



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

*Vanessa Câmara Fernandes*

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA 55K DA PROTEÍNA CDK9 NA  
RESPOSTA AO DANO NO DNA**

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

**RIO DE JANEIRO  
2020**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

*Vanessa Câmara Fernandes*

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA 55K DA PROTEÍNA CDK9 NA  
RESPOSTA AO DANO NO DNA**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

**RIO DE JANEIRO**

**2020**

F363c Fernandes, Vanessa Câmara.

Caracterização funcional da isoforma 55K da proteína CDK9 na resposta ao dano no DNA. /  
Vanessa Câmara Fernandes. – Rio de Janeiro, 2020.  
xvi, 81 f.: il. color.

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

Orientador: Dr. Marcelo Alex de Carvalho.

1. Dano ao DNA - genética. 2. Quinase 9 Dependente de Ciclina - genética. 3. Isoformas de  
Proteínas - genética. 4. Neoplasias - genética. I. Carvalho, Marcelo Alex de (Orient.). II. Instituto  
Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

Catálogo na fonte  
Camila Belo CRB7/5755



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

*Vanessa Câmara Fernandes*

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA 55K DA PROTEÍNA CDK9 NA  
RESPOSTA AO DANO NO DNA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Leonardo Augusto Teixeira Karam**

**Prof. Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira**

**Prof. Dr. Renato Sampaio Carvalho**

**Prof. Dra Helena Lobo Borges**

**Prof. Dra. Sheila Coelho Soares Lima**

**Prof. Dra. Rosane Vianna-Jorge**

**RIO DE JANEIRO**

**2020**

Palavras-chave: 1. Câncer 2. Dano ao DNA 3. CDK9



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

# **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA 55K DA PROTEÍNA CDK9 NA RESPOSTA AO DANO NO DNA**

### **RESUMO**

#### **TESE**

**Vanessa Câmara Fernandes**

A resposta ao dano no DNA (RDD) é crucial para manutenção da estabilidade genômica. Disfunções em proteínas envolvidas nessas vias podem culminar na tumorigênese. Para compreender as vias de RDD, nosso grupo elaborou um estudo sistemático para identificar novas proteínas envolvidas na RDD. Nosso trabalho prévio identificou a cinase dependente de ciclina 9 (CDK9) como um putativo interator das proteínas BRCA1, BARD1 e PTIP. CDK9 apresenta duas isoformas, a isoforma 42k atua na etapa de alongamento da transcrição e na recombinação homóloga (através de sua interação com BRCA1 e BARD1). No entanto, o papel da isoforma 55k permanece pouco explorado. Nesse trabalho, investigamos as diferenças funcionais entre CDK9 42k e 55k, explorando um possível papel da isoforma 55k na via de reparo por recombinação não homóloga por junção de extremidades (NHEJ). Para examinar um possível comportamento ciclo dependente, avaliamos os níveis de CDK9 em células das linhagens hTERT-BJ e MCF7 sincronizadas. Os níveis da isoforma 55k (mRNA e proteína) foram observados aumentados na fase G1. Assim, avaliamos a dinâmica do ciclo celular em células MCF7 proficientes e deficientes para CDK9, superexpressando *CDK9* 42k ou 55k tratadas com radiação ionizante (IR). Um fenótipo de arresto de ciclo celular na fase G1 foi observado somente nas células CDK9 55k. Também avaliamos o efeito de quimioterápicos (cisplatina, etoposídeo e irinotecano) em células MCF7 deficientes para CDK9 e reconstituídas com as isoformas 42k ou 55k. As células CDK9 55k apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular quando comparadas às células CDK9 42k. A putativa associação entre CDK9 e PTIP foi avaliada por de rotinas de *GST-pulldown* e de coimunoprecipitação. Dados preliminares indicaram uma interação seletiva entre CDK9 55k e PTIP. Esses resultados nos levaram a investigar o papel das isoformas de CDK9 na RDD, seguindo a via de NHEJ. Após o tratamento com IR, células CDK9 42k exibiram um padrão de focos induzido por radiação ionizante (IRIF) característico, em contraponto às células CDK9 55k que mantiveram uma localização difusa nuclear. Também investigamos o padrão de IRIF de 53BP1, diferentemente da superexpressão de CDK9 42k que não teve impacto na formação de focos, a isoforma de 55k mostrou um aumento significativo. Em conjunto, nossos dados sugerem que o CDK9 55k desempenha um papel no controle do ciclo celular e na via NHEJ.



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CDK9 55K ISOFORM IN DNA DAMAGE RESPONSE**

#### **ABSTRACT**

#### **TESE**

**Vanessa Câmara Fernandes**

DNA damage response (DDR) is crucial to maintain genomic stability. Dysfunction in proteins involved in this pathway may lead to carcinogenesis. To better understand this network, our group performed a systematic study to identify new proteins involved in DDR. Our previous work identified the cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a putative interactor of BRCA1, BARD1 and PTIP. CDK9 has two isoforms, the 42k isoform plays a role in transcription elongation and homologous recombination control (through interaction with BRCA1 and BARD1). However, CDK9 55k isoform role remains unclear. In this work, we investigated functional differences between CDK9 42k and 55k, exploring CDK9 55k possible role in non-homologous end joining (NHEJ) repair pathway. To examine a possible cell cycle dependent behavior, we evaluated CDK9 levels in hTERT-BJ and MCF7 synchronized cells. CDK9 55k levels (mRNA and protein) were seen increased in G1 phase. Thus, we evaluated the cell cycle dynamics in CDK9 proficient and deficient MCF7 cells treated with ionizing radiation (IR) and overexpressing *CDK9* 42k or 55k. A G1 cell cycle arrest phenotype was observed only in CDK9 55k. We also assessed the effect of chemotherapeutic agents (cisplatin, etoposide and irinotecan) in MCF7 CDK9 deficient cells reconstituted with CDK9 42k or 55k isoforms. CDK9 55k cells showed a significant increase in cellular viability when compared to CDK9 42k cells. The putative association between CDK9 and PTIP was evaluate by GST-pulldown and co-immunoprecipitation assays. Preliminary data indicated a selective interaction between CDK9 55k and PTIP. These results prompted us to investigate CDK9 isoforms role in DDR, following NHEJ pathway. Upon IR treatment, CDK9 42k cells exhibited characteristic ionizing radiation-induced foci (IRIF) as a counterpoint for CDK9 55k cells that sustained a nuclear diffuse localization. We also investigated 53BP1 IRIF, unlike the overexpression of *CDK9* 42k that had no impact in foci formation, 55k isoform showed a significant increase. Taken together, our data suggest that CDK9 55k plays a role in cell cycle control and in NHEJ pathway.

## Agradecimentos

Sempre tenho muito a agradecer e a muitas pessoas.

Primeiro agradeço a Deus pelas pessoas, pelas oportunidades e pela vida.

Agradeço à minha família, que nunca mediu esforços para que eu pudesse ter as oportunidades que me fizeram trilhar os caminhos da ciência. Papai e mamãe, obrigada por tudo que vocês me ajudaram a construir. Amo vocês e tento ser uma pessoa que vocês possam se orgulhar, científica e pessoalmente. Clarissa, obrigada pela amizade e pela preocupação constante. Esse é mais um degrau que sem vocês eu não teria alcançado. Eu agradeço aos meus avós, que foram os alicerces de nossa família, Vó Cede, Vô Nilson (*in memoriam*) e Vó Helena (*in memoriam*), estão sempre comigo, se não presentes, em meu coração.

Orientar é sobre encaminhar e guiar, mas também é sobre ser referência. Por isso eu tenho muito a agradecer ao Marcelo, porque foi uma referência desde que eu estava na Escola Técnica Federal de Química e até hoje, dentro e fora do laboratório. Sempre agradecerei pelas oportunidades, compreensão, **paciência** e principalmente confiança.

Sem minha família de laboratório esse projeto não seria possível. Thales, Anna e Thiago, obrigada por todo apoio durante o doutorado e principalmente nos momentos finais. Obrigada por ficarem felizes comigo e sempre me lembrarem que ia dar certo. Thales, percorrer esse caminho contigo foi fundamental e eu não escolheria outra pessoa. Anna e Thiago, ver o crescimento de vocês (e crescer junto) é a melhor parte. Mesmo que já não faça parte do grupo, obrigada Giu, por todo incentivo, pelas conversas e porque mesmo longe essa sempre vai ser sua família.

E eu tenho que agradecer ao grupinho que mais me diverte (e algumas vezes me preocupa), nossas mascotes. Bruna, Fernanda, Victória e Ana Paula vocês fazem com que eu me lembre porque eu comecei essa carreira e porque eu gosto! Obrigada por sempre estarem por perto e, principalmente, por sempre me fazerem rir.

Obrigada a todos os MECS, vocês me divertem sempre. Obrigada Carol, Ana Luiza, Thayana (e Thalita), Alê, Karol e Carol Poubel vocês fazem nosso ambiente ser acolhedor e as gargalhadas serem constantes. Agradeço a todos da Divisão de Pesquisa Clínica, pela ajuda e amizades. Obrigada ao Leonardo Karam, que me auxiliou nos protocolos de sincronização e citometrias, sempre com muita paciência.

Agradeço à Karina Lani que sempre esteve disponível para me ajudar no citômetro ou com as análises de citometria. Agradeço ao Matheus Rajão que me auxiliou em análises de microscopia.

Agradeço em especial aos amigos que ganhei no INCA e que fazem parte dessa caminhada. Murilo, obrigada por sempre tentar ajudar e pelas conversas de corredor. Tandy, obrigada por toda amizade, companheirismo e por mesmo longe se fazer presente. Amanda, partilhar essa caminhada com você só me mostrou mais ainda a pessoa maravilhosa que você é! Obrigada por tudo!

Eu sempre tenho que agradecer aos amigos de fora do laboratório, Hary, obrigada por sempre ter uma cerveja, entender quão difícil é, não desistir nem me deixar desistir. Obrigada Bel, por toda inspiração, pela liberdade, pelas conversas. Obrigada Dekko, por todos nossos almoços, por sempre me escutar e por sempre me animar! Obrigada Dudu pelas consultas online, porque só assim encontramos você.

Duas pessoas eu queria agradecer em especial, porque falavam comigo todo dia e me ajudaram a passar por essa reta final (com várias curvas): Maira e Babi!

Obrigada Babs, por toda sua preocupação comigo, por todos os almoços, lanches, doces e amor! Obrigada por me abraçar quando eu precisava e por festejar quando estava acabando. Obrigada por me escutar e me fazer rir!

Obrigada Mai, por ser *my person*, por mandar mensagem de manhã para perguntar como vai ser meu dia e de noite para saber como foi. Por entender meu silêncio, sempre estar ao meu lado, me meter em confusões e me fazer gargalhar com suas histórias.

E meu maior agradecimento é para meu marido. Obrigada por me apoiar integralmente, sei que sempre posso contar com você e isso é o que me faz continuar. Desculpa pelas vezes que me atrasei e pelos momentos de estresse, mas pelo menos essa etapa está quase concluída (vamos para os novos estresses e novos atrasos).

Esse documento é mais um degrau, que sem todas essas pessoas eu não conseguiria. A vida além da tese faz a jornada ter um propósito.

“Fight for the things that you care about,  
but do it in a way that will lead others to  
join you”

Ruth Bader Ginsburg

# Sumário

1	Introdução .....	1
1.1	Câncer.....	1
1.2	Biologia do câncer.....	1
1.3	Estabilidade do DNA: mecanismos de vigilância e reparo .....	6
1.3.1	Reparos em danos de simples fita.....	7
1.3.2	Reparos em quebras de dupla fita.....	8
1.3.3	Cinases na resposta ao dano de DNA.....	13
1.4	Ciclo celular e o dano ao DNA .....	14
1.5	CDK9.....	17
2	Justificativa.....	21
3	Objetivos .....	22
3.1	Objetivo Geral .....	22
3.2	Objetivos Específicos .....	22
4	Métodos .....	23
4.1	Cultura de células humanas.....	23
4.2	Construções plasmidiais .....	23
4.2.1	CDK9 55k e 42k.....	23
4.2.2	tBRCTs de PTIP .....	23
4.3	Sequenciamento .....	24
4.4	Sincronização de células hTERT-BJ.....	24
4.5	Sincronização de células MCF7 .....	25
4.6	Transfecção de células humanas.....	25
4.7	Análise do ciclo celular.....	25
4.8	Extratos proteicos.....	26
4.8.1	Extratos proteicos totais .....	26
4.8.2	Extratos proteicos nucleares .....	27

4.9	Immunoblotting.....	27
4.10	Extração de RNA total.....	28
4.11	Síntese do cDNA .....	28
4.12	PCR em tempo real .....	29
4.13	Silenciamento da expressão gênica de CDK9 .....	30
4.14	Ensaio de sensibilidade a quimioterápicos .....	30
4.15	Ensaio de interação proteica.....	31
4.15.1	GST- <i>pulldown</i> .....	31
4.15.2	Coimunoprecipitação .....	31
4.16	Análise da imunofluorescência por microscopia .....	31
5	Resultados .....	33
5.1	Avaliação de CDK9 ao longo do ciclo celular na linhagem hTERT-BJ.....	33
5.2	Caracterização do perfil proteico de CDK9 na linhagem MCF7 .....	40
5.3	Influência da superexpressão de CDK9 na dinâmica do ciclo celular de células MCF7 .....	47
5.4	Influência da reconstituição das isoformas de CDK9 na dinâmica do ciclo celular em células MCF7.....	51
5.5	Avaliação da interação entre CDK9 e PTIP .....	55
5.6	Perfil proteico de CDK9 mediante dano .....	58
5.7	Impacto de CDK9 42k e CDK9 55k na formação de focos de 53BP1 .....	60
6	Discussão.....	64
7	Conclusões .....	72
8	Bibliografia .....	73

## Lista de Quadros

Quadro 4.1 – Sequência dos primers usados para análise de PCR em tempo real, por SYBR Green, de <i>CDK9</i> total, de <i>CDK9</i> 55k e do controle endógeno, <i>ACTB</i> .....	29
---	----

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Características das células tumorais .....	3
<b>Figura 1.2</b> – Via de NHEJ .....	10
<b>Figura 1.3</b> – Via de HR .....	12
<b>Figura 1.4</b> – O gene <i>CDK9</i> e as isoformas 42k e 55k .....	19
<b>Figura 5.1</b> – Perfil de distribuição de células hTERT-BJ nas fases do ciclo celular ..	34
<b>Figura 5.2</b> – Perfil proteico de CDK9 em células hTERT-BJ ao longo das fases do ciclo celular .....	36
<b>Figura 5.3</b> – Perfil proteico e de mRNA de CDK9 em células hTERT-BJ sincronizadas .....	39
<b>Figura 5.4</b> – Perfil de distribuição de células MCF7 nas fases do ciclo celular .....	41
<b>Figura 5.5</b> – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 ao longo das fases do ciclo celular .....	42
<b>Figura 5.6</b> – Perfil de distribuição de células MCF7 nas fases do ciclo celular em função da densidade populacional .....	44
<b>Figura 5.7</b> – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 ao longo do ciclo celular em função da densidade populacional .....	46
<b>Figura 5.8</b> – Análise da dinâmica do ciclo celular na superexpressão de <i>CDK9</i> em células MCF7 .....	48
<b>Figura 5.9</b> – Impacto da superexpressão de CDK9 na dinâmica do ciclo celular em células MCF7 .....	50
<b>Figura 5.10</b> – Análise da dinâmica do ciclo celular na reconstituição de CDK9 em células MCF7 deficientes .....	52
<b>Figura 5.11</b> – Impacto da reconstituição de CDK9 no ciclo celular e na resistência a quimioterápicos em células MCF7 deficientes .....	54
<b>Figura 5.12</b> – Avaliação da interação entre CDK9 e os tBRCTs de PTIP ( <i>pulldown</i> ) ..	56
<b>Figura 5.13</b> – Avaliação da interação entre CDK9 e os tBRCTs de PTIP (coimunoprecipitação) .....	57
<b>Figura 5.14</b> – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 expostas a radiação ionizante .....	59
<b>Figura 5.15</b> – Localização das isoformas de CDK9 mediante dano e impacto da expressão ectópica de CDK9 na formação de focos de 53BP1 .....	61
<b>Figura 5.16</b> – Impacto das isoformas de CDK9 na formação de focos de 53BP1.....	63

