 2013.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 5th. ed. [s.l.] Garland Science, 2006.
- AMMOSOVA, T. et al. **Expression of a protein phosphatase 1 inhibitor, cdNIPP1, increases CDK9 threonine 186 phosphorylation and inhibits HIV-1 transcription**. The Journal of biological chemistry, v. 286, n. 5, p. 3798–804, 4 fev. 2011a.
- AMMOSOVA, T. et al. **Protein phosphatase-1 activates CDK9 by dephosphorylating Ser175**. PloS one, v. 6, n. 4, p. e18985, 21 abr. 2011b.
- ANAND, R. et al. **NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation**. The EMBO journal, v. 38, n. 7, 1 abr. 2019.
- ANDOR, N.; MALEY, C. C.; JI, H. P. **Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance**. Cancer Research, v. 77, n. 9, p. 2179–2185, 1 maio 2017.
- ARCAS, A. et al. **Emergence and Evolutionary Analysis of the Human DDR Network: Implications in Comparative Genomics and Downstream Analyses**. Molecular Biology and Evolution, v. 31, n. 4, p. 940–961, 1 abr. 2014.
- BACON, C. W.; D'ORSO, I. **CDK9: a signaling hub for transcriptional control**. Transcription, v. 10, n. 2, p. 57–75, 15 mar. 2019.
- BAER, R.; LUDWIG, T. **The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity**. Curr Opin Genet Dev. 2002 Feb;12(1):86-91
- BAGASHEV, A. et al. **Cdk9 phosphorylates Pirh2 protein and prevents degradation of p53 protein**. Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 12, n. 10, p. 1569–77, 15 maio 2013.
- BASTOSDEOLIVEIRA, F. M. et al. **Phosphoproteomics Reveals Distinct Modes of**

- Mec1/ATR Signaling during DNA Replication.** Molecular Cell, v. 57, n. 6, p. 1124–1132, 19 mar. 2015.
- BELOTSERKOVSKAYA, R. et al. **PALB2 chromatin recruitment restores homologous recombination in BRCA1-deficient cells depleted of 53BP1.** Nature Communications, v. 11, n. 1, p. 819, 10 dez. 2020.
- BLAZEK, D. et al. **The cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes.** Genes and Development, v. 25, n. 20, p. 2158–2172, 15 out. 2011.
- BOTUYAN, M. V. E. et al. **Structural basis of BACH1 phosphopeptide recognition by BRCA1 tandem BRCT domains.** Structure, v. 12, n. 7, p. 1137–1146, jul. 2004.
- BRADFORD, M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRAUNS-SCHUBERT, P. et al. **CDK9-mediated phosphorylation controls the interaction of TIP60 with the transcriptional machinery.** EMBO reports, v. 19, n. 2, p. 244–256, fev. 2018.
- BRÈS, V.; YOH, S. M.; JONES, K. A. **The multi-tasking P-TEFb complex.** Current opinion in cell biology, v. 20, n. 3, p. 334–40, jun. 2008.
- BRYANT, H. E. et al. **Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.** Nature, v. 434, n. 7035, p. 913–917, 14 abr. 2005.
- BUNTING, S. F. et al. **53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks.** Cell, v. 141, n. 2, p. 243–254, 16 abr. 2010.
- CAIRNS, J. et al. **Bora downregulation results in radioresistance by promoting repair of double strand breaks.** PloS one, v. 10, n. 3, p. e0119208, 5 mar. 2015.
- CALLEBAUT, I.; MORNON, J. P. **From BRCA1 to RAP1: A widespread BRCT module closely associated with DNA repair.** FEBS Letters, v. 400, n. 1, p. 25–30, 2 jan.

1997.

- CALLEN, E. et al. **53BP1 Enforces Distinct Pre- and Post-resection Blocks on Homologous Recombination.** Molecular cell, v. 77, n. 1, p. 26- 38.e7, 2 jan. 2020.
- CERAMI, E. et al. **The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.** Cancer Discovery, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012.
- CHABALIER-TASTE, C. et al. **BRCA1 is regulated by Chk2 in response to spindle damage.** Biochimica et biophysica acta, v. 1783, n. 12, p. 2223–33, dez. 2008.
- CHEHAB, N. H. et al. **Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53.** Genes and Development, v. 14, n. 3, p. 278–288, 1 fev. 2000.
- CHO, S.; SCHROEDER, S.; OTT, M. **CYCLINg through transcription: Posttranslational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation** Cell Cycle. 2010 May;9(9):1697-705
- CHOI, H. H. et al. **CHK2 kinase promotes pre-mRNA splicing via phosphorylating CDK11 p110.** Oncogene, v. 33, n. 1, p. 108–115, 2 jan. 2014.
- CLAPPERTON, J. A. et al. **Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer.** Nature structural & molecular biology, v. 11, n. 6, p. 512–8, jun. 2004.
- CLARK, S. L. et al. **Structure-function of the tumor suppressor BRCA1** Comput Struct Biotechnol J. 2012 Apr 1;1(1).
- CLAUDIO, P. P. et al. **Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII.** Journal of Cellular Physiology, v. 208, n. 3, p. 602–612, set. 2006.
- CRNCEC, A.; HOCHEGGER, H. **Triggering mitosis.** FEBS Letters, v. 593, n. 20, p. 2868–2888, 24 out. 2019.
- CRUZ-GARCÍA, A.; LÓPEZ-SAAVEDRA, A.; HUERTAS, P. **BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection.** Cell reports, v. 9, n. 2, p. 451–9, 23 out. 2014.
- DAINO, K.; ICHIMURA, S.; NENOI, M. **Early Induction of CDKN1A (p21) and**

- GADD45 mRNA by a Low Dose of Ionizing Radiation is due to Their Dose-Dependent Post-transcriptional Regulation**. Radiation Research, v. 157, n. 4, p. 478–482, 1 abr. 2002.
- DALAL, S. N. et al. **Cytoplasmic Localization of Human cdc25C during Interphase Requires an Intact 14-3-3 Binding Site**. Molecular and Cellular Biology, v. 19, n. 6, p. 4465–4479, 1 jun. 1999.
- DALEY, J. M.; SUNG, P. **53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks**. Molecular and cellular biology, v. 34, n. 8, p. 1380–8, abr. 2014.
- DAVIS, C. A. et al. **The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): Data portal update**. Nucleic Acids Research, v. 46, n. D1, p. D794–D801, 1 jan. 2018.
- DE GOOIJER, M. C. et al. **The G2 checkpoint—a node-based molecular switch**. FEBS Open Bio, v. 7, n. 4, p. 439–455, 1 abr. 2017.
- DONNIO, L.-M. et al. **CSB-Dependent Cyclin-Dependent Kinase 9 Degradation and RNA Polymerase II Phosphorylation during Transcription-Coupled Repair**. Molecular and Cellular Biology, v. 39, n. 6, 2 jan. 2019.
- DONZELLI, M.; DRAETTA, G. F. **Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation** EMBO Rep. 2003 Jul;4(7):671-7.
- DULLA, K. et al. **Quantitative site-specific phosphorylation dynamics of human protein kinases during mitotic progression**. Molecular and Cellular Proteomics, v. 9, n. 6, p. 1167–1181, jun. 2010.
- DUTIL, J. et al. **Germline variants in cancer genes in high-risk non-BRCA patients from Puerto Rico**. Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 17769, 28 nov. 2019.
- ELIA, A. E. H. et al. **Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response**. Molecular cell, v. 59, n. 5, p. 867–81, 3 set. 2015.
- ELLROTT, K. et al. **Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines**. Cell Systems, v. 6, n. 3, p. 271-

281.e7, 28 mar. 2018.

ENGBRECHT, J.; BRENT, R.; KADERBHAI, M. A. **Minipreps of Plasmid DNA**. Current Protocols in Molecular Biology, v. 15, n. 1, p. Unit1.6, jul. 1991.

ERTYCH, N. et al. **CHK2-BRCA1 tumor-suppressor axis restrains oncogenic Aurora-A kinase to ensure proper mitotic microtubule assembly**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 113, n. 7, p. 1817–22, 16 fev. 2016.

Estimativa 2020 de Incidência de Câncer no Brasil. INCA, 2020.

EVERS, B. et al. **A high-throughput pharmaceutical screen identifies compounds with specific toxicity against BRCA2-deficient tumors**. Clinical Cancer Research, v. 16, n. 1, p. 99–108, 1 jan. 2010.

FALCK, J. et al. **The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis**. Nature, v. 410, n. 6830, p. 842–847, 12 abr. 2001.

FANG, L. et al. **ATM regulates NF- κ B-dependent immediate-early genes via RelA ser 276 phosphorylation coupled to CDK9 promoter recruitment**. Nucleic Acids Research, v. 42, n. 13, p. 8416–8432, jul. 2014.

FARMER, H. et al. **Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy**. Nature, v. 434, n. 7035, p. 917–921, 14 abr. 2005.

FENG, L.; HUANG, J.; CHEN, J. **MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair**. Genes & development, v. 23, n. 6, p. 719–28, 15 mar. 2009.

FERNANDES, V. C. et al. **Impact of amino acid substitutions at secondary structures in the BRCT domains of the tumor suppressor BRCA1: Implications for clinical annotation**. The Journal of biological chemistry, v. 294, n. 15, p. 5980–5992, 2019.

FISHEL, R. et al. **The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer**. Cell, v. 75, n. 5, p. 1027–1038, 3 dez. 1993.

- FLOYD, S. R. et al. **The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling.** Nature, v. 498, n. 7453, p. 246–50, 13 jun. 2013.
- FONG, P. C. et al. **Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers.** New England Journal of Medicine, v. 361, n. 2, p. 123–134, 9 jul. 2009.
- FONG, Y. W.; CATTOGLIO, C.; TJIAN, R. **The Intertwined Roles of Transcription and Repair** Mol Cell. 2013 Nov 7;52(3):291-302.
- FREEMAN, A. K.; DAPIC, V.; MONTEIRO, A. N. A. **Negative regulation of CHK2 activity by protein phosphatase 2A is modulated by DNA damage.** Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 9, n. 4, p. 736–47, 15 fev. 2010.
- FRIEDBERG, E. C. **DNA damage and repair** Nature. 2003 Jan 23;421(6921):436-40.
- FU, T. J. et al. **Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription.** Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 49, p. 34527–34530, 3 dez. 1999.
- FUJINAGA, K. et al. **The Ability of Positive Transcription Elongation Factor b To Transactivate Human Immunodeficiency Virus Transcription Depends on a Functional Kinase Domain, Cyclin T1, and Tat.** Journal of Virology, v. 72, n. 9, p. 7154–7159, 1 set. 1998.
- FUKUDA, T. et al. **Functional Link between BRCA1 and BAP1 through Histone H2A, Heterochromatin and DNA Damage Response.** Current Cancer Drug Targets, v. 16, n. 2, p. 101–109, 13 jan. 2016.
- GARDINI, A. et al. **Genome-wide analysis reveals a role for BRCA1 and PALB2 in transcriptional co-activation.** The EMBO journal, v. 33, n. 8, p. 890–905, 16 abr. 2014.
- GLOBOCAN 2018 : Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Disponível em: <<http://www.globocan.iarc.fr/>>.
- GLOVER, J. N. M.; WILLIAMS, R. S.; LEE, M. S. **Interactions between BRCT repeats**

- and phosphoproteins: tangled up in two.** Trends in biochemical sciences, v. 29, n. 11, p. 579–85, nov. 2004.
- GOLDBERG, M. et al. **MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint.** Nature, v. 421, n. 6926, p. 952–956, 27 fev. 2003.
- GRAÑA, X. et al. **PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, n. 9, p. 3834–3838, 26 abr. 1994.
- GRAWUNDER, U. et al. **DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes.** Molecular Cell, v. 2, n. 4, p. 477–484, 1998.
- GREENLEAF, A. L. Human **CDK12 and CDK13, multi-tasking CTD kinases for the new millenium** Transcription. 2019 Apr;10(2):91-110.
- HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V. G.; BARTEK, J. **An oncogene-induced DNA damage model for cancer development** Science. 2008 Mar 7;319(5868):1352-5.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer** Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. **A. Hallmarks of cancer: The next generation** Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- HASHIZUME, R. et al. **The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 18, p. 14537–14540, 4 maio 2001.
- HLUBEK, F. et al. **Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator.** Journal of Biochemistry, v. 129, n. 4, p. 635–641, abr. 2001.
- HORAK, P. et al. **Response to olaparib in a PALB2 germline mutated prostate cancer and genetic events associated with resistance.** Cold Spring Harbor Molecular Case Studies, v. 5, n. 2, 2019.