## Lista de Abreviaturas

53BP1 – p53 binding protein 1  
aa – aminoácido  
ATM – Ataxia-telangiectasia mutated  
ATR – Ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein  
ATRIP – ATR interacting protein  
BARD1 – BRCA1- associated ring domain 1  
BER – Base excision repair  
BLM – Bloom syndrome recQ like helicase  
BRCA1 – Breast cancer 1, early onset  
BRCA2 – Breast cancer 2, early onset  
BRCT – BRCA1 C terminus  
BRD4 – Bromodomain containing 4  
CDC25A – Cell division cycle 25A  
CDC25C – Cell division cycle 25C  
CDK1 – Cyclin dependent kinase 1  
CDK2 – Cyclin dependent kinase 2  
CDK9 – Cyclin dependent kinase 9  
cDNA – DNA complementar  
CHK1 – Checkpoint kinase 1  
CHK2 – Checkpoint kinase 2  
CTD – C-terminal domain  
CtIP – CTBP-Interacting Protein  
DNA – Deoxyribonucleic acid  
DNA2 – DNA replication helicase/nuclease 2  
DNA-PKcs – DNA-dependent protein kinase subunidade cs  
DNAss – DNA single strand  
dNTP – Desoxirribonucleotídeo difosfatado  
DSB – Double strand breaks (quebras de dupla fita)  
DTT – Ditioneitol  
ECT2 – Epithelial cell transforming 2  
EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético  
EXO I – Exonuclease 1  
XP – Xeroderma pigmentosum

GST – Glutathione S-transferases  
H2A – Histona H2A  
H2AX – Histona H2A, variante X  
H2B – Histona H2B  
HR – homologous recombination  
INCA – Instituto Nacional de Câncer  
MDC1 – Mediator of DNA damage checkpoint 1  
MMR – Mismatch repair  
MRE11 – Meiotic recombination 11  
MRN – MRE11/RAD50/NBS1  
mRNA – RNA mensageiro  
NBS1 – Nijmegen breakage syndrome 1  
NELF – Nasal embryonic luteinizing hormone-releasing hormone factor  
NER – nucleotide excision repair (excisão de nucleotídeos)  
NHEJ – Non-homologous end joining  
PALB2 – Partner and localizer of BRCA2  
pb – pares de base  
PBS – Phosphate buffered saline  
PCR – Polymerase chain reaction  
PEI – Polietilenimina  
PIKK – Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase  
P-TEFb – Positive transcription elongation factor b,  
PTIP – PAX-Interacting protein  
Rb – Retinoblastoma 1  
RDD – Resposta ao dano de DNA  
RIF1 – Replication timing regulatory factor 1  
RNA - Ribonucleic acid  
RNF168 – Ring finger protein 168  
RNF8 – Ring finger protein 8  
RPA – Replication protein A1  
SFB – Soro fetal bovino  
shRNA – Short hairpin RNA  
SI – Sistema imune  
TAP-MS – Tandem affinity purification-mass spectrometry  
tBRCT – Domínio BRCT em tandem

TERT – Telomerase Reverse Transcriptase  
TopBP1 – Topoisomerase (DNA) II binding protein 1  
UBC13 – Ubiquitin C 13  
UBE2A – Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A  
USP11 – Ubiquitin specific peptidase 11  
UV – Ultravioleta  
WHO – World Health Organization  
XRCC4 – X-Ray repair cross complementing 4  
Y2H – Yeast two hybrid  
 $\gamma$ H2AX – Histona H2A, variante X fosforilado

# 1 Introdução

## 1.1 Câncer

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde estimou que em 20 anos a incidência de câncer deve aumentar em 70%. Em 2018, foram contabilizados 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes, no mundo. Esses dados mostram que 1 em cada 5 homens e 1 em cada 6 mulheres desenvolve a doença e, desse grupo, 1 em cada 8 homens e 1 em cada 11 mulheres falece (WHO, 2020).

No Brasil, para 2020, são estimados 625 mil novos casos de câncer (INCA, 2020). Além do alto número de mortes associados ao câncer, há também custos diretos e indiretos correlacionados à doença. Apenas no ano de 2015 foram gastos 3,3 bilhões de reais com tratamento na rede pública de saúde. Um estudo em economias emergentes (Rússia, Índia, China, África do Sul e Brasil), mostrou uma perda, devido a diminuição na produtividade, de 15 bilhões de reais por ano, somente no Brasil, o que representa 0,21% do produto interno bruto (PEARCE et al., 2018).

O aumento dos casos de câncer no mundo possui múltiplos fatores, como envelhecimento da população e hábitos comportamentais. Dessa maneira, além de políticas de prevenção que promovam a diminuição das taxas de incidência, estudos que proporcionem um maior entendimento sobre o câncer e possibilitem novas terapias são fundamentais (INCA, 2020; WHO, 2020).

## 1.2 Biologia do câncer

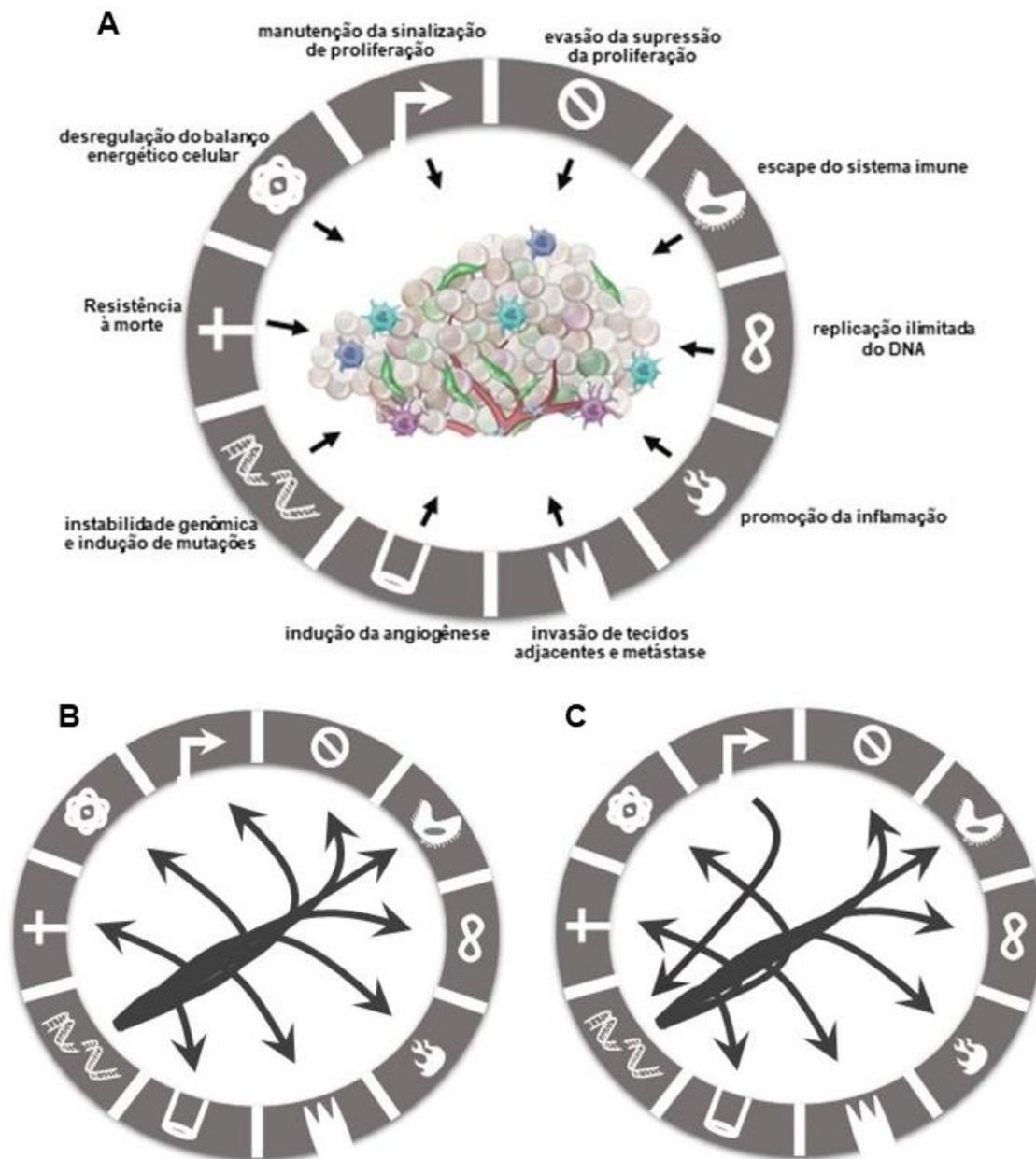
O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum a proliferação desregulada de células, culminando na invasão de órgãos e tecidos (INCA, 2017). Esse processo possui múltiplas etapas, determinando a aquisição de características que facilitam o desenvolvimento do tumor e da malignidade.

Em 2011, Hanahan e Weinberg descreveram as características fundamentais para o desenvolvimento tumoral, são elas: (1) replicação ilimitada do DNA, (2) resistência à morte, (3) invasão de tecidos adjacentes e a metástase, (4) escape do sistema imune, (5) promoção da inflamação, (6) indução da angiogênese, (7) desregulação do balanço energético celular, (8) manutenção da sinalização de proliferação, (9) evasão da supressão da proliferação e (10) instabilidade genômica e indução de mutações (**Figura 1.1A**) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A maioria das células do corpo humano tem um potencial de duplicação limitado devido ao encurtamento dos telômeros. Esse mecanismo é essencial para limitar o número de divisões celulares e assim minimizar possíveis alterações (SOBINOFF & PICKETT, 2017). Quando a replicação do DNA se torna inviável existem duas alternativas: a senescência ou a morte celular. Para contornar essas barreiras, 85% dos tumores reconstituem a expressão do gene *Tert*, que codifica a subunidade catalítica da enzima telomerase e que garante o potencial replicativo ilimitado (HANAHAN & WEINBERG, 2011; AKINCILAR, UNAL & TERGAONKAR, 2016)

A morte celular funciona como uma barreira natural contra o câncer, podendo ocorrer em resposta aos estresses fisiológicos ao longo da vida de uma célula, bem como durante o processo de carcinogênese, como resultado de tratamentos anticâncer (MIYATA, NAKAMOTO & NECKERS, 2012). Nesse sentido, vias como apoptose, autofagocitose e necrose eliminam células com alterações que possam ser prejudiciais ao organismo. Modificações nessas vias podem induzir resistência à morte, garantindo a sobrevivência das células e permitindo o acúmulo de alterações (HANAHAN & WEINBERG, 2011; MATT & HOFMANN, 2016) .

A metástase, responsável por aproximadamente 90% das mortes decorrentes de câncer, é um processo no qual as células do tumor primário migram para um novo sítio, onde se estabelecem e proliferam. Para isso são necessárias múltiplas etapas, que compreendem modificações no microambiente e eventos genéticos e epigenéticos intratumorais (alterações em proteínas do contato célula-célula e célula-matriz e proteínas envolvidas na citostase e migração celular). Essas mudanças garantem uma coordenação espacial e temporal para invasão do tecido adjacente que, eventualmente, culmina com a metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011; GUAN, 2015; JIANG *et al.*, 2015).



**Figura 1.1 – Características das células tumorais.** (A) Principais características das células tumorais que garantem suas vantagens frente às células normais: (1) replicação ilimitada do DNA, (2) resistência à morte, (3) invasão de tecidos adjacentes e a metástase, (4) escape do sistema imune, (5) promoção da inflamação, (6) indução da angiogênese, (7) desregulação do balanço energético celular, (8) manutenção da sinalização de proliferação, (9) evasão da supressão da proliferação e (10) instabilidade genômica e indução de mutações (HANAHAN & WEINBERG, 2011). (B) Quadro observado em casos de câncer hereditário, onde o indivíduo possui alterações que favorecem o quadro de instabilidade genômica, resultando em mutações que conferem as vantagens anteriormente discutidas. (C) Casos de câncer esporádico, onde a desregulação de genes proliferativos resultados no dano ao DNA e eventualmente na instabilidade genômica. Baseado em HANAHAN & WEINBERG (2011) e NEGRINI, GORGOULIS & HALAZONETIS (2010).

As modificações que conferem vantagens às células tumorais decorrem de alterações nas proteínas que, conseqüentemente, alteram a composição dos peptídeos apresentados ao sistema imune (SI). Assim, as células tumorais são reconhecidas e eliminadas (antes de manifestações clínicas) ou ocorre um equilíbrio entre eliminação e proliferação, em uma dinâmica denominada vigilância imune. A constante proliferação dessas células favorece a ocorrência de mutações, resultando na alteração contínua do padrão de antígenos apresentados. Assim, os clones menos imunogênicos ou mais resistentes à lise imunológica são selecionados, o que molda o padrão antigênico tumoral. A pressão seletiva do SI sobre o tumor é chamada de edição imune, e permite o escape do SI e aumento da massa tumoral (DUNN *et al.*, 2002; HANAHAN & WEINBERG, 2011; MUENST *et al.*, 2016).

Como o SI atua sobre o tumor, infiltrados de células na massa tumoral são comuns. Essas células produzem moléculas bioativas, fatores de crescimento, enzimas modificadoras de matriz, espécies reativas e oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Esse ambiente inflamatório, similar a lesões em tecidos não neoplásicos, estimula o crescimento tumoral e angiogênese, propicia a invasão de tecidos adjacentes e a metástase e, além disso, aumentam as taxas mutacionais através da ação do ROS e RNS (HANAHAN & WEINBERG, 2011; RAPOSO *et al.*, 2015; LAW *et al.*, 2017).

O oxigênio e nutrientes são essenciais para a sobrevivência e proliferação das células, normais ou tumorais, além disso tumores em hipóxia são incapazes de proliferar. A vascularização pode ser estimulada por células do sistema imune (através da inflamação) ou por células tumorais, após alterações que resultem na liberação de fatores angiogênicos. Essa característica também é fundamental para a invasão e metástase, pois garante o aporte de nutrientes para um aumento da massa tumoral e amplia o contato entre as células tumorais e os vasos sanguíneos, facilitando a disseminação do tumor (metástase) (HANAHAN & WEINBERG, 2011; PRAGER & ZIELINSKI, 2013; RAJABI & MOUSA, 2017).

Na presença de oxigênio, células normais obtêm energia pela quebra da glicose, seguida da via de fosforilação oxidativa. Por outro lado, em situações de anaerobiose, a energia provém exclusivamente da glicólise, com um rendimento 18 vezes menor. Apesar disso, as células tumorais reprogramam seu metabolismo para que, mesmo na presença de oxigênio, a obtenção de energia ocorra através da glicólise. Esse cenário, conhecido como efeito Warburg, é um mecanismo de adaptação para suportar a proliferação ilimitada, pois produz intermediários de vias relacionadas à

biossíntese (nucleotídeos, aminoácidos e lipídios), o que facilita a produção de macromoléculas e organelas, e conseqüentemente, a proliferação celular (HEIDEN, CANTLEY & THOMPSON, 2009; HANAHAN & WEINBERG, 2011; LIBERTI *et al.*, 2017).

Em tecidos normais, o crescimento e proliferação celular são rigorosamente controlados através do microambiente e das vias de sinalização celular. Os fatores de crescimento, presentes no microambiente, interagem com proteínas da membrana celular promovendo cascatas de sinalização e culminam com a ativação da proliferação. As células tumorais apresentam modificações nessas vias, como a produção dos próprios fatores de crescimento ou alterações em seus receptores (aumento da quantidade ou mudanças estruturais que promovam a ativação constitutiva ou maior sensibilidade aos ligantes) permitindo a proliferação desregulada (HANAHAN & WEINBERG, 2011; MIYATA, NAKAMOTO & NECKERS, 2012).

A regulação da proliferação pelo microambiente impede o aumento desnecessário do número de células, assim, mediante estímulo proliferativo, as células devem produzir uma cópia exata de seu DNA e repartir igualmente seu conteúdo em duas células filhas. Esse processo, denominado ciclo celular, é rigidamente controlado para garantir a integridade do DNA antes, durante e depois da replicação, além de uma divisão estrutural igualitária. De maneira geral, o ciclo celular é dividido em quatro fases e regulado por pontos de checagem que previnem o início de uma nova fase até a finalização bem-sucedida da anterior. Nas células tumorais, alterações em proteínas que compõem esse sistema permitem a continuidade do ciclo celular sem garantir a preservação do DNA ou a divisão igualitária (MALUMBRES & BARBACID, 2001; DESHPANDE, SICINSKI & HINDS, 2005; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Embora nem todos os genes envolvidos nas vias descritas anteriormente sejam conhecidos, sabe-se que mutações em genes específicos podem culminar com o desenvolvimento de tumores. Essas mutações precursoras são chamadas “*drivers*”, pois conferem vantagens de crescimento e sobrevivência em relação às demais células. Nesse sentido, alterações em duas classes de genes são cruciais para o desenvolvimento tumoral: (a) nos genes supressores de tumor – que normalmente controlam a proliferação celular através do monitoramento do ciclo celular, garantindo a integridade do DNA através de mecanismos de reparo a danos, e estimulando a apoptose mediante alterações irrecuperáveis; e (b) nos proto-oncogenes – que geralmente promovem proliferação celular mediante ativação. Falhas nesses

mecanismos podem levar a alterações que comprometam a estabilidade genômica. A instabilidade genômica é um aspecto fundamental na gênese do câncer, pois permite o acúmulo de modificações genéticas que resultam no desenvolvimento da doença (**Figura 1.1B e C**) (NEGRINI, GORGOULIS & HALAZONETIS, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011; ANDOR, MALEY & JI, 2017; BASU, 2018).

### **1.3 Estabilidade do DNA: mecanismos de vigilância e reparo**

Constantemente as células estão expostas a agentes de dano ao DNA, tanto de processos endógenos (subprodutos gerados pelo metabolismo celular, como radicais livres, erros de replicação e da transcrição do DNA) quanto de fontes exógenas (radiação X e UV, agentes químicos – como substâncias alquilantes e *crosslinkers*) (TUBBS & NUSSENZWEIG, 2017). Em células normais, esses danos podem causar mutações, que apesar dos putativos benefícios a longo prazo, como a evolução e a variabilidade genética, a curto prazo podem afetar as funções celulares, ocasionando a inviabilidade ou transformação celular (PAN et al., 2016; GEORGOULIS et al., 2017).

Para a manutenção da viabilidade celular, os organismos desenvolveram um conjunto de vias (com grande conservação evolutiva) responsáveis pela vigilância do DNA (HARPER & ELLEDGE, 2007; PAN *et al.*, 2016). No entanto, mesmo em células com vias de reparo ao dano de DNA íntegras, os insultos podem prevalecer sobre a maquinaria de reparo, o que leva à ativação de vias que promovem a eliminação da célula (TUBBS & NUSSENZWEIG, 2017). Modificações que levem à inativação ou funcionamento inapropriado das vias de resposta ao dano de DNA (RDD), possibilitam a preservação de alterações que impactam na homeostase celular, sendo fonte de instabilidade genética e, conseqüentemente, favorecendo a tumorigênese (ANDOR, MALEY & JI, 2017).

Diferentes tipos de dano são reconhecidos e ativam cascatas específicas para o reparo. De maneira geral, o reparo do DNA pode ser categorizado em 5 vias, onde diferentes conjuntos de proteínas fazem o reconhecimento da lesão, transduzem o sinal de dano e efetuam o reparo (ATAIAN & KREBS, 2006; HARPER & ELLEDGE, 2007). São elas: a excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER), a excisão de bases (*base excision repair* – BER), o reparo por emparelhamento errôneo (*mismatch repair* – MMR), a recombinação homóloga (*homologous recombination* –

HR) e a recombinação não homóloga por junção das extremidades (*non-homologous end joining* – NHEJ) (ATAIAN & KREBS, 2006; CHATTERJEE & WALKER, 2017).

### **1.3.1 Reparos em danos de simples fita**

Estudos iniciais demonstraram o funcionamento dessas vias em organismos mais simples (como bactérias e leveduras), posteriormente, mecanismos similares foram observados em organismos mais complexos (como células humanas) (KOWALCZYKOWSKI, 2015). Apesar das semelhanças, as vias descritas adiante correspondem especificamente a proteínas e funções caracterizadas em células humanas.

Durante a replicação do DNA ocorrem erros por incorporações inadequadas ou ações de agentes químicos ou físicos sobre os nucleotídeos. Quando não reparados pelo próprio complexo de replicação (incorporações errôneas), são reconhecidos por proteínas da via de MMR. O reconhecimento da lesão pelas proteínas MSH/MLH leva ao recrutamento de EXO I e a degradação do sítio de dano. A ressíntese é realizada pela polimerase replicativa e a ligação fosfodiéster restaurada pela DNA ligase I (FISHEL, 2015; CHATTERJEE & WALKER, 2017).

As deaminações, o tipo de dano mais comum ao DNA, e as quebras de simples fita causam pouca distorção à estrutura do DNA, sendo reconhecidas e reparadas através da via longa ou da via curta de BER (ATAIAN & KREBS, 2006). Ambas as vias são iniciadas por glicosilases que reconhecem as lesões e excisam a base danificada. A diferença entre as duas decorre do número de proteínas envolvidas e o número de nucleotídeos removidos. Na via curta o reparo se resume à excisão da pentose no sítio danificado e à reposição do nucleotídeo lesionado, enquanto na via longa ocorre uma excisão de 2 a 13 nucleotídeos e posterior ressíntese da sequência (HAKEM, 2008; ABBOTTS & WILSON III, 2017).

Danos que distorçam a estrutura do DNA, como dímeros de pirimidina ou moléculas que gerem adutos em regiões transcricionalmente ativas resultam na parada da forquilha de transcrição. A via de NER promove a correção dessas lesões, inicialmente realizando a remoção da RNA polimerase do sítio lesionado pela ação das proteínas CSA e CSB. Seguida da excisão de um fragmento de aproximadamente 30 pb, contendo a lesão, e a ressíntese do fragmento (ATAIAN & KREBS, 2006; CICCIA & ELLEDGE, 2011; CHATTERJEE & WALKER, 2017).

### 1.3.2 Reparos em quebras de dupla fita

As quebras de dupla fita (*double strand breaks* – DSB) são o tipo mais tóxico de dano ao DNA, isso porque podem ocasionar a perda do material genético, translocações ou outros rearranjos cromossômicos. Esses danos podem ser reparados majoritariamente por duas vias, a HR e NHEJ clássica - a incapacidade de reparo pode levar a célula à morte, senescência ou instabilidade genômica (CHATTERJEE & WALKER, 2017; RAJIB, DAS & FRANCO, 2018). A ação das vias de HR e NHEJ clássica depende essencialmente de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e no controle da extensão da ressecção no sítio lesionado (CICCIA & ELLEDGE, 2011; LI & XU, 2016).

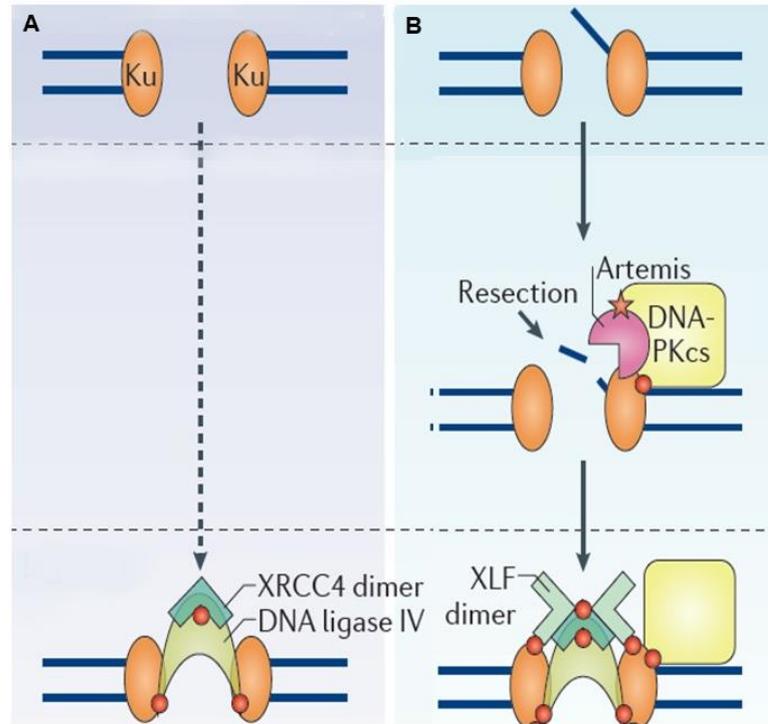
Quando ocorre uma DSB, o complexo MRN (MRE11, RAD50 e NBS1) reconhece e se liga às fitas lesionadas. MRN recruta a proteína ATM, que se autofosforila – resultando em sua monomerização e ativação. ATM ativado fosforila diversas proteínas que cooperam na cascata de sinalização do dano ao DNA, como a histona H2A/H2AX ( $\gamma$ H2A/ $\gamma$ H2AX). Essa sinalização é distribuída bidirecionalmente em até 2 megabases de distância da lesão, gerando uma amplificação de sinal importante para o recrutamento e manutenção das proteínas de reparo na região de dano (CICCIA & ELLEDGE, 2011; OH & SYMINGTON, 2018). As  $\gamma$ H2A/ $\gamma$ H2AX são reconhecidas por MDC1, que também é fosforilado por ATM, promovendo o recrutamento das E3 ubiquitina ligases RNF8 e RNF168, e da E2 ubiquitina ligase UBC13. Esse complexo ubiquitina as histonas H2A/H2AX na região flanqueadora do dano, ampliando a sinalização original (CICCIA & ELLEDGE, 2011; PANIER & BOULTON, 2013).

A histona H2A/H2AX ubiquitinada pode ser reconhecida pelo complexo BRCA1 A (RAP80, BRCA1, BARD1, ABRAXAS, BRCC36, BRE e NBA1) , que regula a via de HR, ou pela proteína 53BP1 (que recruta RIF1, PTIP, REV7, o complexo Shieldin e DYNLL1) e contribui para a via de NHEJ. Tanto BRCA1 (que integra o complexo BRCA1 A) quanto 53BP1 são fosforiladas por ATM em resposta ao dano e funcionam como plataformas de coordenação, recrutando elementos para o reparo e regulando as proteínas efetoras (CICCIA & ELLEDGE, 2011; CAESTECKER & VAN DE WALLE, 2013; LI & XU, 2016).

A via de NHEJ clássica faz o religamento das extremidades lesionadas, o que torna o processo de reparo rápido, porém mutagênico, frequentemente associado a deleções (LI & XU, 2016). Para favorecer essa via, 53BP1, RIF1 e PTIP atuam inibindo a proteína MRE11 (componente do complexo MRN) e, por conseguinte, inibindo a ressecção da extremidade 5' da fita lesionada. O heterodímero Ku70/Ku80 se liga as

fitas lesionadas (**Figura 1.2A e B**) também favorecendo a inibição da ressecção (CICCIA & ELLEDGE, 2011; PANIER & BOULTON, 2013; CHANG *et al.*, 2017).

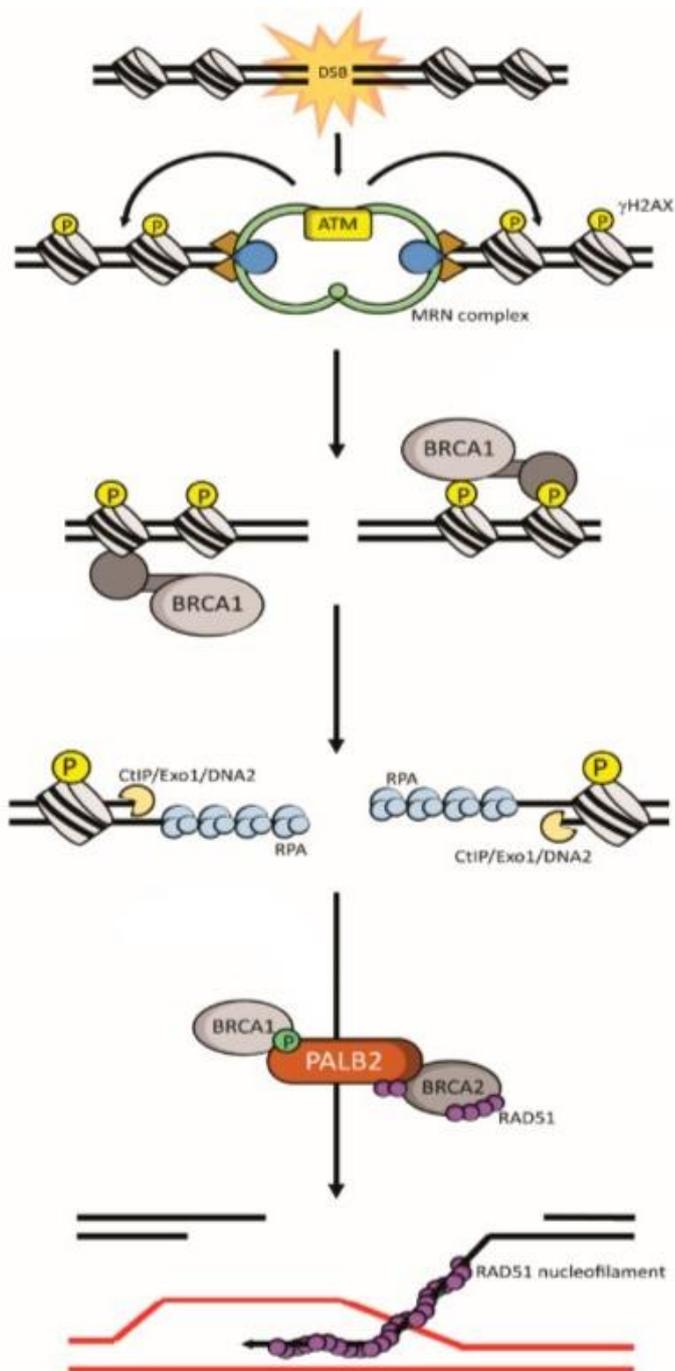
A maioria das DSB geram duas extremidades de DNA incompatíveis, que não podem ser diretamente ligadas. Assim, a DNA-PKcs, complexada com Artemis, é recrutada para sítio de dano e se autofosforila. A DNA-PKcs fosforilada mantém as extremidades lesionadas próximas, formando uma tétrede, e ativa Artemis mediante fosforilação, que realiza uma curta ressecção das extremidades lesionadas do DNA (por volta de 4 nucleotídeos). Após o processamento, o complexo XLF–XRCC4–DNA ligase 4 religa as duas extremidades (**Figura 1.2B**). Quando as lesões não precisam ser processadas, as extremidades são religadas pelo complexo XLF–XRCC4–DNA ligase 4, sem demandar a ação da proteína Artemis (**Figura 1.2A**) (KAO *et al.*, 2005; CICCIA & ELLEDGE, 2011; PANIER & BOULTON, 2013; GOODWIN & KNUDSEN, 2014; CHANG *et al.*, 2017; JACHIMOWICZ, GOERGENS & REINHARDT, 2019)



**Figura 1.2 – Via de NHEJ.** (A) Após a DSB, as extremidades livres do DNA são reconhecidas pelo dímero Ku70/80. Devido à natureza da quebra (sem extremidades protudentes ou modificações químicas), o complexo XRCC4 e DNA ligase IV realizam a união das fitas, sem necessidade de processamento. (B) Após o reconhecimento da lesão pelo dímero Ku70/80, o complexo DNA-PKcs/Artemis é recrutado para promover a ressecção das pontas. A religação das fitas pelo complexo XLF-XRCC4-DNA ligase IV, que pode ocorrer pela junção das extremidades cegas ou através de regiões de microhomologia. Adaptado de CHANG *et al.*, 2017.