- HU, Y. et al. **RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci.** Genes & development, v. 25, n. 7, p. 685–700, 1 abr. 2011.
- HUSTEDT, N.; DUROCHER, D. **The control of DNA repair by the cell cycle.** Nature cell biology, v. 19, n. 1, p. 1–9, 23 dez. 2016.
- ITZEN, F. et al. **Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation.** Nucleic Acids Research, v. 42, n. 12, p. 7577–7590, jul. 2014.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. **The DNA-damage response in human biology and disease** Nature. 2009 Oct 22;461(7267):1071-8
- JERONIMO, C. et al. **Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme.** Molecular Cell, v. 27, n. 2, p. 262–274, 20 jul. 2007.
- JIANG, L. et al. **Polo-Like Kinase 1 Inhibits the Activity of Positive Transcription Elongation Factor of RNA Pol II b (P-TEFb).** PLoS ONE, v. 8, n. 8, p. e72289, 16 ago. 2013.
- JOO, W. S. et al. **Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure.** Genes and Development, v. 16, n. 5, p. 583–593, 1 mar. 2002.
- JOUKOV, V.; DE NICOLO, A. **Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis.** Science signaling, v. 11, n. 543, 14 ago. 2018.
- JOWSEY, P. A.; DOHERTY, A. J.; ROUSE, J. **Human PTIP facilitates ATM-mediated activation of p53 and promotes cellular resistance to ionizing radiation.** The Journal of biological chemistry, v. 279, n. 53, p. 55562–9, 31 dez. 2004.
- KALB, R. et al. **BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase.** Cell reports, v. 8, n. 4, p. 999–1005, 21 ago. 2014.
- KARNITZ, L. M.; ZOU, L. **Molecular pathways: Targeting ATR in cancer therapy.** Clinical Cancer Research, v. 21, n. 21, p. 4780–4785, 1 nov. 2015.

- KASHIWABA, S. et al. **USP7 Is a Suppressor of PCNA Ubiquitination and Oxidative-Stress-Induced Mutagenesis in Human Cells.** Cell reports, v. 13, n. 10, p. 2072–80, 15 dez. 2015.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. **Cell-cycle checkpoints and cancer** Nature. 2004 Nov 18;432(7015):316-23.
- KENNEDY, R. D.; D'ANDREA, A. D. **DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes.** Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 24, n. 23, p. 3799–808, 10 ago. 2006.
- KIM, R. Q.; SIXMA, T. K. **Regulation of USP7: A High Incidence of E3 Complexes.** Journal of molecular biology, v. 429, n. 22, p. 3395–3408, 10 nov. 2017.
- KOONIN, E. V.; ALTSCHUL, S. F.; BORK, P. **...Functional Motifs...** Nature Genetics, v. 13, n. 3, p. 266–268, 1996.
- KUMARASWAMY, E.; SHIEKHATTAR, R. **Activation of BRCA1/BRCA2-Associated Helicase BACH1 Is Required for Timely Progression through S Phase.** Molecular and Cellular Biology, v. 27, n. 19, p. 6733–6741, 1 out. 2007.
- LAIBLE, M.; BOONROD, K. **Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids.** Journal of visualized experiments : JoVE, n. 27, 11 maio 2009.
- LAROCHELLE, S. et al. **Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II.** Nature Structural and Molecular Biology, v. 19, n. 11, p. 1108–1115, nov. 2012.
- LEACH, F. S. et al. **Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** Cell, v. 75, n. 6, p. 1215–25, 17 dez. 1993.
- LEE, M. S. et al. **Comprehensive analysis of missense variations in the BRCT domain of BRCA1 by structural and functional assays.** Cancer research, v. 70, n. 12, p. 4880–90, 15 jun. 2010.
- LI, M. L.; GREENBERG, R. A. **Links between genome integrity and BRCA1 tumor**

- suppression** Trends Biochem Sci. 2012 Oct;37(10):418-24
- LINDQVIST, A.; RODRÍGUEZ-BRAVO, V.; MEDEMA, R. H. **The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry** J Cell Biol. 2009 Apr 20;185(2):193-202.
- LONGO, P. A. et al. **Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)**. Methods Enzymol. 2013;529:227-40.
- LORICK, K. L. et al. **RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 20, p. 11364–11369, 28 set. 1999.
- LOU, Z. et al. **MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals**. Molecular cell, v. 21, n. 2, p. 187–200, 20 jan. 2006.
- LOWNDES, N. F.; MURGUIA, J. R. **Sensing and responding to DNA damage**. Current opinion in genetics & development, v. 10, n. 1, p. 17–25, fev. 2000.
- MA, Y. et al. **CDKN1C negatively regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in an E2F1-dependent manner**. Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 13, p. 9813–9822, 26 mar. 2010.
- MACŮREK, L. et al. **Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery**. Nature, v. 455, n. 7209, p. 119–123, 4 set. 2008.
- MAK, A. B. et al. **A lentiviral functional proteomics approach identifies chromatin remodeling complexes important for the induction of pluripotency**. Molecular and Cellular Proteomics, v. 9, n. 5, p. 811–823, maio 2010.
- MAK, J. P. Y.; MA, H. T.; POON, R. Y. C. **Synergism between ATM and PARP1 Inhibition Involves DNA Damage and Abrogating the G2 DNA Damage Checkpoint**. Molecular cancer therapeutics, v. 19, n. 1, p. 123–134, 1 jan. 2020.
- MAKHARASHVILI, N. et al. **Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection**. Molecular Cell, v. 54,

- n. 6, p. 1022–1033, 19 jun. 2014.
- MALEWICZ, M.; PERLMANN, T. **Function of transcription factors at DNA lesions in DNA repair** Exp Cell Res. 2014 Nov 15;329(1):94-100.
- MARTIN, A. et al. **BisoGenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis.** BMC bioinformatics, v. 11, p. 91, 17 fev. 2010.
- MARZEC, K. A. et al. **BARD1 splice variants display mislocalization in breast cancer cells and can alter the apoptotic response to cisplatin.** Cancer Letters, v. 381, n. 1, p. 149–155, 10 out. 2016.
- MATSUOKA, S. et al. **ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage.** Science, v. 316, n. 5828, p. 1160–1166, 25 maio 2007.
- MATSUOKA, S.; HUANG, M.; ELLEDGE, S. J. **Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase.** Science, v. 282, n. 5395, p. 1893–1897, 4 dez. 1998.
- MBONYE, U. R. et al. **Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4(+) T lymphocytes.** PLoS pathogens, v. 9, n. 5, p. e1003338, maio 2013.
- MCGARRY, E. et al. **The Deubiquitinase USP9X Maintains DNA Replication Fork Stability and DNA Damage Checkpoint Responses by Regulating CLASPIN during S-Phase.** Cancer research, v. 76, n. 8, p. 2384–93, 15 abr. 2016.
- MESQUITA, R. D. et al. **Tandem BRCT Domains: DNA's Praetorian Guard.** Genes & cancer, v. 1, n. 11, p. 1140–6, nov. 2010.
- MICHELINI, F. et al. **Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks.** Nature Cell Biology, v. 19, n. 12, p. 1400–1411, 29 nov. 2017.
- MIKI, Y. et al. **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** Science, v. 266, n. 5182, p. 66–71, 1994.
- MOHAMMAD, D. H.; YAFFE, M. B. **14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains**

- in the DNA damage response.** DNA Repair, v. 8, n. 9, p. 1009–1017, 2 set. 2009.
- MORRIS, J. R.; KEEP, N. H.; SOLOMON, E. **Identification of residues required for the interaction of BARD1 with BRCA1.** The Journal of biological chemistry, v. 277, n. 11, p. 9382–6, 15 mar. 2002.
- MULLIS, K. et al. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 51, n. 1, p. 263–273, 1986.
- NAIR, S. J. et al. **Genetic suppression reveals DNA repair-independent antagonism between BRCA1 and COBRA1 in mammary gland development.** Nature communications, v. 7, p. 10913, 4 mar. 2016.
- NAKADA, S.; YONAMINE, R. M.; MATSUO, K. **RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1.** Cancer research, v. 72, n. 19, p. 4974–83, 1 out. 2012.
- NAKAMURA, A. et al. **CDK8/19 inhibition induces premature G1/S transition and ATRdependent cell death in prostate cancer cells.** Oncotarget, v. 9, n. 17, p. 13474–13487, 2 mar. 2018.
- NEGRINI, S.; GORGOLIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. **Genomic instability an evolving hallmark of cancer** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Mar;11(3):220-8.
- NEPOMUCENO, T. C. **Avaliação do papel de CDK9 no reparo ao dano de DNA.** Dissertação de mestrado - INCA, 2016.
- NEPOMUCENO, T. C. et al. **BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9.** Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 16, n. 7, p. 665–672, 3 abr. 2017a.
- NEPOMUCENO, T. C. et al. **The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition.** International journal of molecular sciences, v. 18, n. 9, 31 ago. 2017b.
- NGUYEN, D. D. et al. **Integrative bioinformatics and functional analyses of GEO, ENCODE, and TCGA reveal FADD as a direct target of the tumor suppressor**

- BRCA1**. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 5, 14 maio 2018.
- NIELSEN, F. C.; VAN OVEREEM HANSEN, T.; SØRENSEN, C. S. **Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways**. Nature reviews. Cancer, v. 16, n. 9, p. 599–612, 1 set. 2016.
- NISHIKAWA, H. et al. **Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase**. The Journal of biological chemistry, v. 279, n. 6, p. 3916–24, 6 fev. 2004.
- O'BRIEN, S. K. et al. **P-TEFb kinase complex phosphorylates histone H1 to regulate expression of cellular and HIV-1 genes**. The Journal of biological chemistry, v. 285, n. 39, p. 29713–20, 24 set. 2010.
- O'BRIEN, S. K.; KNIGHT, K. L.; RANA, T. M. **Phosphorylation of histone H1 by P-TEFb is a necessary step in skeletal muscle differentiation**. Journal of cellular physiology, v. 227, n. 1, p. 383–9, jan. 2012.
- O'DEA, R.; SANTOCANALE, C. **Non-canonical regulation of homologous recombination DNA repair by the USP9X deubiquitinase**. Journal of cell science, 21 jan. 2020.
- ORTHWEIN, A. et al. **A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells**. Nature, v. 528, n. 7582, p. 422–426, 17 dez. 2015.
- OUCHI, T. **BRCA1 phosphorylation: Biological consequences**. Cancer Biol Ther. 2006 May;5(5):470-5.
- OUGHTRIED, R. et al. **The BioGRID interaction database: 2019 update**. Nucleic Acids Research, v. 47, n. D1, p. D529–D541, 8 jan. 2019.
- PANIER, S.; BOULTON, S. J. **Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jan;15(1):7-18.
- PAPARIDIS, N. F. D. S.; DURVALE, M. C.; CANDURI, F. **The emerging picture of CDK9/P-TEFb: more than 20 years of advances since PITALRE**. Molecular bioSystems, v. 13, n. 2, p. 246–276, 31 jan. 2017.