Por sua vez, a via de HR utiliza a cromátide irmã como molde para o reparo, garantindo a manutenção da fidelidade da sequência do DNA reparado. Essa forma de reparo está limitada às fases S e G2 do ciclo celular, pois depende do molde homólogo (cromátide irmã) (PANNUNZIO, WATANABE & LIEBER, 2018). A via de HR se inicia com a ativação do complexo MRN, que desloca o complexo Ku80/Ku70 e realiza uma pequena ressecção da extremidade 5' do sítio de dano, expondo uma simples fita de DNA (ssDNA), que é recoberta por RPA (OH & SYMINGTON, 2018). Posteriormente, MRN interage com o complexo CtIP/BRCA1 (complexo BRCA1 C), que promove o recrutamento de EXO1 e DNA2 que aumentam a extensão da ressecção (**Figura 1.3**), e a ssDNA gerada é imediatamente recoberta por RPA. Ao final da ressecção, o complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 realiza a substituição da RPA por RAD51, que medeia a invasão da cromátide irmã, formando uma estrutura chamada de D-loop, e o rastreamento da sequência homóloga para a síntese da fita lesionada (CICCIA & ELLEDGE, 2011; PANIER & BOULTON, 2013). Estudos recentes indicam que essa síntese depende de diversas polimerases (como as polimerases  $\delta$  e  $\epsilon$ ), devido a diversidade de estruturas encontradas. Por fim, a estrutura entre as duas fitas é resolvida por um conjunto de proteínas que inclui helicases (como BLM) e nucleases (como EME1 e TOPO III $\alpha$ ), e é religada pela DNA ligase I (KOWALCZYKOWSKI, 2015; MCVEY *et al.*, 2016).

De maneira geral as vias de reparo possuem proteínas sensoras, mediadoras e efetoras. As proteínas sensoras monitoram constantemente o DNA à procura de distorções estruturais ou quebras, como é o caso do complexo MRN e Ku70/80. A interação das proteínas sensoras com as proteínas mediadoras garante a condução e a amplificação do sinal, com desdobramentos na ativação de outras vias e recrutamento das proteínas efetoras. As principais proteínas que permitem a transdução do sinal gerado pelas proteínas sensoras são as cinases ATM/ATR/DNA-PK que possuem papel central nas vias de RDD (ZANNINI, DELIA & BUSCEMI, 2014)



**Figura 1.3 – Via de HR.** A DSB é reconhecida por MRN, que recruta ATM para o sítio de dano. A interação entre MRN e ATM promove a ativação de ATM e, conseqüentemente, a fosforilação de seus alvos, como a histona H2A/H2AX.  $\gamma$ H2A/H2AX promove o recrutamento de diferentes proteínas para o sítio de dano, dentre elas BRCA1 e seus parceiros de interação. O complexo BRCA1 C, composto por BRCA1 e CtIP é importante para o recrutamento de proteínas essenciais para a ressecção, como as endonucleases EXO1 e DNA2. A degradação de uma das fitas resulta em uma ssDNA, que é recoberta pela proteína RPA. O complexo BRCA1/PALB2/BRCA2 realiza a substituição de RPA (presente na ssDNA exposta) por RAD51 (que interage com BRCA2). No entanto, a interação do complexo depende de modificações pós traducionais que regulam a HR, limitando-o ao final da fase S e em G2. Após a substituição, RAD51 conduz a invasão da cromátide irmã na busca pela sequência homóloga para a ressíntese da região lesionada. Adaptado de NEPOMUCENO *et al.*, 2017.

### 1.3.3 Cinases na resposta ao dano de DNA

Apesar da especificidade de cada via no reparo do DNA, o ponto de analogia é a sinalização inicial realizada por cinases da família PIKK, sendo elas, ATM, DNA-PK e ATR – as duas primeiras associadas à lesão da dupla fita e a última principalmente relacionada à replicação, porém também responsiva a diversos insultos ao DNA que induzem a formação de uma simples fita. ATM, DNA-PK e ATR interagem com NBS1, Ku80 e ATRIP, respectivamente, para serem recrutados para os sítios de dano. Essas interações permitem a identificação dos danos e propiciam modificações pós-traducionais para suas ativações (principalmente autofosforilações), com consequente iniciação das cascatas de RDD (SIRBU & CORTEZ, 2013; AWASTHI, FOIANI & KUMAR, 2016; BLACKFORD & JACKSON, 2017).

A DNA-PK promove a NHEJ através de uma atuação local, por sua autofosforilação e fosforilação de proteínas efetoras do reparo. No entanto, ATM e ATR possuem centenas de alvos conhecidos, que variam de mediadores a efetores das vias de reparo, além de proteínas envolvidas em funções inicialmente não relacionadas com o reparo, mas que favorecem a correção do DNA. Por isso, direta ou indiretamente, ATM e ATR controlam a RDD, pois atuam na ativação de proteínas das vias de resposta, resultando em alterações na cromatina proximal e distal ao sítio de dano e, de maneira global no contexto celular, através da ativação dos mecanismos de controle do ciclo celular, transcrição, mobilidade dos cromossomos, disponibilidade de nucleotídeos e eventualmente apoptose (SIRBU & CORTEZ, 2013; BLACKFORD & JACKSON, 2017). Apesar das semelhanças, ATR é fundamental para a sobrevivência de células proliferativas, pois é ativado mediante estresse replicativo, enquanto a ausência de ATM não tem impacto sobre células em proliferação. No entanto, ATM é essencial para células expostas a agentes de dano ao DNA, uma vez que assegura uma resposta apropriada (LI, PEARLMAN & HSIEH, 2016).

Os papéis desempenhados por ATM e ATR estão relacionados aos seus principais alvos, as cinases CHK2 e CHK1 respectivamente. Por sua vez, os alvos de CHK2 compreendem proteínas das vias de reparo (como BRCA1 e BRCA2), proteínas do remodelamento de cromatina, vias de apoptose e controle do ciclo celular (ZANNINI, DELIA & BUSCEMI, 2014). Os alvos de CHK1 englobam proteínas envolvidas no disparo das origens de replicação, na estabilidade das forquilhas de replicação e na prevenção da progressão do ciclo celular para mitose sem a completa replicação do DNA ou na presença de DNA danificado (além das classes de proteínas mencionadas para CHK2) (AWASTHI, FOIANI & KUMAR, 2016). O diálogo promovido

por CHK2 e CHK1 entre as vias de reparo ao dano de DNA e os mecanismos de controle do ciclo celular são fundamentais porque garantem o tempo necessário para o reparo de uma lesão ao longo de todo ciclo celular, porém principalmente antes de fases críticas como replicação do DNA e mitose.

#### **1.4 Ciclo celular e o dano ao DNA**

O ciclo celular abrange uma série de eventos ordenados e altamente conservados que resultam no crescimento e divisão celular. Esse processo deve garantir que a divisão ocorra em um microambiente favorável, após a duplicação apropriada do DNA, o crescimento celular e ordenação de todas as estruturas celulares. Dessa maneira o ciclo celular é dividido em 4 fases, G1 (momento de o crescimento celular), S (fase de síntese, ou seja, duplicação do DNA), G2 (checagem das estruturas celulares para divisão) e M (divisão celular garantindo conteúdo equivalente para as duas células) (GOLIAS, CHARALABOPOULOS & CHARALABOPOULOS, 2004; HEUVEL, 2005).

O ciclo celular é primordialmente controlado pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs), que fosforilam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular. A atividade das CDKs depende de suas subunidades regulatórias, as ciclinas, e somente o dímero CDK/ciclina possui atividade cinase. Os genes codificantes de CDKs são, em geral, continuamente expressos, no entanto as ciclinas são sintetizadas mediante sinalização, limitando a ação das CDKs e compondo o primeiro nível de controle do ciclo celular. A interação entre algumas ciclinas e suas CDKs depende de fosforilações ou desfosforilações reguladas ao longo do ciclo celular, o que compõe o segundo nível de controle deste processo (GOLIAS, CHARALABOPOULOS & CHARALABOPOULOS, 2004; DURONIO & XIONG, 2013).

Como a integridade do DNA é fundamental, as proteínas que controlam o ciclo celular também controlam um sofisticado e intrincado sistema de RDD, que pode ativar mecanismos de reparo do dano ao DNA, de tolerância a danos e de morte celular que, coletivamente, funciona de modo a diminuir as consequências deletérias do dano (CHATTERJEE & WALKER, 2017). Ao longo do ciclo celular, os chamados pontos de checagem compõem etapas que permitem a avaliação da integridade celular, garantindo a correta replicação e segregação do DNA (LIM & KALDIS, 2013).

As cinases ATM/ATR são fundamentais para sinalização nos pontos de checagem, pois além de ativar as vias de reparo, também estimulam vias decisivas

de controle do ciclo celular (prevenindo a proliferação de células com DNA danificado), mecanismos de morte celular ou senescência na eventual impossibilidade de correção do dano (KAO *et al.*, 2005; CICCIA & ELLEDGE, 2011; ALHMOUD *et al.*, 2020).

O dano ao DNA pode provocar o arresto do ciclo celular em G1, G2 e uma diminuição da velocidade de síntese do DNA. O arresto em G1 objetiva a prevenção da replicação de genomas danificados; já a diminuição da velocidade de síntese do DNA facilita o reparo e garante a integridade do DNA em células comprometidas com a fase S; e o arresto em G2 previne que células com cromossomos lesionados prossigam na mitose. Em todos os casos o arresto ou diminuição da velocidade de progressão disponibilizam tempo para o reparo e evitam que o dano seja ignorado e repassado a novas células, levando a uma catástrofe mitótica ou a perda definitiva de parte do material genético (SMITS & GILLESPIE, 2015). Independente da fase do ciclo celular, a RDD se inicia com o reconhecimento da lesão, que leva à ativação das proteínas ATR e ATM, que fosforilam seus alvos, particularmente CHK1 e CHK2, e disparam cascatas de sinalização que alteram os processos celulares de modo a favorecer o reparo do DNA (GEORGOULIS *et al.*, 2017).

Em G1, os danos resultam na ativação de CHK1 e/ou CHK2 que fosforilam a proteína p53, ativando a transcrição de seus alvos, dentre eles p21 (um inibidor da ação de CDKs) que resulta no arresto do ciclo celular na transição G1/S (HOUTGRAAF, VERSMISSSEN & VAN DER GIESSEN, 2006; ZANNINI, DELIA & BUSCEMI, 2014). A fase S é controlada, em grande parte, pela ativação de ATR, uma vez que essa cinase é responsável pelo disparo das forquilhas de replicação e pela sinalização da maioria dos danos. Como proteínas nas forquilhas de replicação interagem com cada base durante a replicação, essas estruturas são sensíveis às lesões no DNA. Por isso, a ativação de ATR, com consequente ativação de CHK1, altera a cinética de replicação, pois inibe o disparo das forquilhas de replicação tardias e diminui a progressão das forquilhas existentes (HOUTGRAAF, VERSMISSSEN & VAN DER GIESSEN, 2006; LI, & PEARLMAN, 2016; IYER & RHIND, 2017).

Apesar das quebras de dupla fita geradas em S ativarem ATM e CHK2 (discutido no item 1.3.3), a exposição de ssDNA, devido à ressecção, e o revestimento da fita por RPA, também promove a ativação de ATR e consequentemente de CHK1. Nesse sentido, CHK1 e CHK2 atuam em conjunto promovendo a diminuição da velocidade de replicação ou a parada do ciclo celular em G2/M (HOUTGRAAF, VERSMISSSEN & VAN DER GIESSEN, 2006).

Assim como os mecanismos de reparo do DNA atuam sobre a regulação do ciclo celular, o contrário também é observado, principalmente quanto à via de HR. Proteínas que participam na via de HR não se concentram nas regiões de dano em células em G1, sugerindo a inativação da via, no entanto os mecanismos do ciclo celular que controlam esses eventos são pouco compreendidos (HEIJINK, KRAJEWSKA & VAN VUGT, 2013).

Entre esses mecanismos, observa-se a ubiquitinação de PALB2, que impede sua interação com BRCA1, porém pode ser revertida pela deubiquitinase USP11. No entanto, após o dano em G1, USP11 é degradada, o que impede a formação do complexo e a ação da HR. As fases iniciais da HR podem ser controladas através da regulação de CtIP, que é fosforilado em múltiplos resíduos por diferentes CDKs. Essas fosforilações promovem a interação de CtIP com BRCA1 e MRN, além de compor um sítio de reconhecimento e fosforilação para ATM. Em conjunto, esses eventos de fosforilação facilitam o recrutamento de EXO1, favorecendo a ressecção e a HR (WARMERDAM & KANAAR, 2010; ZHAO *et al.*, 2017; SCULLY *et al.*, 2019).

Durante as fases S, G2 e M, as interações PALB2/BRCA1 e BRCA2/RAD51 são reguladas negativamente por fosforilações. PALB2 é fosforilado por CDK1/2 impedindo sua associação a BRCA1, assim como BRCA2 é fosforilado por CDKs (ainda não determinadas) inibindo sua associação a RAD51. Os danos ao DNA ativam pontos de checagem, que são caracterizados pela inibição das CDKs, resultando na atenuação das fosforilações de PALB2 e BRCA2, permitindo a interação com BRCA1 e RAD51, respectivamente. Atualmente diversas outras proteínas fosforiladas por CDKs são conhecidas como NBS1, EXO1 e ATRIP, no entanto, o impacto dessas fosforilações nas vias de RDD ainda são desconhecidos (WARMERDAM & KANAAR, 2010; ZHAO *et al.*, 2017).

Os mecanismos de reparo são suprimidos ao final da fase G2 até a prófase, apesar do recrutamento de MRN para os sítios de dano e da ativação de ATM, as sinalizações ficam restritas à fosforilação das histonas e recrutamento de MDC1. Os mecanismos para essa supressão compreendem a ação da proteína PLK1, que promove a inibição por fosforilação de diversas proteínas envolvidas na sinalização e no reparo do DNA, dentre elas estão CHK2 (impedindo sua dimerização e recrutamento), CHK1 (promovendo sua ubiquitinação e degradação) e 53BP1 (interferindo em seu recrutamento) (SHALTIEL *et al.*, 2015; SCULLY *et al.*, 2019).

## 1.5 CDK9

As CDKs foram primeiramente descritas como proteínas reguladoras do ciclo celular. Atualmente, a família CDK compreende mais de 20 proteínas que não se limitam a atuação no controle do ciclo celular, mas participam de diferentes mecanismos, como o controle transcricional, reparo do dano do DNA, morte celular, diferenciação celular e metabolismo. A maioria das CDKs atua através do controle da transcrição de conjuntos de genes, como o observado no controle do ciclo celular (SHALTIEL *et al.*, 2015).

CDK9 possui duas isoformas: CDK9 42k e CDK9 55k (nomeadas de acordo com seus pesos moleculares), que são codificadas pelo gene homônimo localizado no cromossomo 9q34.1 (GRAÑA *et al.*, 1994; SHORE *et al.*, 2003). As duas isoformas compartilham os éxons 2 a 7 e promotores independentes (posicionados a 500 pb de distância à montante da região codificante) controlam a transcrição plena do éxon 1 (na isoforma 55k) ou parcial (na isoforma 42k), resultando na codificação de 117 resíduos de aminoácidos a mais na região N-terminal da isoforma 55k. Os transcritos que codificam as duas isoformas de CDK9 guardam o mesmo quadro de leitura (**Figura 1.4**) (SHORE *et al.*, 2003; SHORE *et al.*, 2005). O promotor da isoforma 55k é constituído por uma região rica em CG localizada entre os nucleotídeos -145 a -1 de seu ATG inicial. O promotor da isoforma 42k é formado por repetições das sequências consenso (CGGGGG)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, localizadas entre os nucleotídeo -351 a -1 de seu ATG inicial. Embora os dois promotores possuam naturezas semelhantes, o promotor da isoforma 42k é mais forte que o da isoforma 55k (LIU & RICE, 2000).

De maneira geral, a expressão de *CDK9* é ubíqua, com maiores níveis proteicos da isoforma 42k. O balanço entre as isoformas varia de acordo com as condições celulares e o tecido, por exemplo, monócitos não ativados apresentam altos níveis proteicos da isoforma 42k, enquanto a isoforma 55k não é detectada. Após a ativação dos monócitos para diferenciação os níveis proteicos entre as duas isoformas se assemelham (PENG *et al.*, 1998; SHORE *et al.*, 2003; LIU & HERRMANN, 2005). Ambas as isoformas apresentam localização nuclear, sendo que a isoforma 55k pode se apresentar enriquecida nos nucléolos (LIU & HERRMANN, 2005), ou difusa no núcleo. A isoforma 42k é encontrada dispersa no núcleo (SHORE *et al.*, 2005) e uma pequena fração no citoplasma (LIU & HERRMANN, 2005).

Semelhante a outras CDKs, CDK9 depende de suas subunidades regulatórias, composta pelas ciclinas da família T (T1, T2a ou T2b) (GRAÑA *et al.*, 1994; PENG *et*

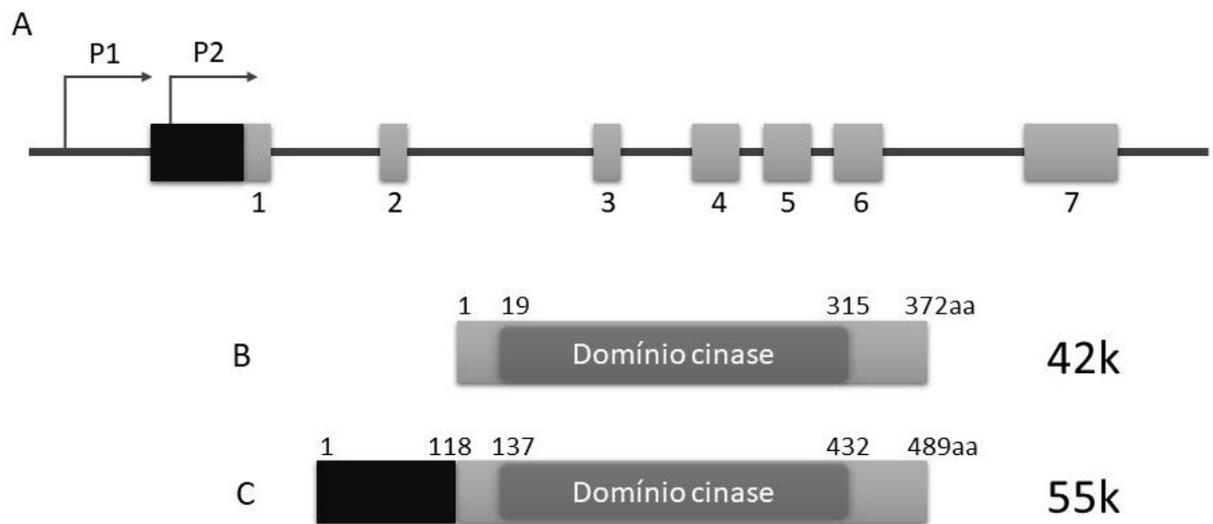
*al.*, 1998; SHORE *et al.*, 2003) e pela ciclina K (FU *et al.*, 1999; SHORE *et al.*, 2003; YU & CORTEZ, 2011) para fosforilação de seus alvos. A literatura demonstra que CDK9, mais precisamente a isoforma 42k, e as ciclinas T apresentam níveis proteicos constantes, que independem do ciclo celular (GARRIGA *et al.*, 2003). Somente Kiernan e colaboradores (2001) divergem no entendimento desse fenótipo e relatam um perfil proteico ciclo dependente (KIERNAN *et al.*, 2001).

O complexo formado por CDK9 e suas ciclinas de interação é conhecido como P-TEFb e é importante para a regulação global da transcrição (MANCEBO *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 1997). P-TEFb fosforila os resíduos de Ser2 do heptapetídeo localizado na cauda CTD da RNA polimerase II, estimulando o alongamento da transcrição (PENG *et al.*, 1998), além de atuar sobre os fatores DISF e NELF, que regulam negativamente a transcrição (BACON & D'ORSO, 2018).

Os níveis de CDK9 e a atividade do complexo P-TEFb é regulada pela interação de CDK9 com snRNP 7SK e BRD4, onde sua associação com snRNP 7SK leva a inibição do complexo, enquanto a associação com BRD4 tem efeito oposto (PAPARIDIS, DURVALE & CANDURI, 2016). A interação com BRD4 parece ser importante para a transcrição de genes essenciais na fase G1 e durante a mitose, pois BRD4 recruta CDK9 para o DNA mesmo com a condensação da cromatina (YANG, HE & ZHOU, 2008).

Diferente da interação com as ciclinas T, que determina a participação de CDK9 em processos transcripcionais, a interação entre CDK9 e a ciclina K parece ser importante para a resposta ao estresse replicativo, no entanto suas funções ainda são pouco conhecidas. A produção de ciclina K é mediada por p53, em resposta ao dano de DNA, e o dímero CDK9/ciclina K participa na estabilização das forquilhas de replicação (através de mecanismos ainda não identificados) e interage com ATR e ATRIP (YU, David S *et al.*, 2010).

Além do estresse replicativo, CDK9 também tem papel em mecanismos de reparo do DNA, como sua interação com Bora, que regula o recrutamento de MDC1 para sítios de dano (CAIRNS *et al.*, 2015a), e sua superexpressão confere radioproteção a células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (STORCH & CORDES, 2016).



**Figura 1.4 – O gene *CDK9* e as isoformas 42k e 55k** (A) Esquema representativo do gene *CDK9*, os retângulos cinzas indicam os éxons, onde o retângulo em destaque (preto) indica a extensão do éxon 1 presente na isoforma 55k. A localização dos promotores está indicada pelas setas, P1 referente à isoforma 55k e P2 à isoforma 42k. (B) Esquema da estrutura da proteína *CDK9* 42k, os números indicam os resíduos de aminoácidos na proteína, em destaque o domínio cinase. (C) Representação da isoforma 55k, a proteína apresenta a mesma composição de aminoácidos que a isoforma 42k, entre os aminoácidos 118 e 489, com a adição de 117 aminoácidos na porção N-terminal da proteína, destacados em preto.

Recentemente, nosso grupo que demonstrou que CDK9 participa da via de HR, pois interage e colocaliza com BRCA1 nos sítios de dano ao DNA, e sua ausência tem impacto na sobrevivência das células mediante exposição à agentes genotóxicos, na dinâmica de reparo e na eficiência da HR (NEPOMUCENO, FERNANDES, et al., 2017). Reforçando o papel de CDK9 em mecanismos de reparo do DNA.

Os dados de Nepomuceno e colaboradores (2017) sobre a o papel da CDK9 no reparo do DNA consideraram somente a isoforma 42k. As rotinas de silenciamento gênico conduziram a depleção das duas isoformas, porém nos ensaios onde CDK9 foi superexpressa, apenas a isoforma 42k foi considerada (NEPOMUCENO, FERNANDES, et al., 2017).

As informações sobre a isoforma 55k são poucas e limitadas, sabe-se que ela desempenha papel na regeneração da musculatura esquelética, como importante ativador transcricional no complexo P-TEFb (GIACINTI *et al.*, 2008) e foi descrita sua interação com o heterodímero Ku70/80, sugerindo uma possível participação na via de NHEJ (LIU *et al.*, 2010).

Apesar das duas isoformas interagirem com as mesmas ciclinas, as diferenças estruturais e de localização, indicam possíveis diferenças funcionais. No entanto, até o momento as interações CDK9/ciclinas T ou ciclina K foram estudadas majoritariamente utilizando a isoforma 42k, portanto as funções e interações da isoforma 55k permanecem indefinidas.

## 2 Justificativa

Para identificar interações proteicas nas vias de RDD, nosso grupo realizou um mapeamento de interações usando um domínio comum em proteínas das vias de RDD, o domínio tBRCT. Esse domínio é encontrado em diversas proteínas como BRCA1, 53BP1 e MDC1, e apesar de não apresentar qualquer atividade enzimática intrínseca, alguns possuem capacidade de reconhecer fosfopeptídeos. O estudo de Woods e colaboradores (2012) identificou através da curadoria da literatura, ensaios de dois híbridos em levedura (Y2H) e ensaios de purificação por afinidade em tandem seguidos de espectrometria de massas (TAP-MS), putativas interações com os tBRCTs de 7 proteínas: DNA LIGASE IV, ECT2, MDC1, TP53BP1, BRCA1, BARD1 e PTIP. A análise dessas possíveis interações pode auxiliar entendimento das vias de reparo do DNA, bem como estabelecer sua correlação com as demais vias que regem o metabolismo celular (WOODS *et al.*, 2012).

A proteína CDK9 foi observada interagindo com BRCA1, BARD1 e PTIP, nos ensaios de Y2H e TAP-MS. O peptídeo interator identificado corresponde à região presente em ambas isoformas da proteína. Nepomuceno e colaboradores (2017) confirmaram a interação da isoforma 42k com BRCA1 e BARD1 e demonstraram a importância de CDK9 para a HR (NEPOMUCENO, FERNANDES, *et al.*, 2017).

Em conjunto, os dados descritos por Woods e colaboradores (2012), sobre a interação entre CDK9 e PTIP (2012), e os dados obtidos por Liu e colaboradores (2010), sobre a interação entre a isoforma 55k e Ku70/80, sugerem a participação de CDK9 55k na via de NHEJ, através da interação com PTIP e Ku70/80, possivelmente regulando a ação de seus mediadores e efetores (LIU *et al.*, 2010; WOODS *et al.*, 2012).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Compreender as diferenças funcionais entre CDK9 55k e CDK9 42k, explorando possível papel da isoforma 55k em mecanismos de NHEJ e sua putativa interação com PTIP.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o perfil de expressão gênica e perfil proteico de CDK9 ao longo do ciclo celular
- Avaliar o impacto das isoformas de CDK9 na dinâmica do ciclo celular
- Avaliar a interação entre CDK9 e PTIP
- Caracterizar o comportamento da isoforma 55k mediante dano ao DNA
- Analisar a influência das isoformas de CDK9 na via de NHEJ

## 4 Métodos

### 4.1 Cultura de células humanas

As linhagens humanas HEK293FT (Invitrogen, Massachusetts, EUA), hTERT-BJ (CRL-4001, ATCC<sup>®</sup>, Virginia, EUA), MCF7 (HTB-22, ATCC<sup>®</sup>) e MCF7 shCDK9 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Life Technologies, Califórnia, EUA) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) e antibióticos, penicilina (1000 U/L) e estreptomicina (100 mg/mL) (ambos Life Technologies), a 37°C em atmosfera contendo 5% v/v de CO<sub>2</sub>. Os subcultivos foram realizados a cada 48-72 horas, quando as culturas apresentavam de 60-70% de confluência da área cultivada, através de dissociação enzimática com solução de tripsina 0,125% p/v e EDTA 0,01% p/v (ambos Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As imagens de microscopia de contraste de fase foram adquiridas no microscópio Observer.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### 4.2 Construções plasmidiais

#### 4.2.1 CDK9 55k e 42k

A construção plasmidial pCMV-FLAG encerrando a sequência que codifica a proteína CDK9 55k foi gentilmente cedida pelo Dr. Andrew Price (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA; SHORE *et al.*, 2005). A construção pCMV-FLAG encerrando a sequência codificante da proteína CDK9 42k foi previamente gerada por nosso grupo (NEPOMUCENO *et al.*, 2017), bem como a construção pEGFP CDK9 42k.

As construções pEGFP CDK9 42k e pEGFP CDK9 55k foram geradas por meio da subclonagem dos cassetes encerrando as sequências codificantes de CDK9 42k e CDK9 55k, originalmente nas construções pCMV CDK9 42k e pCMV CDK9 55k, no vetor pEGFP C1 (Clontech, Califórnia, EUA) resguardando o quadro de leitura do GFP, através dos sítios *EcoRI* e *BamHI* (ambos New England Biolabs, Massachusetts, EUA).

#### 4.2.2 tBRCTs de PTIP

As construções encerrando a sequência codificante para cada um dos três domínios tBRCTs de PTIP foram obtidas por meio de duas subclonagens, a partir das

construções em pNTAP, gentilmente cedidas pelo Dr. Alvaro N. Monteiro (H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute; JHURANEY *et al.*, 2016).

Na primeira rotina de subclonagem, para o vetor de expressão em bactérias pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Illinois, EUA), foram utilizadas as enzimas *EcoRI* e *SaI* (ambos, New England Biolabs). Na segunda rotina de subclonagem foram utilizadas as enzimas *BamHI* e *NotI* (ambos, New England Biolabs) e os fragmentos foram subclonados no vetor de expressão de células de mamífero pEBG (Addgene, Massachusetts, EUA), resguardando o quadro de leitura da sequência codificante da proteína GST.

### **4.3 Sequenciamento**

As construções geradas foram confirmadas através de rotina de sequenciamento automático, utilizando o kit BigDye Terminator v. 3.1 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), segundo instruções do fabricante. A análise dos produtos da rotina de sequenciamento foi conduzida na plataforma ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific) em colaboração com o Programa de Genética do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.

### **4.4 Sincronização de células hTERT-BJ**

A sincronização das células da linhagem hTERT-BJ foi realizada como descrita por CHUANG e colaboradores (2009). Resumidamente, as células foram inoculadas em garrafa de 75cm<sup>2</sup> em densidade aproximada de 70-80% de confluência. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco suplementado com SFB, 48 horas depois a monocamada foi lavada três vezes com PBS (Sigma-Aldrich) e mantida em meio sem SFB por aproximadamente 40 horas.

Para liberação da progressão no ciclo celular, as células foram tripsinizadas e reinoculadas em baixa densidade (expansão de 6 vezes) em meio de cultura suplementado com SFB. Em diferentes intervalos (indicados especificamente em cada experimento), as células foram recolhidas e processadas para análises posteriores. As células não sincronizadas (situação controle) foram mantidas sob as mesmas condições de cultura descritas no item 4.1 e recolhidas junto a primeira amostra sincronizada.

As amostras foram processadas para análise por citometria de fluxo, PCR em tempo real e *immunoblotting*.

#### **4.5 Sincronização de células MCF7**

A linhagem MCF7 foi sincronizada mediante pulso único de timidina, em protocolo adaptado de WHITFIELD e colaboradores (2002). Para isso, as células foram inoculadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> com densidade aproximada de 30-40% e, 24 horas após o inóculo, incubadas com timidina (2 mM; Sigma-Aldrich) por 16 horas. Posteriormente, para liberação da progressão no ciclo celular, a monocamada foi lavada com PBS, incubada com meio fresco e coletada para análises posteriores nos tempos indicados em cada experimento. As células não sincronizadas (situação controle) foram mantidas sob as condições de cultura descritas no item 4.1 e recolhidas junto a primeira amostra sincronizada.