- PARAMESWARAN, B. et al. **Damage-induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection.** Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 14, n. 3, p. 437–48, 1 fev. 2015.
- PAULL, T. T. et al. **A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.** Current Biology, v. 10, n. 15, p. 886–895, 1 ago. 2000.
- PENG, C. Y. et al. **Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25c on serine-216.** Science, v. 277, n. 5331, p. 1501–1505, 5 set. 1997.
- PESSINA, F. et al. **Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors.** Nature Cell Biology, v. 21, n. 10, p. 1286–1299, 1 out. 2019.
- PETRINI, J. H. J.; STRACKER, T. H. **The cellular response to DNA double-strand breaks: Defining the sensors and mediators.** Trends in Cell Biology, v. 13, n. 9, p. 458–462, 2003.
- PFEFFER, C. M.; HO, B. N.; SINGH, A. T. K. **The Evolution, Functions and Applications of the Breast Cancer Genes BRCA1 and BRCA2.** Cancer genomics & proteomics, v. 14, n. 5, p. 293–298, 1 set. 2017.
- PING, Y. H.; RANA, T. M. **DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation.** The Journal of biological chemistry, v. 276, n. 16, p. 12951–8, 20 abr. 2001.
- PONGAS, G. et al. **BRD4 facilitates DNA damage response and represses CBX5/Heterochromatin protein 1 (HP1).** Oncotarget, v. 8, n. 31, p. 51402–51415, 1 ago. 2017.
- QIN, B. et al. **Ataxia telangiectasia-mutated- and Rad3-related protein regulates the DNA damage-induced G2/M checkpoint through the Aurora A cofactor Bora protein.** Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 22, p. 16139–16144, 31 maio

2013.

RADHAKRISHNAN, S. K.; GARTEL, A. L. **CDK9 Phosphorylates p53 on Serine Residues 33, 315 and 392** Cell Cycle. 2006 Mar;5(5):519-21.

RAPPOLD, I. et al. **Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways**. Journal of Cell Biology, v. 152, n. 3, p. 613–620, 5 fev. 2001.

RICE, A. P. **Roles of CDKs in RNA polymerase II transcription of the HIV-1 genome** Transcription. 2019 Apr;10(2):111-117.

RIPPERGER, T. et al. **Breast cancer susceptibility: Current knowledge and implications for genetic counselling** Eur J Hum Genet. 2009 Jun;17(6):722-31.

ROMANO, G.; GIORDANO, A. **Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases**. Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 7, n. 23, p. 3664–8, 1 dez. 2008.

ROSEN, E. M.; FAN, S.; MA, Y. **BRCA1 regulation of transcription**. Cancer letters, v. 236, n. 2, p. 175–85, 18 maio 2006.

ROTTENBERG, S. et al. **High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 44, p. 17079–17084, 4 nov. 2008.

RUFFNER, H. et al. **Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 98, n. 9, p. 5134–9, 24 abr. 2001.

SAURIN, A. J. et al. **Does this have a familiar RING?** Trends in biochemical sciences, v. 21, n. 6, p. 208–14, jun. 1996.

SAVAGE, K. I.; HARKIN, D. P. **BRCA1, a “complex” protein involved in the maintenance of genomic stability** FEBS J. 2015 Feb;282(4):630-46.

- SCULLY, R. et al. **BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 11, p. 5605–5610, 27 maio 1997.
- SHALTIEL, I. A. et al. **The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle** J Cell Sci. 2015 Feb 15;128(4):607-20.
- SHIOZAKI, E. N. et al. **Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: Implications for signaling.** Molecular Cell, v. 14, n. 3, p. 405–412, 7 maio 2004.
- SIMONE, C. et al. **Physical interaction between pRb and cdk9/cyclinT2 complex.** Oncogene, v. 21, n. 26, p. 4158–4165, 13 jun. 2002.
- SMOLKA, M. B. et al. **Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 25, p. 10364–10369, 19 jun. 2007.
- STARITA, L. M. et al. **BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II.** The Journal of biological chemistry, v. 280, n. 26, p. 24498–505, 1 jul. 2005.
- STEICHEN-GERSDORF, E. et al. **Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21.** American journal of human genetics, v. 55, n. 5, p. 870–5, nov. 1994.
- STEWART-ORNSTEIN, J.; LAHAV, G. **P53 dynamics in response to DNA damage vary across cell lines and are shaped by efficiency of DNA repair and activity of the kinase ATM.** Science Signaling, v. 10, n. 476, 25 abr. 2017.
- STOLZ, A. et al. **The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells.** Nature cell biology, v. 12, n. 5, p. 492–9, maio 2010.
- STORCH, K.; CORDES, N. **The impact of CDK9 on radiosensitivity, DNA damage repair and cell cycling of HNSCC cancer cells.** International journal of oncology, v. 48, n. 1, p. 191–8, 1 jan. 2016.

- SU, D. et al. **Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis**. Journal of Clinical Investigation, v. 128, n. 10, p. 4280–4296, 1 out. 2018.
- SZABO, C. I.; WORLEY, T.; MONTEIRO, A. N. **Understanding Germ-Line Mutations in BRCA1**. Cancer Biology & Therapy, v. 3, n. 6, p. 515–520, 2004.
- TAKIZAWA, C. G.; MORGAN, D. O. **Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C** Curr Opin Cell Biol. 2000 Dec;12(6):658-65.
- TAUBE, R. et al. **Interaction between P-TEFb and the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Activates Transcriptional Elongation from Sites Upstream or Downstream of Target Genes**. Molecular and Cellular Biology, v. 22, n. 1, p. 321–331, 1 jan. 2002.
- THAKUR, S. et al. **Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal**. Molecular and Cellular Biology, v. 17, n. 1, p. 444–452, jan. 1997.
- THOMPSON, L. H. **Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography**. Mutation research, v. 751, n. 2, p. 158–246, out. 2012.
- TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. **Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer**. Cell, v. 168, n. 4, p. 644–656, 9 fev. 2017.
- UTO, K. et al. **Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism**. EMBO Journal, v. 23, n. 16, p. 3386–3396, 18 ago. 2004.
- VAN DEN BOSCH, M.; BREE, R. T.; LOWNDES, N. F. **The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes**. EMBO reports, v. 4, n. 9, p. 844–9, set. 2003.
- VAN VUGT, M. A. T. M. et al. **A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint**. PLoS biology, v. 8, n. 1, p. e1000287, 26 jan. 2010.

- VILLA-HERNÁNDEZ, S.; BERMEJO, R. **Cohesin dynamic association to chromatin and interfacing with replication forks in genome integrity maintenance** Curr Genet. 2018 Oct;64(5):1005-1013.
- WANG, B. et al. **Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response.** Science (New York, N.Y.), v. 316, n. 5828, p. 1194–8, 25 maio 2007.
- WANG, M. et al. **PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways.** Nucleic Acids Research, v. 34, n. 21, p. 6170–6182, 1 dez. 2006.
- WANG, W. **Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins** Nat Rev Genet. 2007 Oct;8(10):735-48.
- WESTERMARK, U. K. et al. **BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks.** Molecular and cellular biology, v. 23, n. 21, p. 7926–36, 1 nov. 2003.
- WILLIAMS, R. S. et al. **Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1.** Nature Structural and Molecular Biology, v. 11, n. 6, p. 519–525, jun. 2004.
- WIRTH, R.; FRIESENEGGER, A.; FIEDLER, S. **Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation.** MGG Molecular & General Genetics, v. 216, n. 1, p. 175–177, mar. 1989.
- WOODS, N. T. et al. **Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions.** Science signaling, v. 5, n. 242, p. rs6, 18 set. 2012.
- WU-BAER, F. et al. **The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin.** The Journal of biological chemistry, v. 278, n. 37, p. 34743–6, 12 set. 2003.
- YAN, K. et al. **The deubiquitinating enzyme complex BRISC is required for proper mitotic spindle assembly in mammalian cells.** The Journal of cell biology, v. 210, n. 2, p. 209–24, 20 jul. 2015.

- YANG, Z.; HE, N.; ZHOU, Q. **Brd4 Recruits P-TEFb to Chromosomes at Late Mitosis To Promote G1 Gene Expression and Cell Cycle Progression.** Molecular and Cellular Biology, v. 28, n. 3, p. 967–976, 1 fev. 2008.
- YE, Q. et al. **BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations.** The Journal of cell biology, v. 155, n. 6, p. 911–21, 10 dez. 2001.
- YU, D. S. et al. **Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response.** EMBO reports, v. 11, n. 11, p. 876–82, nov. 2010.
- ZABOROWSKA, J.; ISA, N. F.; MURPHY, S. **P-TEFb goes viral.** Inside the Cell, v. 1, n. 2, p. 106–116, abr. 2016.
- ZANNINI, L.; DELIA, D.; BUSCEMI, G. **CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond.** Journal of Molecular Cell Biology, v. 6, n. 6, p. 442–457, 1 dez. 2014.
- ZHANG, H. et al. **SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 33, p. 13546–51, 13 ago. 2013.
- ZHANG, H. et al. **ATRIP Deacetylation by SIRT2 Drives ATR Checkpoint Activation by Promoting Binding to RPA-ssDNA.** Cell reports, v. 14, n. 6, p. 1435–1447, 16 fev. 2016.
- ZHANG, H. et al. **CDK7 Inhibition Potentiates Genome Instability Triggering Anti-tumor Immunity in Small Cell Lung Cancer.** Cancer Cell, v. 37, n. 1, p. 37-54.e9, 13 jan. 2020.
- ZHANG, J. et al. **Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair.** Molecular and Cellular Biology, v. 24, n. 2, p. 708–718, 15 jan. 2004.
- ZHANG, X. et al. **BRCA1 mutations attenuate super-enhancer function and chromatin looping in haploinsufficient human breast epithelial cells.** Breast cancer research : BCR, v. 21, n. 1, p. 51, 17 abr. 2019.

- ZHOU, Q.; YIK, J. H. N. **The Yin and Yang of P-TEFb Regulation: Implications for Human Immunodeficiency Virus Gene Expression and Global Control of Cell Growth and Differentiation**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 70, n. 3, p. 646–659, 1 set. 2006.
- ZHU, Q. et al. **USP7 deubiquitinase promotes ubiquitin-dependent DNA damage signaling by stabilizing RNF168**. Cell cycle (Georgetown, Tex.), v. 14, n. 9, p. 1413–25, 20 abr. 2015.
- ZONG, D. et al. **BRCA1 Haploinsufficiency Is Masked by RNF168-Mediated Chromatin Ubiquitylation**. Molecular Cell, v. 73, n. 6, p. 1267- 1281.e7, 21 mar. 2019.

Anexo I



Cell Cycle



ISSN: 1538-4101 (Print) 1551-4005 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/kccy20>

BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9

Thales C. Nepomuceno, Vanessa C. Fernandes, Thiago T. Gomes, Renato S. Carvalho, Guilherme Suarez-Kurtz, Alvaro N. Monteiro & Marcelo A. Carvalho

To cite this article: Thales C. Nepomuceno, Vanessa C. Fernandes, Thiago T. Gomes, Renato S. Carvalho, Guilherme Suarez-Kurtz, Alvaro N. Monteiro & Marcelo A. Carvalho (2017) BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9, *Cell Cycle*, 16:7, 665-672, DOI: [10.1080/15384101.2017.1295177](https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1295177)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1295177>



View supplementary material [↗](#)



Accepted author version posted online: 22 Feb 2017.
Published online: 10 Mar 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1138



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 7 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>

REPORT

BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9

Thales C. Nepomuceno ^a, Vanessa C. Fernandes ^a, Thiago T. Gomes ^b, Renato S. Carvalho ^c,
Guilherme Suarez-Kurtz ^a, Alvaro N. Monteiro ^d, and Marcelo A. Carvalho ^{a,b}

^aPrograma de Pesquisa Clínica, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ^bInstituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ^cFaculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^dCancer Epidemiology Program, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL, USA

ABSTRACT

Double strand break lesions, the most toxic type of DNA damage, are repaired primarily through 2 distinct pathways: homology-directed recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ). BRCA1 and 53BP1, 2 proteins containing the BRCT modular domain, play an important role in DNA damage response (DDR) by orchestrating the decision between HR and NHEJ, but the precise mechanisms regarding both pathways are not entirely understood. Previously, our group identified a putative interaction between BRCA1 and BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) and the cyclin-dependent kinase (CDK9). CDK9 is a component of the positive transcription elongation complex and has been implicated in genome integrity maintenance associated with the replication stress response. Here we show that CDK9 interacts with endogenous BRCA1 and BARD1 mediated by their RING finger and BRCT domains, and describe CDK9 ionizing radiation-induced foci (IRIF) formation and its co-localization with BRCA1 in DNA damage sites. Cells lacking CDK9 are characterized by an altered γ -H2AX foci dynamics after DNA damage, a reduced efficiency in HR but not in NHEJ repair, failure to form BRCA1 and RAD51 IRIF and increased sensitivity to genotoxic agents. These data indicate that CDK9 is a player in the DDR and is consistent with its participation in HR pathway by modulating BRCA1 response.

ARTICLE HISTORY

Received 15 June 2016
Revised 27 January 2017
Accepted 8 February 2017

KEYWORDS

BRCA1; CDK9; DNA damage repair; homologous recombination

Introduction



Human cells are constantly exposed to different DNA damaging insults. The DNA damage response (DDR) is a major feature in maintaining genome integrity and consequently suppressing tumorigenesis. DNA double-strand breaks (DSBs) are the most toxic kind of DNA damage and are primarily repaired through 2 major pathways, the error-free homologous recombination (HR) and error-prone non-homologous end joining (NHEJ).¹ Both processes rely on the recruitment of different protein complexes that target the DNA repair.²

BRCA1 is a tumor suppressor that plays an essential role in the DDR through both HR and NHEJ by acting as a scaffold protein in different complexes.^{2–4} The decision between HR and NHEJ is taken based on the recruitment balance of BRCA1 and 53BP1.^{2,5} 53BP1 and its interaction partners RIF1 and PTIP, repress the HR through the inhibition of BRCA1 recruitment to DNA damage sites.^{5–7} BRCA1 interacts with CtIP, stimulating the 5' end resection and as consequence the HR.^{7,8} BRCA1-deficient cells present reduced HR repair efficiency that can lead to generate synthetic lethality toward PARP inhibitors, which is actually been used in anticancer therapeutic strategies.^{9,10} BRCA1 acts commonly associated with BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) through dimerization of their RING-finger domains.¹¹ BARD1 protein


structure resembles BRCA1, besides their RING-finger domains both proteins enclose tBRCT (tandem BRCT) domains. The tBRCT is present in several proteins involved in the DDR, operating as a protein-protein interaction module capable of recognizing phosphorylated proteins.^{12,13}

In a previous work, our group generated a human protein-protein interaction network centered on interactions mediated by the tBRCT domain and identified CDK9 (cyclin-dependent kinase 9) as a putative interaction partner of BRCA1 and BARD1 tBRCTs.¹⁴ The cyclin-dependent kinases (CDKs) participate in many DDR-related processes, such as signal transduction and cell cycle arrest.^{15,16} CDK9 was originally characterized as the catalytic subunit of the positive elongation complex (P-TEFb), which is responsible for promoting transcription through the phosphorylation of the C-terminal domain (CTD) of the holoenzyme RNA polymerase II.¹⁷ Moreover, CDK9 is reported to be involved in genome integrity maintenance, taking part in replication stress response together with ATR and ATRIP.^{18,19}

In this report, we analyze the role of CDK9 in the DDR in association with BRCA1 and BARD1. We demonstrate that the absence of CDK9 lead to a disturbed DDR, showing that CDK9 modulates BRCA1 ionizing radiation-induced foci (IRIF) formation but not 53BP1 and that CDK9-silenced cells present reduced HR (but not NHEJ)

CONTACT Marcelo A. Carvalho  marcelo.carvalho@ifrj.edu.br  Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro, Laboratório de Genética Molecular, Rua Senador Furtado, 121, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20270–021.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/kccy.

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](http://www.tandfonline.com/kccy).

© 2017 Taylor & Francis

repair efficiency, leading to a DNA damage sensitive phenotype in the presence of olaparib, a PARP inhibitor.

Results

CDK9 interacts with BRCA1 and BARD1

Previously, CDK9 was identified as an interaction partner of the tandem BRCT domains of BRCA1 in a yeast 2-hybrid screening. Furthermore, CDK9 was also found to interact with the tandem BRCT domains of BARD1 in a tandem affinity purification assay.¹⁴ To confirm these observations, co-immunoprecipitation assays were conducted using nuclear extracts of human cell lines. As shown in Fig. 1A, CDK9 was co-immunoprecipitated with endogenous BRCA1 in HeLa cell extracts, and, similarly, BARD1 was identified in the same complex with CDK9 in HEK293FT (Fig. 1B), confirming the interaction detected using epitope-tagged tBRCT baits.¹⁴ We also conducted reciprocal co-

immunoprecipitation of endogenous BRCA1 and BARD1 in HEK293FT cell extracts and confirmed this interaction (Supplementary Figs 1A and 1B).

Next, we analyzed whether other regions, besides the tandem BRCTs, were responsible for mediating the interaction of CDK9 with BRCA1 and BARD1. For this purpose, BRCA1 GST-tagged fragments (Fig. 1C) were expressed in HEK293FT cells and used as baits for pull-down assays against FLAG-tagged CDK9. Both the C-terminal (including the coiled-coil and the tBRCT domains; fragment BF#6) and the amino-terminal region (including the RING-finger domain; fragment BF#1) of BRCA1 were shown to be sufficient for CDK9 interaction (Fig. 1D).

We also investigated whether BARD1 N- and C-terminal regions were capable of interacting with CDK9. As presented in Fig. 1E, both regions of BARD1 (GST-tagged fragments, Fig. 1E) interact with CDK9. Taken together, these data indicate that CDK9 interacts with both BRCA1 and BARD1 through interactions in different domains.

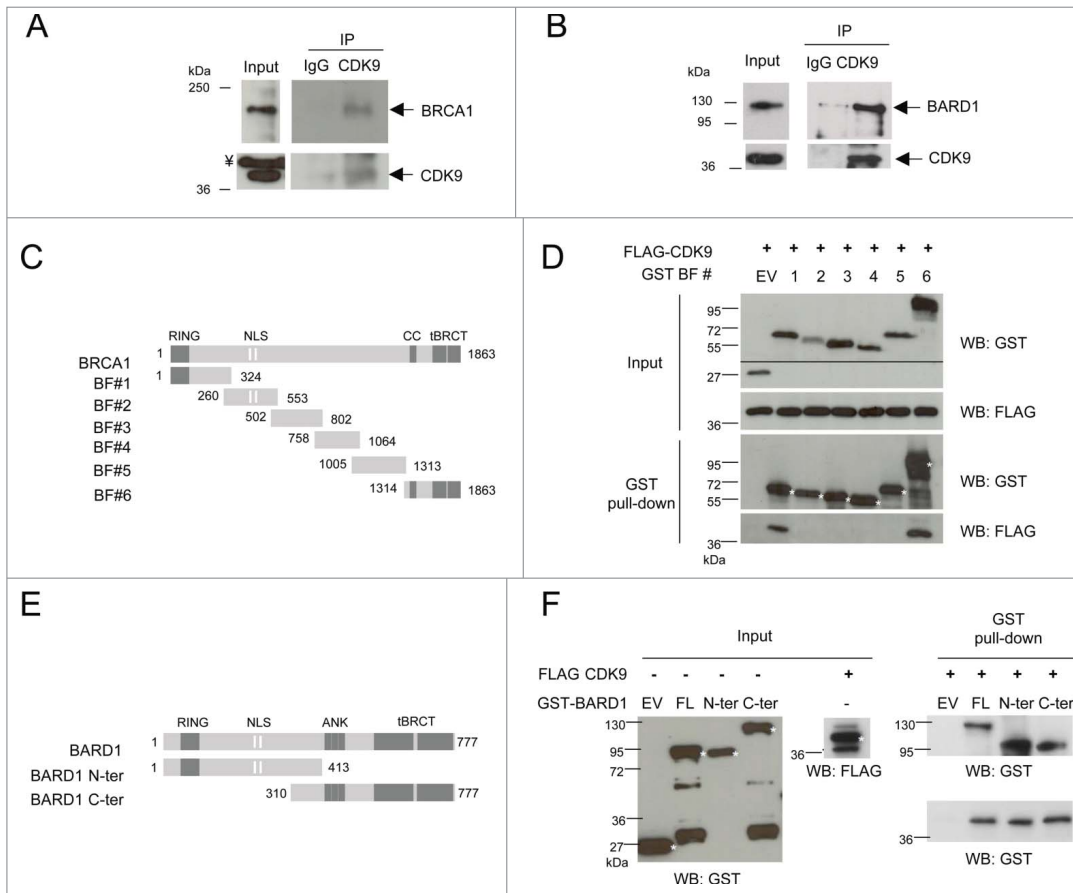


Figure 1. CDK9 is a new interaction partner of BRCA1 and BARD1. Protein levels were determined in (A) HeLa and (B) HEK293FT nuclear extracts by immunoblotting using specific antibodies. Co-immunoprecipitation assays were performed using anti-CDK9 or anti-HA (IgG) antibodies, immunoblots were developed using anti-CDK9 and anti-BRCA1 or BARD1 antibodies, as indicated. Y indicate a non-specific band. (C) Diagram of constructs used to map the BRCA1 interaction with CDK9. RING, RING finger domain; NLS, nuclear localization signals; CC, Coiled-coil domain; tBRCT, tandem BRCT. (D) Upper panels, co-expression of GST-fragments of BRCA1 and FLAG-CDK9 in HEK293FT cells. The lower molecular weight band presented by the empty vector (EV) transfection corresponds to GST. Lower panels, GST pull-down assay, Western blots (WB) were developed using indicated antibodies. (E) Diagram of GST-tagged constructs of BARD1 interaction with CDK9. ANK, ankyrin repeats. (F) Left panels, input of bacterially expressed BARD1 GST-fragments and FLAG-CDK9 produced in HEK293FT cells. The lower molecular weight band presented by the empty vector (EV) transfection corresponds to GST. Right panels, GST pull-down assay, WBs were developed using indicated antibodies. * indicates fragments of interest.

CDK9 is involved in the DNA damage response

To investigate the involvement of CDK9 in the DDR, MCF7 cells were stably silenced for CDK9 (MCF7 shCDK9) and for a non-target scrambled shRNA control (MCF7 shSCR). As presented in Fig. 2A, CDK9 protein level is nearly undetectable in MCF7 shCDK9 nuclear extracts. It is worth of note that CDK9 silencing did not affect BRCA1 and BARD1 expression despite its involvement in transcription regulation (Fig. 2A).

During the DDR, histone H2AX is rapidly phosphorylated (γ H2AX) after DSBs and acts as a signal for recruitment of different complexes that are responsible for the DNA damage repair.^{20,21} Thus, we decided to investigate the dynamics of DNA damage repair through γ H2AX foci status in MCF7 shSCR and shCDK9 cells after ionizing radiation (IR) treatment (Fig. 2B and C). Cells lacking CDK9 expression presented a slightly reduction in positive nucleus (84.9% with more than 5 foci) when compared with proficient cells (96.4%) in 30 min after 5 Gy treatment. In 1 hour post-treatment, shCDK9 cells exhibited almost one third less positive nucleus than control cells (60.6% versus 91.3%). After 3 hours, no statistically significant difference was observed (16% vs. 17%). Similar data were obtained using an independent CDK9 shRNA (shCDK9-2), as shown in Supplementary Figures 1C-E.