As amostras foram processadas para análise por citometria de fluxo e *immunoblotting*.

#### **4.6 Transfecção de células humanas**

Células da linhagem HEK293FT foram inoculadas em placas de 35mm de diâmetro (5x10<sup>5</sup> células) e, após 24 horas, tratadas com a mistura de transfecção: 3µg DNA, PEI (polietilenimina; Polysciences Inc, Pennsylvania, EUA), na proporção de 4 µL de PEI para cada 1 µg de DNA plasmidial (avolumados a 150 µL com DMEM sem SFB), previamente incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Transcorridas 4 horas da transfecção, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco.

Células da linhagem MCF7 (ou MCF7 shCDK9) foram inoculadas em placa de 35mm de diâmetro (5x10<sup>5</sup> células) e, após 24 horas, tratadas com a mistura de transfecção: 3µg DNA, Fugene<sup>®</sup> (Promega, Wisconsin, EUA), na proporção de 3 µL de Fugene<sup>®</sup> para cada 1 µg de DNA plasmidial (avolumados a 150 µL com DMEM sem SFB), previamente incubada a temperatura ambiente por 15 minutos.

#### **4.7 Análise do ciclo celular**

As células hTERT-BJ e MCF7 coletadas por tripsinização (como descrito no item 4.1), foram lavadas com PBS gelado e fixadas com etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) 70% v/v gelado (-20°C) por, no mínimo, 16 horas.

Células MCF7 e células MCF7 shCDK9 foram transfectadas com as construções pEGFP, pEGFP CDK9 42k ou pEGFP CDK9 55k como descrito no item 4.6. Após 48 horas, sob condições de cultivo padrão (item 4.1), as células foram expandidas na proporção de 1:4 e incubadas sob as mesmas condições.

Após 24 horas, as células foram expostas ou não a radiação ionizante (10Gy), coletadas (por tripsinização, como descrito no item 4.1), nos intervalos indicados em cada ensaio, lavadas com PBS gelado e incubadas com paraformaldeído (Sigma-Aldrich) 0,25% por 20 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas novamente com PBS gelado e permeabilizadas com etanol 70% v/v gelado (-20°C) por, no mínimo, 16 horas. Em todos os passos, a centrifugação das células foi realizada por 5 minutos, a 5.000 RPM (Microcentrifuga 5418, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Após a fixação/permeabilização, as células foram centrifugadas a 5.000 RPM (Microcentrifuga 5418) por 5 minutos, à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspenso em solução de iodeto de propídio (PI) 30µg/mL (Life Technologies) suplementada com RNase A 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente ou durante 16 horas a 4°C, ambos ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 ou no citômetro FACSCalibur™ (ambos BD Biosciences, Nova Jersey, EUA).

Os resultados foram analisados no *software* FlowJo (BD Biosciences) e o perfil populacional de cada amostra determinada por meio do modelo univariado de ciclo celular, pelo algoritmo Watson Pragmatic.

## **4.8 Extratos proteicos**

### **4.8.1 Extratos proteicos totais**

Para obtenção do extrato proteico total, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e ressuspenso em tampão RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM pH 8.0, dodecil sulfato de sódio 0.1%, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0.1%; todos Merck) contendo coquetel de inibidores de protease e fosfatase (ambos Sigma-Aldrich). Exclusivamente para uso nas rotinas de *pull-down*, o tampão foi suplementado com DTT 2,5 mM (Ditiotreitól, Sigma-Aldrich) (RIPA-DTT). Os lisados foram, então, incubados em banho de gelo por 30 minutos e centrifugados por

5 minutos a 4°C e 14.000 RPM (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Georgia, EUA). Os sobrenadantes foram recuperados e armazenados a -80°C.

A concentração total de proteínas presentes nos extratos foi determinada através do ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### **4.8.2 Extratos proteicos nucleares**

Para obtenção de extratos proteicos nucleares, após a tripsinização e lavagem das células com PBS, os *pellets* foram ressuspensos no tampão A (HEPES 50mM pH7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM e NP40 0,2% v/v; todos Merck) contendo inibidores de protease e fosfatase (ambos Sigma) e incubados por 5 minutos em banho de gelo. Após a incubação, os lisados foram centrifugados a 1.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (extrato citoplasmático) foi armazenado a -80°C, enquanto os *pellets* remanescentes foram ressuspensos em tampão B (Tris 20mM pH7,4, glicerol 20% v/v, KCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 0,625mM, todos Merck) e incubados por 30 minutos em banho de gelo. Após a incubação, os lisados foram centrifugados a 14.000 rpm (centrífuga Mikro 200R) por 5 minutos a 4°C e, ao final, o sobrenadante (extrato nuclear) foi armazenado a -80°C.

A concentração total de proteínas presentes nos extratos foi determinada através do ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### **4.9 Immunoblotting**

A avaliação das proteínas foi conduzida por *immunoblotting* (BURNETTE, 1981). Após a dosagem das proteínas totais dos extratos (item 4.7), tampão de amostra (Tris-Cl 125mM pH 6,8, glicerol 30% v/v, SDS 4% p/v, 1,4-ditiotreitol 10% v/v e azul de bromofenol 0,004% p/v, todos Merck) foi adicionado aos mesmos e foram incubados por 5 minutos a 95°C. Posteriormente, as amostras foram resolvidas em rotinas de SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) 10% p/v e eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare), usando o sistema Trans-Blot Semidry (BioRad, Califórnia, EUA), segundo recomendações do fabricante.

Concluída a transferência as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% p/v em TBS-T (TBS: Tris base 50mM, NaCl 150mM; T: Tween-20 0,1% v/v, todos Merck), por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-CDK9 (cat. nº A303-493A; Bethyl Laboratories Inc., Texas, EUA), anti-FLAG (cat. nº F1804, Sigma-

Aldrich), anti-GST (cat. nº sc-138, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA), anti-PTIP (cat. nº A300-370A-M, Bethyl Laboratories Inc.), anti- $\beta$ -Actina (cat. nº sc-47778, Santa Cruz Biotechnology), todos diluídos em TBS-T suplementado com leite desnatado 0,5% p/v, sob agitação constante por 16 horas a 4°C. A membrana foi, em seguida, incubada com os anticorpos policlonais anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (ambos produzidos em cabra, sc-2005 e sc-2004, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology), de acordo com o anticorpo primário utilizado, por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada utilizando o kit *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. A exposição foi realizada tanto em filme radiográfico *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare), quanto utilizando o sistema ChemiDoc (BioRad).

#### **4.10 Extração de RNA total**

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente comercial TRIZOL® (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, ao *pellet* de células foi adicionado o TRIZOL®, seguido de clorofórmio (Merck) e centrifugação por 15 minutos a 4°C e 14.000 RPM. A fase aquosa foi recolhida e adicionado álcool isopropílico (Merck). Após incubação à temperatura ambiente, seguido de outra incubação a 4°C, o extrato foi centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, descartado e o *pellet* tratado com etanol (Merck) 75% v/v e centrifugado por 5 minutos a 7.500 RPM a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente, ressuspensão em água livre de RNase, e incubado a 60°C por 10 minutos para completa solubilização e, posteriormente, estocado a -80°C.

Todas as centrifugações foram realizadas em microcentrífuga Mikro 200R (Hettich).

#### **4.11 Síntese do cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada com 2  $\mu$ g de RNA total, utilizando o kit comercial High Capacity (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) ou SuperScript II (Invitrogen), ambos seguindo as recomendações dos fabricantes. Além da diferença quanto à transcriptase reversa empregada em cada sistema, o kit High Capacity utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos (Applied Biosystems), enquanto na rotina

com a SuperScript II foi usado Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen). As reações foram conduzidas de acordo com as instruções dos fabricantes, no termociclador Veriti (Applied Biosystems).

#### 4.12 PCR em tempo real

A análise quantitativa de RNA mensageiro foi realizada pelo método de PCR em tempo real com detecção por SYBR Green. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação dos cDNAs de *CDK9 55k* (GIACINTI *et al.*, 2008) e *CDK9 total* (DE FALCO *et al.*, 2005), bem como do controle endógeno, *ACTB* ( $\beta$ -actina), estão descritos na **Quadro 4.1**.

Em cada reação foi utilizado 5  $\mu$ L do reagente SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 1  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ M), específico para o gene alvo, 2  $\mu$ L do cDNA (gerado como no item 4.11), e água, perfazendo um volume total de 10  $\mu$ L (adaptado das recomendações do fabricante). As reações foram conduzidas em triplicatas, analisadas na plataforma 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e a quantificação relativa dos mRNAs foi baseada na metodologia do C<sub>T</sub> comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Devido a disparidade no percentual de CG dos alvos, foram estabelecidos parâmetros distintos para análise de cada alvo. Para avaliação da expressão de *CDK9 total* foram empregados cDNAs gerados com SuperScript II, *primer* oligo (dT)<sub>12-18</sub> e a temperatura de anelamento de 65°C. Para avaliação de *CDK9 55k* foram utilizados cDNAs obtidos através do kit High Capacity, *primers* randômicos e temperatura de anelamento de 58°C. O controle endógeno, *ACTB*, foi avaliado paralelamente em ambas condições.

**Quadro 4.1 – Sequência dos *primers* usados para análise de PCR em tempo real**

Gene	Sequência
<b>CDK9 55k</b>	GAGGCCGGAAGTGGCCGTGG
	GTCTTGCGGTGCCTGGCCTTG
<b>CDK9 total</b>	ACGGCCTCTACTACATCCACA
	GCTGCGGGTCCACATCTCTGC
<b>ACTB</b>	CCGGCTTCGCGGGCGACGA
	CGGCCACACGCAGCTCA

#### 4.13 Silenciamento da expressão gênica de *CDK9*

A obtenção de células da linhagem MCF7 estavelmente silenciadas para expressão de *CDK9* foi realizada como descrita por Nepomuceno e colaboradores (2017). Resumidamente, para obtenção das partículas virais, células da linhagem HEK293FT foram transfectadas, como descrito no item 4.12, com as construções pLP1, pLP2, pLP/VSVG, (Virapower, Invitrogen) e com a construção pLKO.1 sh*CDK9* (TRC00000494, Openbiosystems, Louisiana, EUA), que encerra a sequência codificante para RNA do tipo *short hairpin* para o transcrito de *CDK9*.

Transcorridas 48 horas da transfecção, o meio de cultura contendo as partículas lentivirais foi removido e filtrado (elemento filtrante de poro 0,45 µm; Millipore, Darmstadt, Alemanha), suplementado com meio fresco (1:1) e Polybrene® (Sigma-Aldrich) 6 µg/mL. A suspensão foi adicionada às células da linhagem MCF7, previamente inoculadas em placas 35mm de diâmetro (5x10<sup>5</sup> células), e incubada a 37° por 24 horas.

Posteriormente, o meio de cultura das células MCF7 foi substituído por meio fresco suplementado com 2 µg/mL de puomicina (Invitrogen) e mantidas sob seleção por 5 dias. Os níveis proteicos de *CDK9* nas linhagens transduzidas foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting* como descrito no item 4.8.

#### 4.14 Ensaio de sensibilidade a quimioterápicos

Células MCF7 sh*CDK9* foram transfectadas com as construções pEGFP, pEGFP *CDK9* 42k ou pEGFP *CDK9* 55k como descrito no item 4.6. Após 48 horas 5x10<sup>4</sup> células foram inoculadas em poços de 3,85cm<sup>2</sup> (placa de 6 poços) e incubadas sob as condições de cultivo descritas no item 4.1. Transcorridas 24 horas após o plaqueamento, foram adicionados, ou não (condição controle), os quimioterápicos Cisplatina (50µM; Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda, São Paulo, Brasil), Etoposídeo (25nM; Blau Farmacêutica, São Paulo, Brasil) e Irinotecano (25nM; Accord Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) e incubados por 72 horas. Ao final do período de incubação, as células foram coletadas, lavadas com PBS, ressuspensas em solução de iodeto de propídio 30µg/mL (Life Technologies) suplementado com RNase A 100 µg/mL (Sigma-Aldrich), sem permeabilização, e imediatamente analisadas no citômetro FACSCalibur™ (BD Biosciences).

## **4.15 Ensaios de interação proteica**

### **4.15.1 GST-pulldown**

Para o ensaio de *GST-pulldown* foi utilizada a resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A resina foi lavada com tampão RIPA-DTT, descrito no item 4.8.1, depois foi adicionado 1 mg de extrato proteico de células previamente transfectadas (item 4.6), avolumado a 500µL com tampão RIPA-DTT e incubado sob agitação a 4°C por aproximadamente 16 horas.

Posteriormente, a resina, e os complexos proteicos associados a ela, foram lavados 3 vezes com tampão RIPA-DTT e centrifugações de 1000xg a 4°C por 1 minuto. Após as lavagens, a resina foi ressuspensa em tampão de amostra, incubada por 5 minutos a 95°C e analisada por *immunoblotting* (item 4.9).

### **4.15.2 Coimunoprecipitação**

Extratos proteicos nucleares, descritos no item 4.8.2, foram utilizados em rotinas de coimunoprecipitação. Os extratos foram incubados em tampão B/RIPA (1:1, volume final de 500uL) e anticorpos anti-FLAG (cat. nº F1804, Sigma-Aldrich), durante 16 horas a 4°C sob agitação. Posteriormente, a resina Protein A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology) foi adicionada aos extratos e incubada a 4°C por 1 hora sob agitação. A resina, e os complexos proteicos associados a ela, foram lavados 3 vezes com tampão RIPA e centrifugações de 1000xg a 4°C por 1 minuto. Por fim, a amostra foi ressuspensa em tampão de amostra, incubada por 5 minutos a 95°C e analisada por *immunoblotting* (item 4.9).

## **4.16 Análise da imunofluorescência por microscopia**

Células MCF7 foram transfectadas com as construções pCMV FLAG, pCMV FLAG CDK9 42k ou pCMV FLAG CDK9 55k, de acordo com o item 4.6. Transcorridas 24 horas após a transfecção,  $3 \times 10^4$  células foram inoculadas em lamínulas de vidro em poços de cultivo de 1,9 cm<sup>2</sup> de área (placas de 24 poços) e mantidas por 24 horas sob as condições de cultivo padrão (descritas no item 4.1). As células foram submetidas, ou não (condição controle), à radiação ionizante (10Gy) e recuperadas após 3 horas.

As células foram fixadas com paraformaldeído (Sigma) 4% p/v em PBS. A permeabilização foi realizada utilizando solução de Triton-X100 (Sigma) 0,5% v/v em

PBS e o bloqueio com solução de BSA (Sigma) 5% em PBS, a temperatura ambiente e sob agitação. Após o bloqueio as lamínulas foram marcadas com os anticorpos anti-53BP1 (cat nº A300-272A, Bethyl Laboratories) e anti-FLAG (cat. nº F1804, Sigma-Aldrich) em solução BSA 1% em PBS por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação, e posteriormente substituído pelo anticorpo secundário anti-mouse-Alexa 488 (cat nº A-32723, LifeTechnologies) e anti-Rabbit-Alexa 546 (cat. nº A-11035, LifeTechnologies), por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Todas as incubações foram precedidas de 3 lavagens com PBS por 5 minutos a temperatura ambiente e agitação.

A montagem das lâminas foi realizada utilizando corante DAPI (Prolong Gold; Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. As lâminas foram analisadas no microscópio Obsever.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), as imagens foram processadas e os focos quantificados utilizando o *software* ImageJ (National Institute of Health, Maryland EUA).