DNA DSBs are mostly repaired through 2 distinct pathways (HR and NHEJ) and BRCA1 is known for playing a pivotal role in coordinating both.¹⁻⁴ To investigate the involvement of CDK9 in these pathways we examined the HR and NHEJ repair

status using specific I-SceI cleavage dependent reporter assays.²² As shown in Fig. 2D, cells lacking CDK9 expression exhibited an impaired DNA damage repair represented by a reduction of 32.2% in HR repair efficiency while NHEJ was not altered. Similar results were observed using MCF7 cells silenced with the shCDK9-2 (Supplementary Figure 1F). These suggest that CDK9 may play a role in the DNA damage repair through HR.

CDK9 IRIF formation and BRCA1 co-localization

IR-induced foci formation is a classical phenotype of DDR-related proteins and is a consequence of their recruitment and accumulation at DSBs sites.²³ CDK9 interaction with BRCA1 and BARD1, key players in the DDR, led us to inquire whether CDK9 was recruited to DNA damage sites and form IRIF. To address this question, we first analyzed the nuclear distribution of CDK9 in IR-treated MCF7 cells. As shown in Fig. 3A and B, non-irradiated MCF7 cells presented a CDK9 diffuse nuclear distribution, while in IR-treated cells CDK9 accumulates in ionizing radiation-induced foci, representing more than 2-fold increase in CDK9 positive nuclei when compared with non-treated cells (Fig. 3C). Additionally, we also demonstrated that CDK9 co-localizes with BRCA1 (Fig. 3B and C) and RPA at DSB sites (Supplementary Fig 2A). These data suggest that CDK9 is recruited to IR-induced DSB sites and could act in association with BRCA1 in the DNA damage signaling.

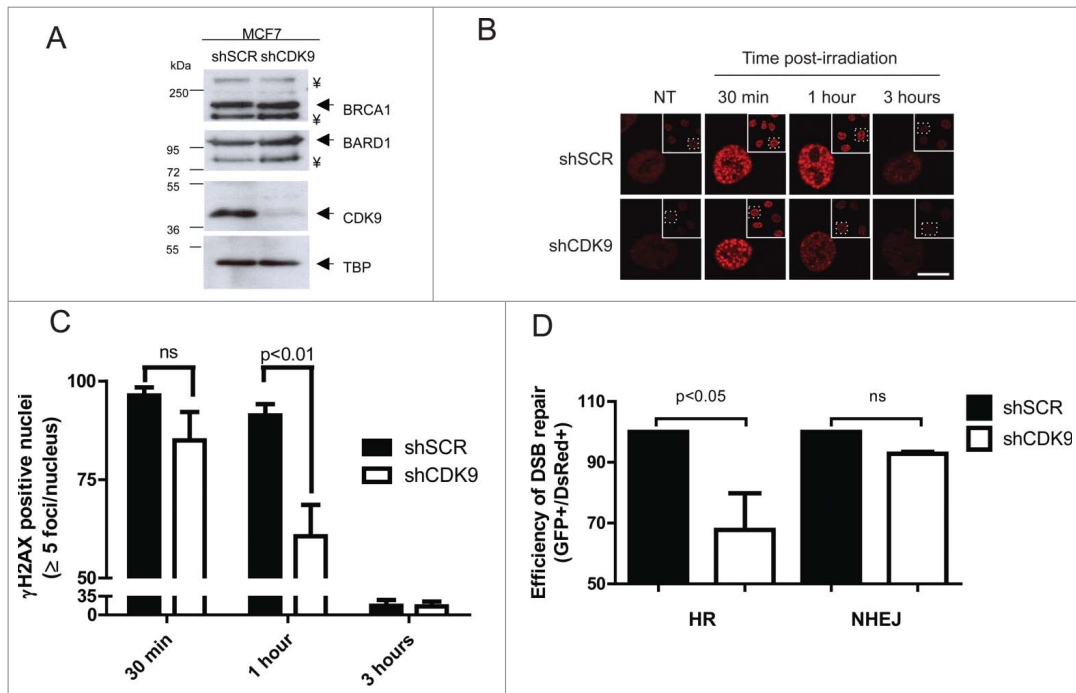


Figure 2. CDK9-silenced cells present an altered DNA damage response. (A) CDK9, BRCA1 and BARD1 expression profile in MCF7 shSCR (negative control) and MCF7 shCDK9 nuclear extracts. TBP was used as loading control. Ψ indicate a non-specific band. (B) γ H2AX foci formation dynamics, CDK9-silenced cells were exposed to IR (5 Gy) and immunostained after the indicated time intervals using anti-phosphorylated H2AX (Ser139). Scale bar = 10 μ m (C) Phosphorylated H2AX (Ser139) foci were quantified using Image J software. Data is presented as mean \pm SD of positive nuclei with 5 or more foci. (D) HR and NHEJ repair efficiency quantification in cells lacking CDK9 expression. Cells were analyzed 72 hours after co-transfection of linearized reporter plasmids (HR or NHEJ) and the DsRed expression vector. Data is presented as mean \pm SD of percentage of GFP positive cells relative to DsRed positive cells.

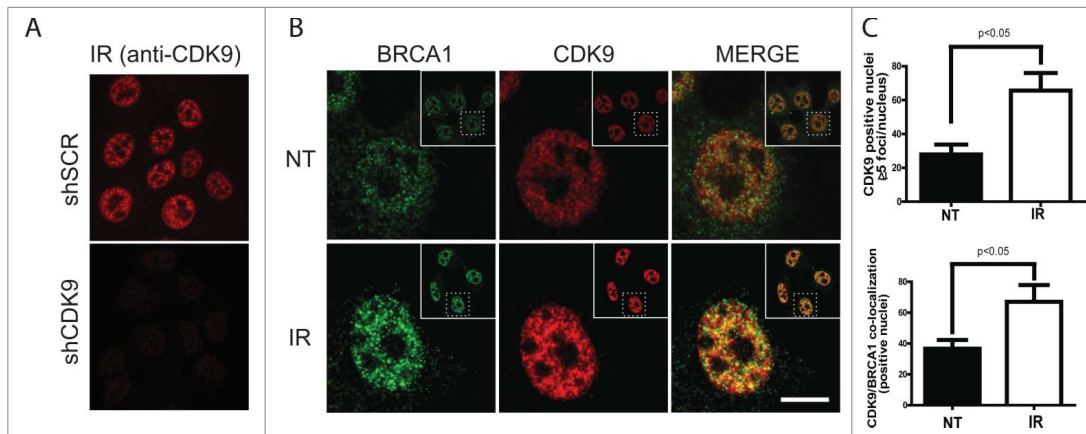


Figure 3. CDK9 IRIF co-localize with BRCA1 at damaged DNA sites. MCF7 cells were exposed to IR (10 Gy) and recovered for 3 hours. Immunostaining was performed using (A) only anti-CDK9 or (B) anti-CDK9 and anti-BRCA1 antibodies. Insets depict the nucleus in lower magnification. ((C)- upper panel) Quantification of CDK9 positive nuclei and ((C)- lower panel) CDK9/BRCA1 co-localization. NT, not treated. Scale bars = 10 μ m.

CDK9 modulates BRCA1 recruitment to DSBs

BRCA1 and 53BP1 are determinants of the choice between HR and NHEJ; while BRCA1 acts by favoring HR, 53BP1 stimulates NHEJ.⁵⁻⁸ During the HR pathway BRCA1 is recruited to the DSB sites conducting repair through different complexes.²⁹ Taking into account CDK9 co-localization with BRCA1 at DNA damaged sites, we decided to investigate the role of CDK9 on BRCA1 IRIF formation using confocal microscopy (Fig. 4A). In response to DNA damage, MCF7 shSCR cells displayed well-characterized BRCA1 foci formation,^{24,25} but this phenotype was not observed in the absence of CDK9. MCF7 shCDK9 presented almost 6-fold reduction in positive nucleus (13.8%) than shSCR cells (80.2%). Similar result was observed in shCDK9-2 cells (Supplementary Fig. 2B). Next, we analyzed 53BP1 foci formation in MCF7 shSCR and shCDK9 cells (Fig. 4B). CDK9 deficient cells exhibited a similar recruitment profile as control cells. Corroborating these data, the recruitment of the recombinase RAD51 was also reduced in cells lacking CDK9 expression when compared with control cells (one third less in shCDK9 cells when compared with shSCR) (Fig. 4C and Supplementary Fig. 2C). Collectively, these data strongly suggest that CDK9 is required for the localization of BRCA1 and consequently RAD51, but not 53BP1 to DSB sites.

Absence of CDK9 sensitizes cells to DNA damage

Dysfunctional DNA repair is usually followed by an increase in sensitivity to DNA damaging agents²⁶⁻²⁸ We performed cellular survival assays to explore whether the impaired recruitment of BRCA1 to DSB sites in the absence of CDK9 could sensitize cells to IR treatment. As shown in Fig. 5A, a radiosensitive phenotype was demonstrated in 2 independent MCF7 CDK9 silenced cell lines. Statistically significant differences were observed in 2, 3 and 4 Gy treatment. This observation is supported by evidences described by Storch and Cordes showing radiosensitivity associated to CDK9 depletion in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines.³⁰

Inhibition of PARPs is constantly associated with synthetic lethality in cells with compromised HR repair.^{9,10} Thus, we decided to evaluate whether cells lacking CDK9 expression were more sensitive to DSB in the presence of the PARP inhibitor olaparib. As shown in Fig. 5B, IR and olaparib combined treatment lead to an additive effect in cells lacking the CDK9 expression, inhibiting cell growth (61.5%) when compared with proficient cells (91.3%). These data corroborate a possible involvement of CDK9 in DSB repair through HR.

Discussion

CDK9 is described as the catalytic subunit of the P-TEFb complex and has been implicated in different biologic processes such as transcription regulation, mRNA splicing and HIV replication.^{31,32} Yu and colleagues depicted CDK9 as an interaction partner of ATR and ATRIP and in its absence cells were more sensitive to hydroxyurea. The scenario is very suggestive to CDK9 participation in genome integrity maintenance through the replication stress response (RSR).¹⁸ Moreover, SIRT2 was described directing the RSR through CDK9 deacetylation, confirming the idea that CDK9 is involved in the RSR.¹⁹

Here we demonstrate that CDK9 is an interaction partner of BRCA1 and BARD1 in human cells. BRCA1 and BARD1 are well-characterized players in the DDR.^{33,34} Our data indicate that BRCA1 and BARD1 interact with CDK9 by their N- and C-terminal regions (RING-finger and the tBRCT; Fig. 1), which corroborates our previous report that described CDK9 as a putative interaction partner of the tBRCT domains of BRCA1 and BARD1.¹⁴ Like this, CDK9 is present in complexes with BRCA1 and BARD1, raising the hypothesis of its participation in the DDR.