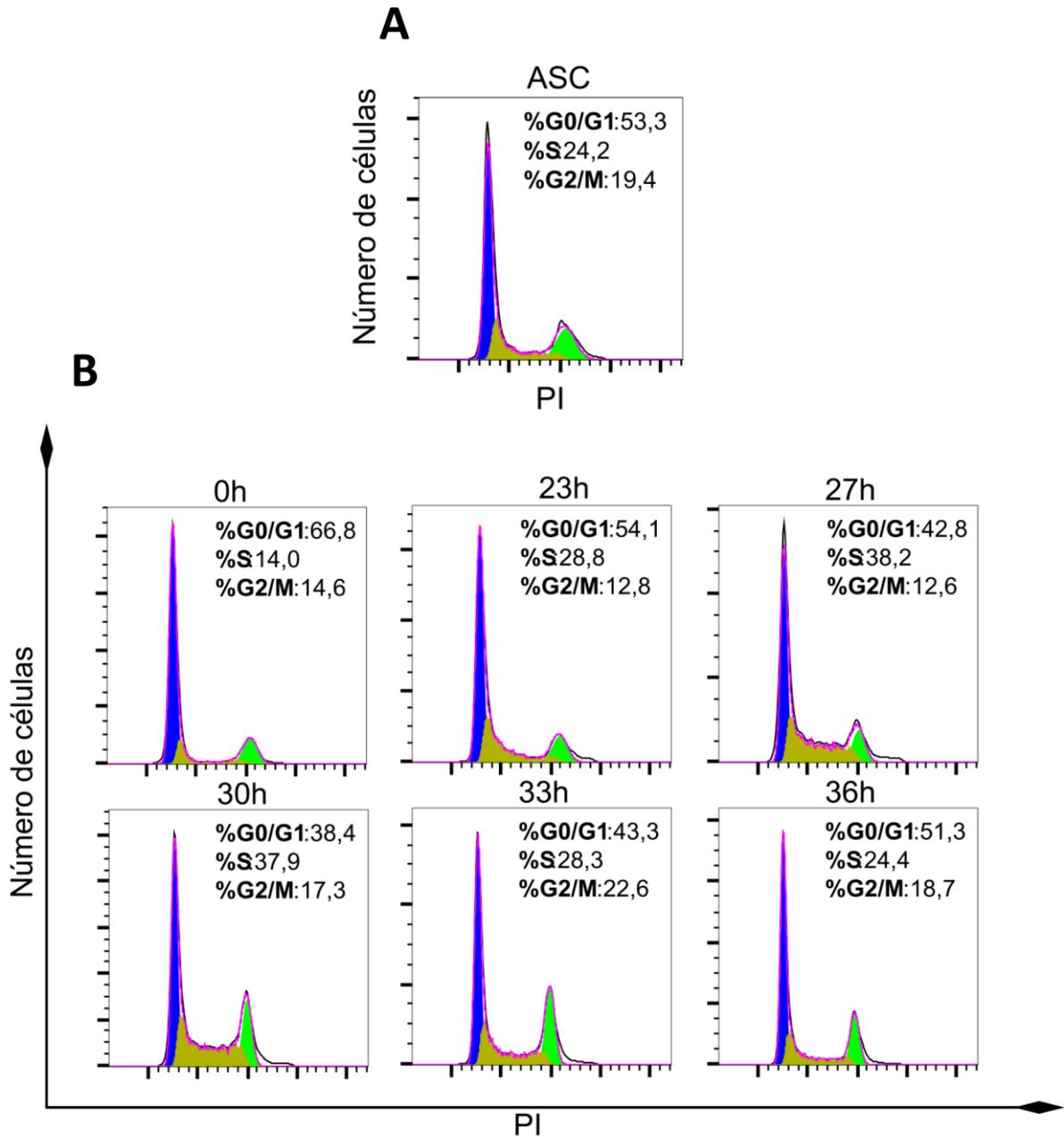
## 5 Resultados

### 5.1 Avaliação de CDK9 ao longo do ciclo celular na linhagem hTERT-BJ

A sincronização da linhagem hTERT-BJ foi conduzida por inibição do crescimento por contato (confluência) e privação de SFB. O perfil de CDK9 (42k e 55k) foi avaliado ao longo do ciclo celular, tanto pelos níveis de proteína como de RNA mensageiro (mRNA). O curso temporal foi estabelecido nos intervalos de 0, 23, 27, 30, 33 e 36 horas após a sincronização e liberação das células para progressão no ciclo celular. As células foram marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo, os resultados foram analisados por meio do *software* FlowJo para discriminação da população nas diferentes fases do ciclo celular (percentual de células em G0/G1, S e G2/M).

A **Figura 5.1** apresenta os perfis de distribuição da população ao longo do curso temporal nas fases do ciclo celular. As amostras sincronizadas (**Figura 5.1B**) foram comparadas com o perfil da amostra assíncrona (controle, **Figura 5.1A**) - mantida sob condições de cultivo padrão (descrito no item 4.1).

Imediatamente após o protocolo de sincronização (0 horas) observa-se um expressivo aumento de células na fase G0/G1 (de 53,3% para 66,8%) e consequente diminuição de células em S e G2/M (24,2% para 14,0% e 19,4% para 14,6%, respectivamente). Nos intervalos de 23 e 27 horas, destaca-se o aumento de células em S (28,8% e 38,2%, respectivamente), enquanto nos intervalos de 30 e 33 horas sobressai o aumento de células em G2/M (17,3% e 22,6%, respectivamente). Após 36 horas as células apresentaram um perfil assíncrono, semelhante ao observado na população controle. Assim, o intervalo de estudo foi limitado entre 0 e 33 horas. (**Figura 5.1A e B**).



**Figura 5.1 – Perfil de distribuição de células hTERT-BJ nas fases do ciclo celular.** A linhagem hTERT-BJ foi sincronizada através da privação de SFB e inibição do crescimento por contato; após 40 horas de sincronização, as células foram liberadas para progressão no ciclo. **(A)** A população assíncrona (ASC) e **(B)** populações recuperadas nos intervalos de 0, 23, 27, 30, 33 e 36 horas pós-progressão foram marcadas com iodeto de propídeo, avaliadas por citometria de fluxo e analisadas pelo *software* FlowJo. Os intervalos do curso temporal estão indicados em cada gráfico. As cores usadas nos histogramas indicam as populações em G0/G1 (azul), S (mostarda) e G2/M (verde). A figura retrata o resultado de um ensaio representativo de um total de três experimentos independentes.

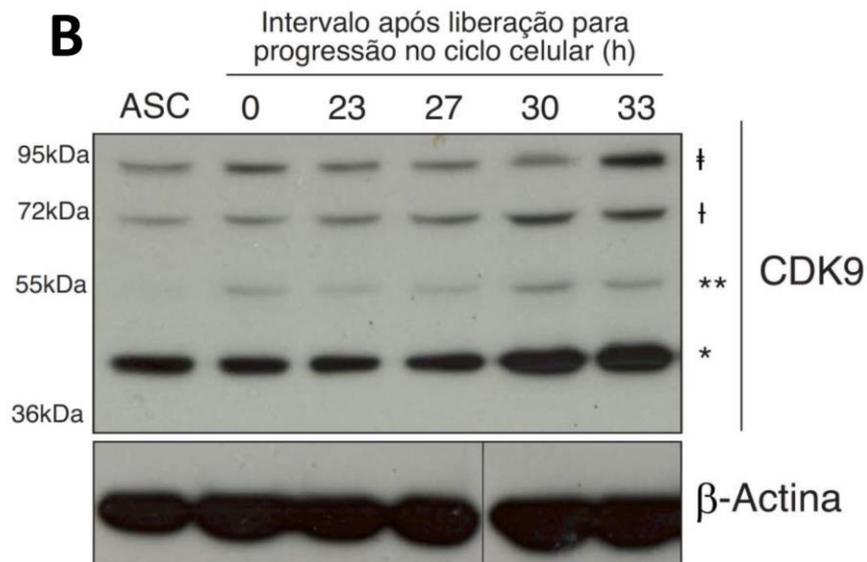
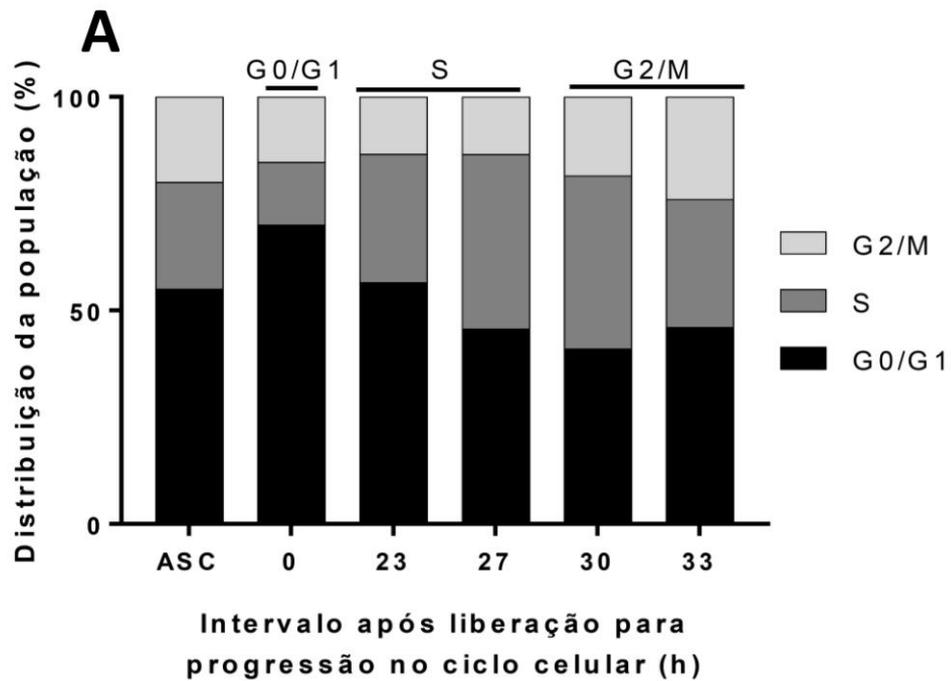
O *software* FlowJo usado na análise de ciclo celular determina a composição da amostra identificando, inicialmente, as populações em G0/G1 e em G2/M e, depois, identificando a população em S e o percentual de sobreposição entre as populações. Por último, algoritmo mapeia o conjunto de valores apresentados por cada população que, somados, se aproximam de 100%. Esse processo faz com que a soma dos percentuais (populações G0/G1, S e G2/M) não seja exatamente 100%, mas um valor próximo (FLOWJO V10, 2020).

Para a comparação direta entre as amostras, os resultados derivados da análise do *software* FlowJo foram normalizados para 100% e apresentados na **Figura 5.2A**. O gráfico destaca o enriquecimento da população em G0/G1 após a sincronização, seguida do aumento de células em S (no intervalo de 23 a 27 horas) e, por fim, o aumento da população em G2/M no intervalo de 30 a 33 horas.

Extratos proteicos totais, obtidos paralelamente à análise de ciclo celular, foram avaliados por *immunoblotting*. Os dados mostram que a isoforma 42k de CDK9 apresenta maiores níveis proteicos que a isoforma 55k em populações assíncronas, corroborando dados da literatura (BACON & D'ORSO, 2018). Esses resultados indicam, também, a prevalência dos níveis proteicos da isoforma 42k independentemente da fase ciclo celular (**Figura 5.2B**).

Além das isoformas de CDK9, o *immunoblotting* permitiu identificar putativas modificações pós-traducionais em CDK9 (**Figura 5.2B**, indicadas por † e ‡), cujo peso molecular é compatível com cadeias de poli-ubiquitina (aproximadamente 9kDa) ou cadeias de poli-sumo (aproximadamente 11kDa). Ambas modificações estão descritas na literatura para a isoforma 42k (COJOCARU, et al., 2011; YU, et al., 2018; MA, et al., 2019) e devido à semelhança estrutural entre as duas isoformas de CDK9, não é possível determinar se essas modificações são exclusivas da isoforma 42k.

Os níveis proteicos das diferentes isoformas de CDK9 mostraram alterações ao longo do ciclo celular, como mostra a análise por densitometria normalizada pelo controle de carregamento ( $\beta$ -Actina). A **Figura 5.3A** evidencia essas alterações, mostrando que os níveis da isoforma 42k aumentaram discretamente em G2/M, enquanto os níveis da isoforma 55k apresentaram flutuações expressivas.



**Figura 5.2 – Perfil proteico de CDK9 em células hTERT-BJ ao longo das fases do ciclo celular.** A linhagem hTERT-BJ foi sincronizada através da privação de SFB e inibição do crescimento por contato. A população assíncrona e as células coletadas após liberação para progressão no ciclo celular nos intervalos indicados foram avaliadas por citometria de fluxo e *immunoblotting*. **(A)** Perfil de distribuição populacional ao longo do ciclo celular, indicadores de enriquecimento nas fases do ciclo estão sinalizados na porção superior do gráfico. **(B)** *Immunoblotting* para identificação dos níveis proteicos das isoformas de CDK9 e de  $\beta$ -Actina. As isoformas 42k e 55k estão indicadas por (\*) e (\*\*), respectivamente; possíveis modificações pós-traducionais estão indicadas por (†) e (‡). Ensaio representativo de três experimentos independentes.

A isoforma 55k foi detectada imediatamente após a sincronização (0 hora, fase G0/G1) e, durante a progressão para a fase S (23 e 27 horas) seus níveis diminuíram. A progressão da fase S para G2 (27 e 30 horas) foi acompanhada do aumento dos níveis de CDK9 55k, que tenderam a diminuir ao longo de em G2/M (30 e 33 horas).

Curiosamente, mesmo com a predominância de células na fase G0/G1 na população assíncrona, a isoforma CDK9 55k não foi detectada; diferente da população sincronizada (0 hora) (**Figura 5.2B**).

Esse conjunto de dados sugere que a isoforma 55k é regulada ao longo do ciclo celular e que os níveis proteicos estão sensivelmente diminuídos na fase S.

As alterações dos níveis proteicos podem decorrer tanto da regulação da própria proteína (mediante modificações pós traducionais e degradação), quanto dos controles de expressão gênica - em última análise revelados pelos níveis de mRNA. Assim, as frações de RNA total de células hTERT-BJ sincronizadas e enriquecidas nas fases G0/G1, S e G2/M (intervalos de 0, 27 e 33 horas, respectivamente) foram coletadas paralelamente à análise de ciclo celular. O RNA foi usado para síntese do cDNA e posterior avaliação da expressão de *CDK9* por PCR em tempo real, usando como controle endógeno a expressão do gene *ACTB* (codificante da  $\beta$ -Actina).

As diferenças entre as sequências do mRNA das isoformas 42k e 55k de CDK9 não permitem a discriminação da isoforma 42k na rotina de PCR em tempo real. Limitando a análise à expressão da isoforma 55k e de CDK9 total.