Upon DNA damage, ATM rapidly phosphorylates H2AX, which acts as a critical DSB marker for signal transduction and the hierarchal recruitment of proteins that dictate whether HR or NHEJ would repair the DNA damage.^{2,20,21}

Supporting the hypothesis of a CDK9 role in the DDR, we demonstrated that CDK9-silenced cells exhibit an altered

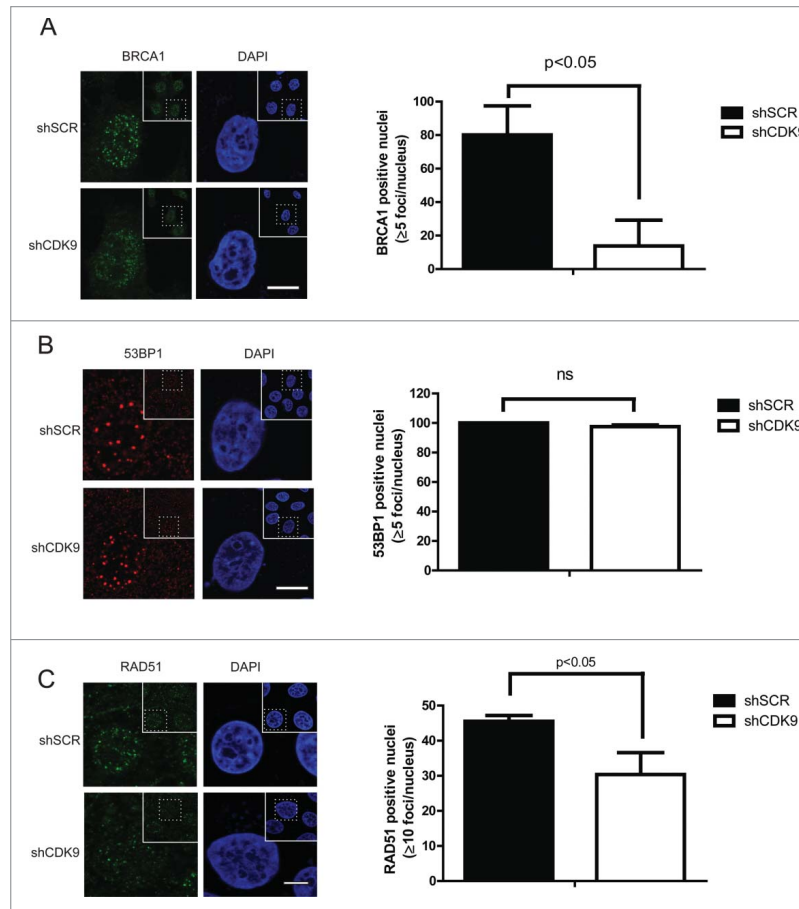


Figure 4. BRCA1 and RAD51, but not 53BP1, recruitment to damaged DNA sites are dependent upon CDK9. MCF7 shSCR or shCDK9 cells were exposed to IR (10 Gy) and recovered for 3 hours (A and B) or for 5 hours (C). Left, immunofluorescence staining using anti-BRCA1, anti-53BP1 or anti-RAD51. Scale bars = 10 μ m. Right, BRCA1, 53BP1 and RAD51 foci quantification using Image J software. Data is presented as mean \pm SD.

γ H2AX foci formation dynamics despite the fact that BRCA1 and BARD1 expression were not affected by CDK9 knockdown (Fig. 2). In this context, we also observed that DNA repair efficiency carried by HR, but not NHEJ, was reduced in shCDK9 cells, placing CDK9 as an actor in the HR pathway.

BRCA1 is a central protein during the DNA damage repair, operating in different steps in HR, such as DNA end resection, signal transduction and RAD51 loading on the single strand DNA (ssDNA).^{7,8,37-39} BRCA1 tBRCT domain is responsible for promoting protein-protein interactions, mediating the recruitment and retention at the DSB sites.^{35,36} During the DNA repair signaling, as DDR-related proteins are recruited to DSB sites, they accumulate and can be visualized as nuclear foci.

We performed the first observation of CDK9 IRIF formation and its co-localization with BRCA1 and RPA at DNA damaged sites (Fig. 3 and Supplementary Fig 2), endorsing a CDK9 possible role in HR repair.

The molecular basis of the choice between HR and NHEJ could be summarized by the efficient recruitment of BRCA1 or 53BP1 to the DSB site, modulating the extension of DNA end

resection.⁵⁻⁸ We inquired whether the participation of CDK9 in HR could be related to the regulation of BRCA1 and 53BP1 recruitment to damaged sites. Interestingly, CDK9-silenced cells presented a drastic reduction of BRCA1 (but not 53BP1) IRIF formation (Fig. 4). As a downstream event, RAD51 loading on chromatin was also observed impaired (Fig. 4), suggesting that BRCA1 recruitment to DSBs is dependent upon CDK9 and consequently for HR repair.

IR treatment may also promote SSBs, which are repaired in a PARP1/2-dependent mechanism.⁹ In cycling cells, if not repaired, SSBs tend to progress to DSBs that would be preferentially repaired through HR.^{40,41} Consistent with our findings, CDK9-silenced cells exhibited an increased sensitivity to IR treatment that was intensified in the presence of a PARP inhibitor (Fig. 5).

Ultimately, we propose a model where CDK9 acts in the HR pathway by promoting BRCA1 recruitment to DSB sites. However, further investigation is required to characterize how CDK9 recruitment occurs and whether its absence is sufficient for impairment of other BRCA1 functions.

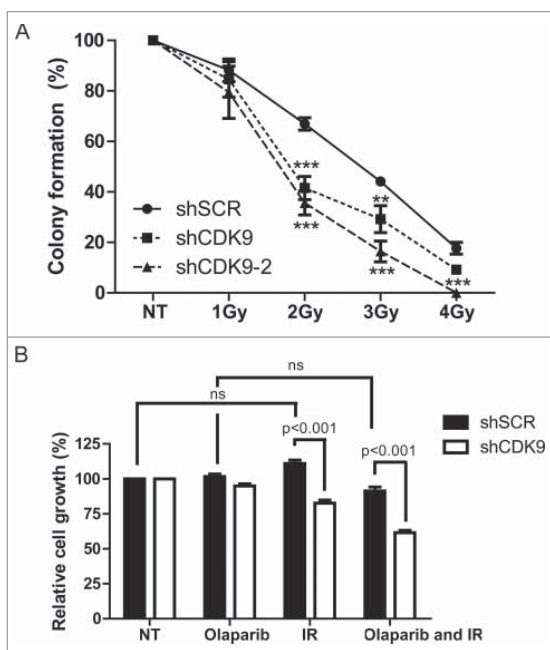


Figure 5. Cells lacking CDK9 exhibit increase sensitivity to genotoxic agents. (A) MCF7 shSCR, shCDK9 and shCDK9-2 were subjected to long-term clonogenic assay after irradiation (1, 2, 3 or 4 Gy). Cells were fixed and stained with crystal violet and colonies were quantified. (B) Cells were also subjected to viability assay after treatment with ionizing radiation in the presence or not of PARP inhibitor, olaparib (50 nM). Viability quantification were determined by the absorbance of crystal violet at 590 nm. Data are presented as means \pm SD of triplicates. *** = $p < 0.001$ and ** = $p < 0.01$

Materials & methods

Cell culture and antibodies

The human mammary gland carcinoma MCF7 and the cervix adenocarcinoma HeLa cell lines were obtained from the ATCC Cell Bank. Human HEK293FT cell line was purchased from Invitrogen (Invitrogen). Cells were maintained in DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) in 5% v/v CO₂ at 37°C.

Rabbit anti-BARD1 (Bethyl Laboratories, BL518), rabbit anti-CDK9 (Bethyl laboratories, A303-493A), rabbit anti-HA (Santa Cruz Biotech, SC-805) and rabbit anti-BRCA1 (Santa Cruz Biotech, SC-642) antibodies were used for co-immunoprecipitation and immunoblotting. Mouse anti-FLAG (Sigma Co., F1804), mouse anti- β -actin (Santa Cruz Biotech, SC47778), mouse anti-GST (Santa Cruz Biotech, SC-138), goat HRP-conjugated anti-mouse Ig (Santa Cruz Biotechnologies, SC2005) and goat HRP-conjugated anti-rabbit Ig (Santa Cruz Biotechnologies, SC2301) antibodies were used for immunoblotting. Rabbit anti phospho-H2AX_{Ser139} monoclonal antibody (Santa Cruz Biotech, SC-101696), mouse anti-BRCA1 (Calbiochem, OP107), mouse anti-RAD51 (Thermo Fisher, 3C10), rabbit anti-CDK9 (Bethyl laboratories, A303-493A), rabbit anti-53BP1 (Bethyl laboratories, A300-272A), rat anti-RPA32/30 (Cell Signaling 2208), goat Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit Ig antibody (Life Technologies, A11008), rabbit biotinylated anti-rat (Vector Labs, BA-4000), Streptavidin-Cy3 (Thermo Fisher, 434315) and goat Alexa Fluor 546 conjugated anti-rabbit Ig antibody (Life Technologies,

A-11035) were used for immunofluorescence staining. All antibodies were used following manufacturer's instructions.

Constructions and transfection

Human CDK9 coding sequence (PubMed Accession Number: NM_001261.3) was obtained by PCR amplification using the following primers CDK9-Fw (5'-AAGAATTCATGGCAAA GCAGTACGACTCGGTG-3', enclosing *EcoRI* restriction site) and CDK9-Rv (5'-AAGGATCCTCAGAAGACGCGCT-CAAATCC-3', enclosing *BamHI* restriction site) and the construction pCDNA3-CDK9-HA as template (purchased from Addgene; Plasmid #635). The amplified coding sequence was cloned into pCMV2-FLAG (Sigma). pGEX6p1-BARD1 constructs, were generated by the same approach described above, using the construction pYFP-BARD1 (kindly gift from Dr Beric Henderson) as template and the following primers: BARD1 N-ter Fw (5'-AAGTCGACAATGCCGATAATCGGCAGC-3') and Rv (5'-AAGCGGCCGCTCAATGGAGCAAAGTCTCTCC T-3'), BARD1 C-ter Fw (5'-AAGTCGACAAAGTCCCATTTC TAAGAGATGTAGAAC-3' and Rv (5'-AAGCGGCCGCT-CAGCTGTCAAGAGGAAGCAAC-3'). pEBG-BRCA1 constructs were a kindly gift from Dr Toru Ouchi.

Transfections were conducted using Polyethylenimine (PEI; Polysciences Inc, Pennsylvania, EUA) as described previously.⁴²

GST pulldown, co-immunoprecipitation and immunoblotting

GST-BARD1 fragments were obtained from bacterial extracts following GE Gene Fusion System Handbook.⁴³ Briefly, *E. coli* (BL21 strain) cells previously transformed with BARD1 pGEX constructs were treated with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 hours at 30°C. Then, cells were submitted to sonication and cellular debris were removed by centrifugation, the supernatant enriched with GST-proteins was recovered. Mammalian total cellular extracts and nuclear extracts were obtained as described by Carvalho et al.⁴⁴

GST pulldown assays were performed by incubating Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) with proper cellular extracts (derived from bacterial and/or mammalian cells) for 16 h at 4°C followed by extensively buffer washes. All incubations and washes were performed using ice-cold mild-RIPA buffer supplemented with 2.5 mM dithiothreitol (DTT).

Co-immunoprecipitation assays were performed by incubating A/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotech), cellular extracts and the appropriate antibody for 16 h at 4°C in mild-RIPA buffer, followed by extensively ice-cold mild-RIPA buffer washes. Immunoblottings were performed using PVDF membranes (Millipore) and developed using ECL Plus kit (Amersham Biosciences).

CDK9 silencing

Lentiviral particles enclosing pLKO.1 plasmids encoding shRNAs targeting CDK9 gene (shCDK9 – Openbiosystem plasmids TCRN#494 and TCRN#497) or a control scrambled sequence (shSCR – Openbiosystem plasmid RHS6848) were produced in HEK293FT cells using ViraPower Lentiviral

Expression Kit (Invitrogen). To generate MCF7 shCDK9 and shSCR cells, lentiviral particles were transduced in MCF7 cells, followed by puromycin (Invitrogen) selection according to manufacturer instructions.

Immunofluorescence

Immunofluorescence staining was performed as described previously by Sy *et al.*,⁴⁵ with slight modifications. Briefly, cells were plated over glass covers slides and allowed to attach for 24 h. Afterwards, cells were exposed to IR (5 or 10 Gy) and at the indicated time point were submitted to fixation (20 minutes in 4% w/v formaldehyde prepared in PBS). Cells were incubated with anti-BRCA1, anti-RPA or anti-CDK9 followed by anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 488 or anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 546 or biotinylated anti-RAT followed by Streptavidin-Cy3, respectively. For 53BP1, RAD51 and phospho-H2AX_{ser139} staining cells were pre-treated with cytoskeleton buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 300 mM sucrose, 100 mM NaCl and 3 mM MgCl₂) supplemented with 0.5% v/v triton X-100 for 2 min on ice.⁵² Slides were mounted with Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). Samples were analyzed by confocal microscopy (Olympus FV10i). IRIF were quantified using ImageJ software (NIH).

Analysis of DNA damage repair in mammalian cells

HR and NHEJ DNA repair efficiency were assessed as described previously by Mao *et al.*²² Briefly, MCF7 shSCR and MCF7 shCDK9 cells were plated and allowed to attach for 24 h. Afterwards, cells were transfected with I-SceI digested HR or NHEJ reporter plasmids. Three days later, cells were harvested and washed with PBS solution. Samples were acquired using flow cytometry (Accury C6 BD Biosciences) and analyzed with CFlow[®] plus v1.0.227.4 (Accury[®] Cytometers, Inc.).

Cellular survival assays

Cells were seeded in 6-well plates (1 × 10² cells/well for colony formation or 1 × 10³ cells/well for viability analysis), allowed to attach for 24 h, and then irradiated (1, 2, 3 or 4) treated or not with 1 μM olaparib followed by a 7-day recovery period. Cellular viability was assessed using 1% w/v crystal violet staining for 15 min, followed by 10% v/v acetic acid elution and quantification in spectrophotometer at 590 nm wavelength. Colony formation was directly quantified under the stereo microscope (Zeiss).

Abbreviations

CDK	cyclin-dependent kinase
CTD	C-terminal domain
C-ter	C-terminal region
DDR	DNA damage response
DSB	DNA double-strand break
DTT	dithiothreitol
HR	homology-directed recombination
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IR	ionizing radiation

IRIF	ionizing radiation-induced foci
NHEJ	non-homologous end-joining
N-ter	N-terminal region
RSR	replication stress response
SSB	single stranded break
ssDNA	single stranded DNA
tBRCT	tandem BRCT domains

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro – FAPERJ/Brazil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ/Brazil and the INCA Confocal Microscopy Facility.

ORCID

Thales C. Nepomuceno  <http://orcid.org/0000-0002-1171-1030>
 Vanessa C. Fernandes  <http://orcid.org/0000-0003-4130-8215>
 Thiago T. Gomes  <http://orcid.org/0000-0001-7669-3980>
 Renato S. Carvalho  <http://orcid.org/0000-0001-8088-6195>
 Guilherme Suarez-Kurtz  <http://orcid.org/0000-0002-1115-8319>
 Alvaro N. Monteiro  <http://orcid.org/0000-0002-8448-4801>
 Marcelo A. Carvalho  <http://orcid.org/0000-0002-7053-0053>

References

- Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 2012; 47(4):497-510; PMID:22920291; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Thompson LH. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat Res* 2012; 751(2):158-246; PMID:22743550; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.06.002>
- Daley JM, Sung P. 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2014; 34(8):1380-8; PMID:24469398; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01639-13>
- Bau DT, Mau YC, Shen CY. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett* 2006; 240(1):1-8; PMID:16171943; <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.003>
- Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1):7-18; PMID:24326623; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3719>
- Escribano-Diaz C, Durocher D. DNA repair pathway choice—a PTIP of the hat to 53BP1. *EMBO Rep* 2013; 14(8):665-6; PMID:23846307; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2013.99>
- Feng L, Fong KW, Wang J, Wang W, Chen J. RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem* 2013; 288(16):11135-43; PMID:23486525; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.457440>
- Cruz-García A, López-Saavedra A, Huertas P. BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep* 2014; 9(2):451-9; PMID:25310973; <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>
- Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 2011; 5(4):387-93; PMID:21821475; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.001>
- Aly A, Ganesan S. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(1):66-74; PMID:21278454; <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjq055>

- [11] Baer R, Ludwig T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1):86-91; PMID:11790560; [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(01\)00269-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(01)00269-6)
- [12] Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GD, Boehning D. Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* 2012; 1(1):pii: e201204005; PMID: 22737296
- [13] Mesquita RD, Woods NT, Seabra-Junior ES, Monteiro AN. Tandem BRCT domains: DNA's Praetorian Guard. *Genes Cancer* 2010; 1(11):1140-6; PMID:21533002; <http://dx.doi.org/10.1177/1947601910392988>
- [14] Woods NT, Mesquita RD, Sweet M, Carvalho MA, Li X, Liu Y, Nguyen H, Thomas CE, Iversen ES Jr, Marsillac S, et al. Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions. *Sci Signal* 2012; 5(242):rs6; PMID:22990118; <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2002255>
- [15] Cerqueira A, Santamaría D, Martínez-Pastor B, Cuadrado M, Fernández-Capetillo O, Barbacid M. Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells. *J Cell Biol* 2009; 187(6):773-80; PMID:19995934; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200903033>
- [16] Wohlbold L, Fisher RP. Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8(9):1018-24; PMID:19464967; <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.009>
- [17] Price DH. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 2000; 8(8):2629-34; PMID:10733565; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.8.2629-2634.2000>
- [18] Yu DS, Zhao R, Hsu EL, Cayer J, Ye F, Guo Y, Shyr Y, Cortez D. Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Rep* 2010; 11(11):876-82; PMID:20930849; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2010.153>
- [19] Zhang H, Park SH, Pantazides BG, Karpiuk O, Warren MD, Hardy CW, Duong DM, Park SJ, Kim HS, Vassilopoulos A, et al. SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(33):13546-51; PMID:23898190; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301463110>
- [20] Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001; 276(45):42462-7; PMID:11571274; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- [21] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998; 273(10):5858-68; PMID:9488723; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- [22] Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells. *Neoplasia* 2009; 11(7):683-91; PMID:19568413; <http://dx.doi.org/10.1593/neo.09312>
- [23] Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40(2):179-204; PMID:20965415; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- [24] Chapman JR, Sossick AJ, Boulton SJ, Jackson SP. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 15):3529-34; PMID:22553214; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.105353>
- [25] Hu Y, Scully R, Sobhian B, Xie A, Shestakova E, Livingston DM. RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes Dev* 2011; 25(7):685-700; PMID:21406551; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2011011>
- [26] Jeggo P, Lavin MF. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int J Radiat Biol* 2009; 85(12):1061-81
- [27] Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):8173-8; PMID:12034884; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.122228699>
- [28] Lim YC, Roberts TL, Day BW, Stringer BW, Kozlov S, Fazry S, Bruce ZC, Ensbey KS, Walker DG, et al. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol Oncol* 2014; 8(8):1603-15; PMID:25017126; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.012>
- [29] Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J* 2015; 282(4):630-46; PMID:25400280; <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13150>
- [30] Storch K, Cordes N. The impact of CDK9 on radiosensitivity, DNA damage repair and cell cycling of HNSCC cancer cells. *Int J of Oncol* 2016; 48:191-8
- [31] Laitem C, Zaborowska J, Isa NF, Kufs J, Dienstbier M, Murphy S. CDK9 inhibitors define elongation checkpoints at both ends of RNA polymerase II-transcribed genes. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(5):396-403; PMID:25849141
- [32] Mancebo HSI, Lee G, Flygare J, Tomassini J, Luu P, Zhu Y, Peng J, Blau C, Hazuda D, Price D, Flores O. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* 1997; 11(20):2633-44; PMID:9334326; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.11.20.2633>
- [33] Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, et al. A DNA-damage selective role for BRCA1 E3 ligase in claspin ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. *Curr Biol* 2012; 22(18):1659-66; PMID:22863316; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.034>
- [34] Densham RM, Garvin AJ, Stone HR, Strachan J, Baldock RA, Daza-Martin M, Fletcher A, Blair-Reid S, Beesley J, Johal B, et al. Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23(7):647-55; PMID:27239795
- [35] Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Kleit RE, Ohta T. Interaction of BARD1 and HP1 Is Required for BRCA1 Retention at Sites of DNA Damage. *Cancer Res* 2015; 75(7):1311-21; PMID:25634209; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2796>
- [36] Wu Q, Paul A, Su D, Mehmood S, Foo TK, Ochi T, Bunting EL, Xia B, Robinson CV, Wang B, Blundell TL. Structure of BRCA1-BRCT/Abraxas complex reveals phosphorylation-dependent BRCT dimerization at DNA damage sites. *Mol Cell* 2016; 61(3):434-48; PMID:26778126; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.017>
- [37] Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(17):7155-60; PMID:19369211; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811159106>
- [38] Cousineau I, Abaji C, Belmaaza A. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65(24):11384-91; PMID:16357146; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2156>
- [39] Deng CX. BRCA1 cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(5):1416-26; PMID:16522651; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl010>
- [40] Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA Jr, Piccart M. An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(1):27-41; PMID:25286972; <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.163>
- [41] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434(7035):917-21; PMID:15829967; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03445>
- [42] Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* 2013; 529:227-40; PMID:24011049
- [43] GE Healthcare Life Sciences. GST Gene Fusion System Handbook. 2002. Available at: <http://docplayer.net/147913-Ge-healthcare-life-sciences-gst-gene-fusion-system-handbook-imagination-at-work.html>
- [44] Carvalho RS, Fernandes VC, Nepomuceno TC, Rodrigues DC, Woods NT, Suarez-Kurtz G, Chammas R, Monteiro AN, Carvalho MA. Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(7):840-50; PMID:24755837; <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.28873>
- [45] Velkova A, Carvalho MA, Johnson JO, Tavtigian SV, Monteiro AN. Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell Cycle* 2010; 9(7):1421-33; PMID:20305393; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.7.11256>

Anexo II

GO:0000075 controle de pontos de checagem do ciclo celular		
C=216; O=9; E=0.21882; R=41.131; PValue=1.17e-13; FDR=5.43e-11		
Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
ATR	ATR serine/threonine kinase	545
CCAR2	cell cycle and apoptosis regulator 2	57805
E2F1	E2F transcription factor 1	1869
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1	9656
MSH2	mutS homolog 2	4436
NBN	nibrin	4683
PLK1	polo like kinase 1	5347
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	5591

GO:0006302 reparo de quebra de dupla-fita do DNA		
C=218; O=9; E=0.22084; R=40.753; PValue=1.2e-13; FDR=5.43e-11		
Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
BRCA2	BRCA2, DNA repair associated	675
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1	9656
MSH2	mutS homolog 2	4436
NBN	nibrin	4683
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	5591
RAD50	RAD50 double strand break repair protein	10111
RNF8	ring finger protein 8	9025
XRCC1	X-ray repair cross complementing 1	7515

GO:0000726 reparo por vias não recombinantes		
C=81; O=7; E=0.082056; R=85.308; PValue=6.99e-13; FDR=1.98e-10		
Símbolo do gene	Nome do gene	<i>Entrez Gene</i>
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1	9656
NBN	nibrin	4683
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	5591
RAD50	RAD50 double strand break repair protein	10111
RNF8	ring finger protein 8	9025
XRCC1	X-ray repair cross complementing 1	7515

GO:0042770 transdução de sinal em resposta a danos no DNA		
C=131; O=7; E=0.13271; R=52.748; PValue=2.19e-11; FDR=4.65e-09		
Símbolo do gene	Nome do gene	<i>Entrez Gene</i>
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
ATR	ATR serine/threonine kinase	545
BRCA2	BRCA2, DNA repair associated	675
E2F1	E2F transcription factor 1	1869
NBN	nibrin	4683
PLK1	polo like kinase 1	5347
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	5591

Anexo III

Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
AARS	alanyl-tRNA synthetase	16
ABCF2	ATP binding cassette subfamily F member 2	10061
ABCG1	ATP binding cassette subfamily G member 1	9619
ACACA	acetyl-CoA carboxylase alpha	31
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	2181
ADAM32	ADAM metalloproteinase domain 32	203102
ADAR	adenosine deaminase, RNA specific	103
AFF4	AF4/FMR2 family member 4	27125
AGBL5	ATP/GTP binding protein like 5	60509
AHNAK	AHNAK nucleoprotein	79026
AHSA1	activator of HSP90 ATPase activity 1	10598
AP2A2	adaptor related protein complex 2 alpha 2 subunit	161
AQR	aquarius intron-binding spliceosomal factor	9716
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	476
ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 2	488
ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	506
ATP5C1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	509
BABAM1	BRISC and BRCA1 A complex member 1	29086
BAG2	BCL2 associated athanogene 2	9532
BAG6	BCL2 associated athanogene 6	7917
BOD1L1	biorientation of chromosomes in cell division 1 like 1	259282
C12orf40	chromosome 12 open reading frame 40	283461
C6	complement C6	729
CCDC6	coiled-coil domain containing 6	8030
CCDC80	coiled-coil domain containing 80	151887
CCNT1	cyclin T1	904
CCNT2	cyclin T2	905
CCT2	chaperonin containing TCP1 subunit 2	10576
CCT5	chaperonin containing TCP1 subunit 5	22948
CCT6A	chaperonin containing TCP1 subunit 6A	908
CEP170	centrosomal protein 170	9859
CFL1	cofilin 1	1072
CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	54927
CLTC	clathrin heavy chain	1213
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1267

Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
COPB1	coatomer protein complex subunit beta 1	1315
COPB2	coatomer protein complex subunit beta 2	9276
COPG1	coatomer protein complex subunit gamma 1	22820
COPG2	coatomer protein complex subunit gamma 2	26958
DARS	aspartyl-tRNA synthetase	1615
DDB1	damage specific DNA binding protein 1	1642
DDX21	DExD-box helicase 21	9188
DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1	1755
DOCK7	dedicator of cytokinesis 7	85440
DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 1, catalytic	8813
DSP	desmoplakin	1832
EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	1933
EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	8894
EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma	1968
EPPK1	epiplakin 1	83481
ERLIN1	ER lipid raft associated 1	10613
FAM175B	family with sequence similarity 175 member B	23172
FKBP5	FK506 binding protein 5	2289
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597
GCN1	GCN1, eIF2 alpha kinase activator homolog	10985
GLG1	golgi glycoprotein 1	2734
GSPT1	G1 to S phase transition 1	2935
GTF3C1	general transcription factor IIIC subunit 1	2975
HACD3	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	51495
HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	3030
HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	3032
HAUS5	HAUS augmin like complex subunit 5	23354
HECTD1	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 1	25831
HEXIM1	hexamethylene bisacetamide inducible 1	10614
HEXIM2	hexamethylene bisacetamide inducible 2	124790
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	9026
HIST4H4	histone cluster 4 H4	121504
HNRNPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	220988
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	3183
HSP90B1	heat shock protein 90 beta family member 1	7184
HSPA4	heat shock protein family A (Hsp70) member 4	3308
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	10075
IPO4	importin 4	79711

Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
IPO5	importin 5	3843
ITGA9	integrin subunit alpha 9	3680
KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	8570
KIF1BP	KIF1 binding protein	26128
KIF5B	kinesin family member 5B	3799
KLC1	kinesin light chain 1	3831
LARP7	La ribonucleoprotein domain family member 7	51574
LRP1B	LDL receptor related protein 1B	53353
LRPPRC	leucine rich pentatricopeptide repeat containing	10128
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	4172
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	4175
MCMBP	minichromosome maintenance complex binding protein	79892
MEPCE	methylphosphate capping enzyme	56257
MOSPD2	motile sperm domain containing 2	158747
MRPS18B	mitochondrial ribosomal protein S18B	28973
MRPS2	mitochondrial ribosomal protein S2	51116
MRPS27	mitochondrial ribosomal protein S27	23107
MSH2	mutS homolog 2	4436
MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1	4522
MYBBP1A	MYB binding protein 1a	10514
NCAPH	non-SMC condensin I complex subunit H	23397
NEDD1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	121441
NME2	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2	4831
NOP2	NOP2 nucleolar protein	4839
NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1	64324
PDHX	pyruvate dehydrogenase complex component X	8050
PHB	prohibitin	5245
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	26227
POLR2H	RNA polymerase II subunit H	5437
PPP4R1	protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	9989
PPP5C	protein phosphatase 5 catalytic subunit	5536
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	5591
PRPF6	pre-mRNA processing factor 6	24148
PRPF8	pre-mRNA processing factor 8	10594
PRPSAP2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase associated protein 2	5636
QARS	glutaminyl-tRNA synthetase	5859
RAB35	RAB35, member RAS oncogene family	11021
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	5878

Símbolo do gene	Nome do gene	Entrez Gene
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	5879
RHOA	ras homolog family member A	387
RRBP1	ribosome binding protein 1	6238
SEC22B	SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein (gene/pseudogene)	9554
SEC24C	SEC24 homolog C, COPII coat complex component	9632
SEC61A1	Sec61 translocon alpha 1 subunit	29927
SFN	stratifin	2810
SLC16A1	solute carrier family 16 member 1	6566
SLC25A10	solute carrier family 25 member 10	1468
SLC25A13	solute carrier family 25 member 13	10165
SLC27A4	solute carrier family 27 member 4	10999
SLC34A2	solute carrier family 34 member 2	10568
SLC37A4	solute carrier family 37 member 4	2542
SLFN11	schlafen family member 11	91607
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	10592
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	9126
SRPRB	SRP receptor beta subunit	58477
STIM1	stromal interaction molecule 1	6786
STIP1	stress induced phosphoprotein 1	10963
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1	10273
SUGT1	SGT1 homolog, MIS12 kinetochore complex assembly cochaperone	10910
TARDBP	TAR DNA binding protein	23435
TBC1D15	TBC1 domain family member 15	64786
TP53	tumor protein p53	7157
TRABD2A	TraB domain containing 2A	129293
TRAPPC10	trafficking protein particle complex 10	7109
TRIM28	tripartite motif containing 28	10155
TRMT1	tRNA methyltransferase 1	55621
TRPS1	transcriptional repressor GATA binding 1	7227
TTN	titin	7273
UBE2M	ubiquitin conjugating enzyme E2 M	9040
UBR4	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	23352
UNC45A	unc-45 myosin chaperone A	55898
UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	7385
USP7	ubiquitin specific peptidase 7	7874
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	8239
VAR5	valyl-tRNA synthetase	7407
VCP	valosin containing protein	7415
VTA1	vesicle trafficking 1	51534

Símbolo do gene	Nome do gene	<i>Entrez Gene</i>
XPO5	exportin 5	57510
YME1L1	YME1 like 1 ATPase	10730
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	7532
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	7533

Anexo IV

GO:0006839 Transporte mitocondrial		
C=277; O=14; E=2.89; R=4.85; PValue=1.18e-06; FDR=8.96e-04		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	10075
SLC25A13	solute carrier family 25 member 13	10165
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1267
SLC25A10	solute carrier family 25 member 10	1468
KIF1BP	KIF1 binding protein	26128
SFN	stratifin	2810
ACACA	acetyl-CoA carboxylase alpha	31
HSPA4	heat shock protein family A (Hsp70) member 4	3308
ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	506
ATP5C1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	509
TP53	tumor protein p53	7157
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	7532
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	7533
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	9026

GO:0007006 Organização de membrana mitocondrial		
C=97; O=8; E=1.01; R=7.92; PValue=7.58e-06; FDR=2.89e-03		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1267
SFN	stratifin	2810
HSPA4	heat shock protein family A (Hsp70) member 4	3308
CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	54927
TP53	tumor protein p53	7157
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	7532
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	7533
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	9026

GO:0006281 Reparo de danos ao DNA		
-----------------------------------	--	--

C=497; O=17; E=5.18; R=3.28; PValue=1.65e-05; FDR=3.63e-03		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	10075
TRIM28	tripartite motif containing 28	10155
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1	10273
HIST4H4	histone cluster 4 H4	121504
DDB1	damage specific DNA binding protein 1	1642
BOD1L1	biorientation of chromosomes in cell division 1 like 1	259282
BABAM1	BRISC and BRCA1 A complex member 1	29086
MSH2	mutS homolog 2	4436
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
POLR2H	RNA polymerase II subunit H	5437
PPP5C	protein phosphatase 5 catalytic subunit	5536
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	5591
TP53	tumor protein p53	7157
VCP	valosin containing protein	7415
USP7	ubiquitin specific peptidase 7	7874
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	9126
AQR	aquarius intron-binding spliceosomal factor	9716

GO:0031647 Regulação de estabilidade proteica		
C=220; O=11; E=2.29; R=4.8; PValue=1.91e-05; FDR=3.63e-03		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1	10273
CCT2	chaperonin containing TCP1 subunit 2	10576
SUGT1	SGT1 homolog, MIS12 kinetochore complex assembly cochaperone	10910
CCT5	chaperonin containing TCP1 subunit 5	22948
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597
PHB	prohibitin	5245
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	5591
USP7	ubiquitin specific peptidase 7	7874
BAG6	BCL2 associated athanogene 6	7917
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	9026
CCT6A	chaperonin containing TCP1 subunit 6A	908

GO:0007067 Divisão nuclear mitótica		
C=434; O=15; E=4.52; R=3.32; PValue=4.73e-05; FDR=6.87e-03		

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	10592
SUGT1	SGT1 homolog, MIS12 kinetochore complex assembly cochaperone	10910
CLTC	clathrin heavy chain	1213
NEDD1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	121441
FAM175B	family with sequence similarity 175 member B	23172
HAUS5	HAUS augmin like complex subunit 5	23354
NCAPH	non-SMC condensin I complex subunit H	23397
BABAM1	BRISC and BRCA1 A complex member 1	29086
RHOA	ras homolog family member A	387
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
PPP5C	protein phosphatase 5 catalytic subunit	5536
TTN	titin	7273
MCMBP	minichromosome maintenance complex binding protein	79892
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	8239
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	9126

GO:0032200 Organização telomérica		
C=127; O=8; E=1.32; R=6.05; PValue=5.41e-05; FDR=6.87e-03		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
CCT2	chaperonin containing TCP1 subunit 2	10576
HIST4H4	histone cluster 4 H4	121504
CCT5	chaperonin containing TCP1 subunit 5	22948
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	3183
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	5591
USP7	ubiquitin specific peptidase 7	7874
CCT6A	chaperonin containing TCP1 subunit 6A	908

GO:0090559 Regulação de permeabilidade de membrana		
C=70; O=6; E=0.73; R=8.23; PValue=8.74e-05; FDR=8.91e-03		

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1267
SFN	stratifin	2810
TP53	tumor protein p53	7157
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	7532
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	7533
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	9026

GO:0034976 Resposta ao estresse de retículo endoplasmático		
C=262; O=11; E=2.73; R=4.03; PValue=9.36e-05; FDR=8.91e-03		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1	10273
ERLIN1	ER lipid raft associated 1	10613
AARS	alanyl-tRNA synthetase	16
TARDBP	TAR DNA binding protein	23435
SEC61A1	Sec61 translocon alpha 1 subunit	29927
ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 2	488
SRPRB	SRP receptor beta subunit	58477
TP53	tumor protein p53	7157
HSP90B1	heat shock protein 90 beta family member 1	7184
VCP	valosin containing protein	7415
BAG6	BCL2 associated athanogene 6	7917

GO:1903829 Regulação positiva de localização proteica		
C=362; O=13; E=3.77; R=3.45; PValue=1.06e-04; FDR=8.94e-03		

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	10075
TRIM28	tripartite motif containing 28	10155
CCT2	chaperonin containing TCP1 subunit 2	10576
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	2181
CCT5	chaperonin containing TCP1 subunit 5	22948
SFN	stratifin	2810
KIF5B	kinesin family member 5B	3799
IPO5	importin 5	3843
RHOA	ras homolog family member A	387
TP53	tumor protein p53	7157
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	7532
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	7533
CCT6A	chaperonin containing TCP1 subunit 6A	908

GO:0071897 Processos biosintéticos de DNA		
C=194; O=9; E=2.02; R=4.45; PValue=1.96e-04; FDR=1.5e-02		
Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene
MYBBP1A	MYB binding protein 1a	10514
CCT2	chaperonin containing TCP1 subunit 2	10576
CCT5	chaperonin containing TCP1 subunit 5	22948
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	3183
ATM	ATM serine/threonine kinase	472
PHB	prohibitin	5245
TP53	tumor protein p53	7157
VCP	valosin containing protein	7415
CCT6A	chaperonin containing TCP1 subunit 6A	908