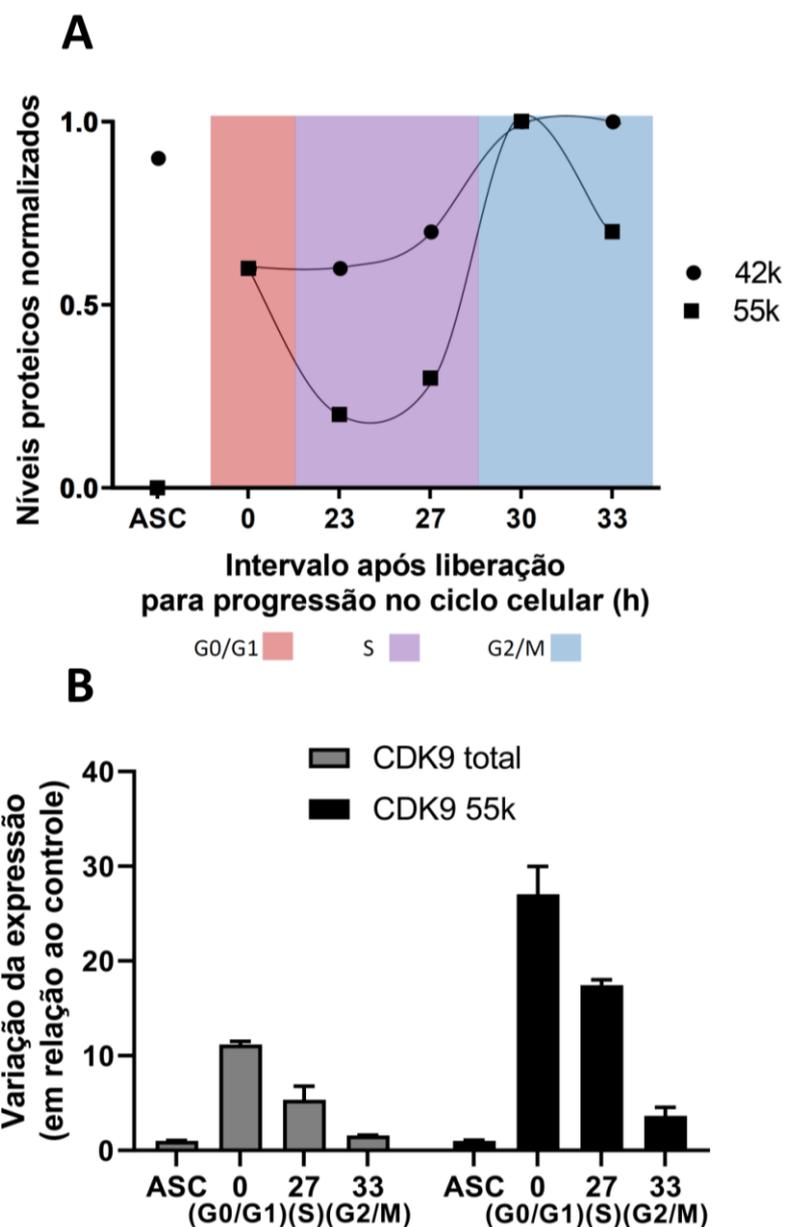
Além disso, as condições ideais estabelecidas para avaliação do mRNA da isoforma 55k e do mRNA de *CDK9* total não foram as mesmas, limitando comparações diretas. A isoforma 55k foi avaliada utilizando um cDNA gerado a partir de oligonucleotídeos randômicos (kit High Capacity, temperatura de anelamento de 58°C, como descrito no item 4.12), enquanto a avaliação do mRNA de CDK9 total foi conduzida usando o cDNA gerado a partir de oligonucleotídeos (poli)dT (enzima SuperScript II, temperatura de anelamento de 65°C, como descrito no item 4.12).

A análise dos níveis de mRNA para CDK9 total, bem como da isoforma 55k (ambos normalizados por *ACTB*) sugerem variações significativas de expressão mediante progressão no ciclo celular. Em ambas avaliações, observa-se uma expressão elevada imediatamente após a sincronização (0h, G0/G1), seguida de diminuição ao longo de S até G2/M (27h e 33h, respectivamente), onde o mRNA atinge níveis semelhantes ao controle assíncrono (**Figura 5.3B**).

O perfil de mRNA da isoforma 55k nos intervalos de 0 e 27 horas coincide com o perfil proteico observado em amostras coletadas no mesmo intervalo. Enquanto o

aumento de proteína observado no intervalo de 33 horas, não é acompanhado pelo aumento da expressão da isoforma 55k. Apesar dos altos níveis proteicos da isoforma 42k em todas as amostras, e do aumento da isoforma 55k em determinadas amostras, os níveis de mRNA para *CDK9* total sugerem uma regulação transcricional ciclo dependente, com perfil semelhante a expressão da isoforma 55k.

Esse conjunto de dados sugere que *CDK9* é regulada ao longo do ciclo celular, tanto a nível proteico, quanto a nível de mRNA. Os resultados apontam alterações de ambas isoformas, porém esse fenótipo é mais evidente para a isoforma 55k.



**Figura 5.3 – Perfil proteico e de mRNA de CDK9 em células hTERT-BJ sincronizadas.** A linhagem hTERT-BJ foi sincronizada através da privação de SFB e inibição do crescimento por contato. A população assíncrona e as células coletadas nos intervalos indicados foram avaliadas por citometria de fluxo, *immunoblotting* e PCR em tempo real. **(A)** Correlação entre os níveis proteicos das isoformas de CDK9 e o ciclo celular. Os níveis proteicos das isoformas 42k e 55k foram determinados a partir da densitometria do *immunoblotting* (**Figura 5.2B**) e normalizados pela densitometria das bandas de  $\beta$ -Actina e, também, pela amostra de maior abundância no curso temporal. Os círculos e quadrados indicam os níveis proteicos de CDK9 42k e CDK9 55k, respectivamente; as cores em segundo plano indicam o enriquecimento nas fases do ciclo celular (G0/G1 em rosa, S em roxo e G2/M em azul). As curvas interligando os pontos são extrapolações do comportamento das proteínas. **(B)** Níveis de expressão para *CDK9* total ou para *CDK9* 55k em células hTERT-BJ assíncronas ou sincronizadas (0, 27 e 33 horas); análise por PCR em tempo real (método SYBR Green) utilizando como controle endógeno o gene *ACTB* (codificante para  $\beta$ -Actina). A variação de expressão está representada em relação ao controle de células assíncronas (ASC). Resultados de um experimento preliminar.

## 5.2 Caracterização do perfil proteico de CDK9 na linhagem MCF7

A análise do perfil proteico das isoformas de CDK9 ao longo do ciclo celular na linhagem hTERT-BJ sugeriu um comportamento ciclo celular dependente para as duas isoformas, mas de maneira mais evidente para a isoforma 55k.

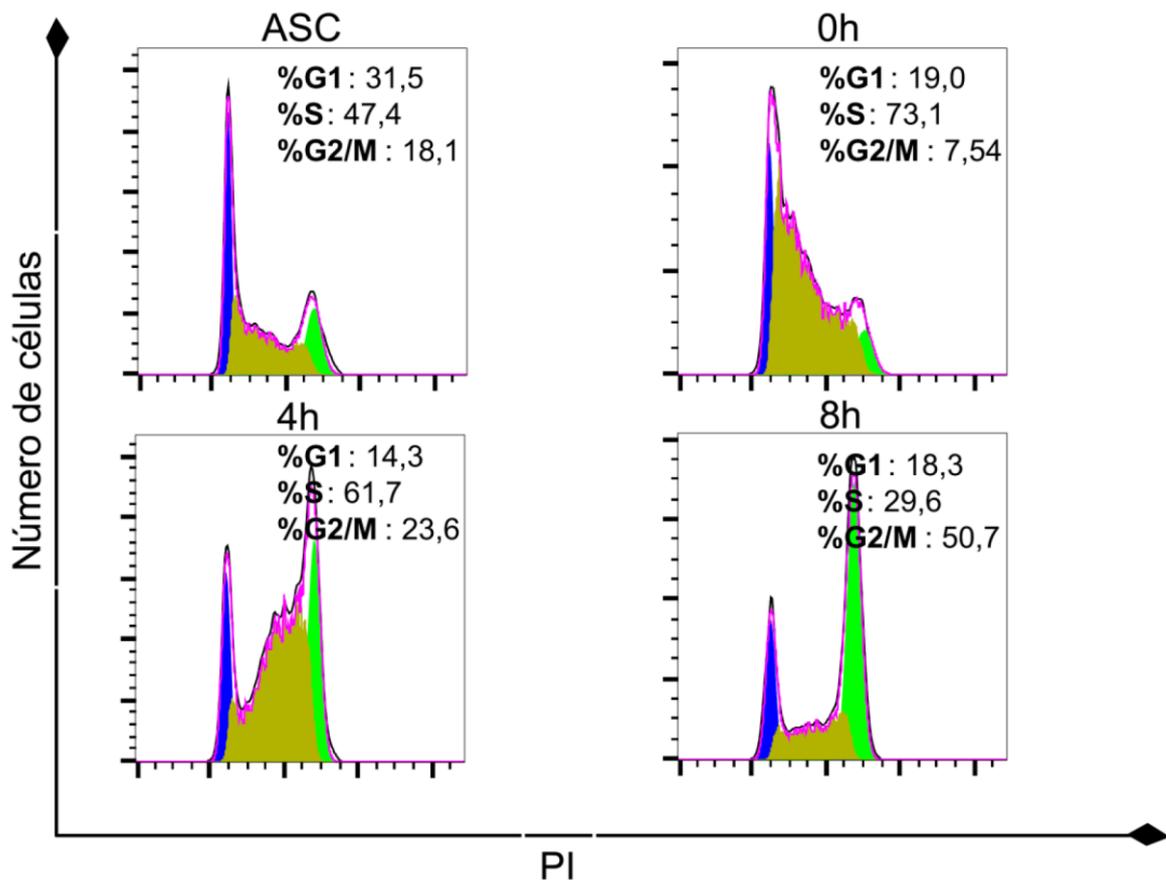
A fim de averiguar a correlação em outro modelo celular, os perfis proteicos de CDK9 42k e 55k foram avaliados na linhagem MCF7. Para a sincronização, as células foram submetidas ao tratamento com timidina por 16 horas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo em um curso temporal: 0h (imediatamente após o tratamento), 4 e 8 horas. Os resultados da citometria de fluxo foram analisados por meio do *software* FlowJo.

A **Figura 5.4** representa os perfis de distribuição das populações celulares ao longo do curso temporal nas fases do ciclo. Células MCF7 assíncronas (ASC) mostram uma distribuição diferente da observada para hTERT-BJ assíncronas (**Figura 5.1**), onde a população na fase S é predominante (47,4%), seguida pela fase G1 (31,5%) e de células em G2/M (18,1%).

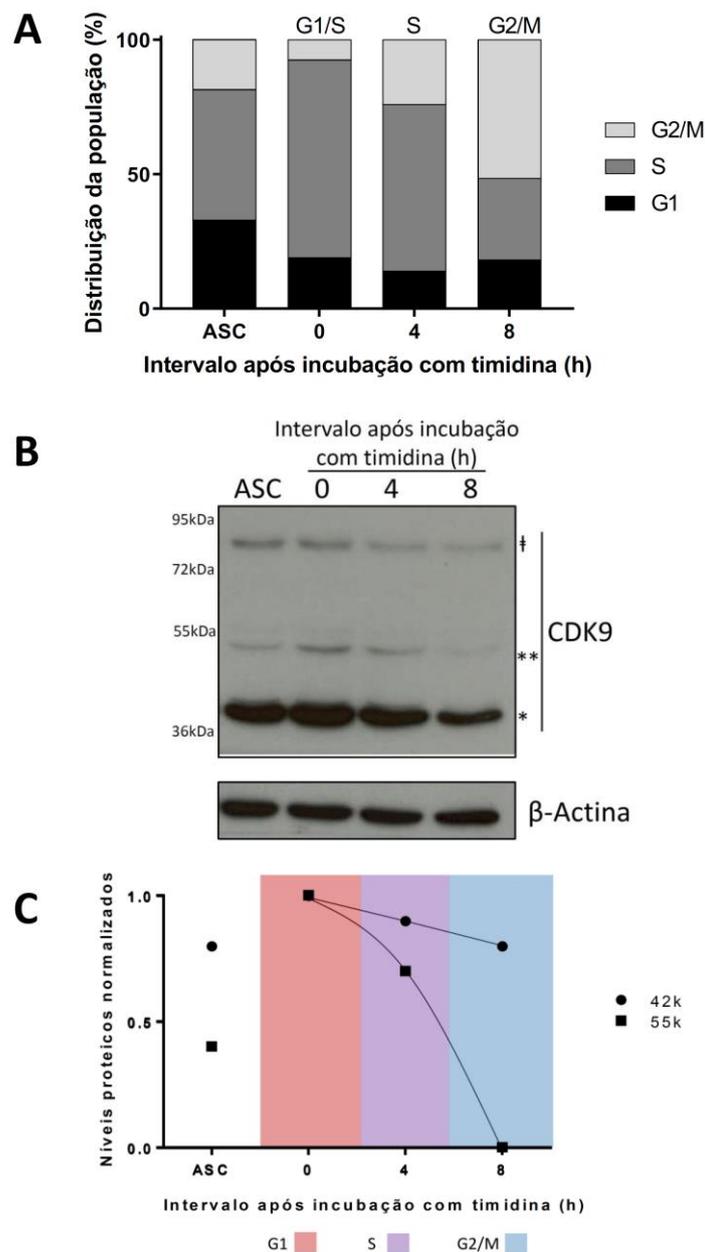
A sincronização por pulso de timidina promove o acúmulo de células nas fases G1 e S (WHITFIELD, et al, 2002; ADOLPH & PHELPS, 1982). E esse foi o cenário observado nas células MCF7 imediatamente após o pulso de sincronização (0 hora): 19,0% da população em fase G0/G1 e 73,1% em fase S; a soma das populações representa 92,1% do total de células. Um aumento expressivo quando comparado com o mesmo somatório nas células assíncronas (78,9%). As células coletadas 4 horas após o tratamento com timidina apresentaram aumento de células em fase S tardia (61,7%), enquanto as células coletadas no intervalo de 8 horas mostraram o enriquecimento da população em G2/M (50,7%) (**Figura 5.4**).

A **Figura 5.5A** resume os resultados derivados da análise do *software* FlowJo, após normalização para 100%. O gráfico destaca o enriquecimento da população em G1/S imediatamente após a sincronização (0 hora), seguida do aumento de células em S (no intervalo de 4) e, por fim, o aumento da população em G2/M no intervalo de 8 horas.

A análise dos extratos proteicos totais obtidos paralelamente à análise de ciclo celular, mostrou níveis detectáveis de CDK9 55k em células assíncronas (**Figura 5.5 B**, ASC), diferente do observado na linhagem hTERT-BJ. Por outro lado, em concordância com os aspectos observados no modelo usando a linhagem hTERT-BJ, a isoforma 42k apresentou maiores níveis proteicos do que a isoforma 55k, independente da fase do ciclo celular.



**Figura 5.4 – Perfil de distribuição de células MCF7 nas fases do ciclo celular. (A)** Células da linhagem MCF7 foram sincronizadas por pulso de timidina e coletadas imediatamente após a sincronização e nos intervalos de 4 e 8 horas após a liberação para progressão no ciclo celular. As amostras sincronizadas e assíncronas foram marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados pelo *software* FlowJo. Os intervalos do curso temporal estão indicados em cada gráfico. As cores usadas nos histogramas indicam as populações em G1 (azul), S (mostarda) e G2/M (verde). A figura retrata o resultado de um ensaio representativo, de um total de três ensaios independentes.



**Figura 5.5 – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 ao longo das fases do ciclo celular.** Células da linhagem MCF7 sincronizadas por pulso de timidina, coletadas nos intervalos indicados e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Perfil de distribuição populacional ao longo do ciclo celular, indicadores de enriquecimento nas fases do ciclo estão sinalizados na porção superior do gráfico. **(B)** *Immunoblotting* para identificação dos níveis proteicos das isoformas de CDK9 e de  $\beta$ -Actina; as isoformas 42k e 55k estão indicadas por (\*) e (\*\*), respectivamente, possível modificação pós-traducional indicada por (†). **(C)** Correlação entre os níveis proteicos das isoformas de CDK9 e o ciclo celular. Os níveis proteicos foram determinados a partir da densitometria do *immunoblotting* e normalizados pela densitometria de  $\beta$ -Actina e, também, pela amostra de maior abundância no curso temporal. Os círculos e quadrados indicam os níveis proteicos de CDK9 42k e CDK9 55k, respectivamente; as cores em segundo plano indicam o enriquecimento nas fases do ciclo celular (G1 em rosa, S em roxo e G2/M em azul). As curvas interligando os pontos são extrapolações do comportamento das proteínas. A figura retrata o resultado de um ensaio representativo de dois experimentos independentes.

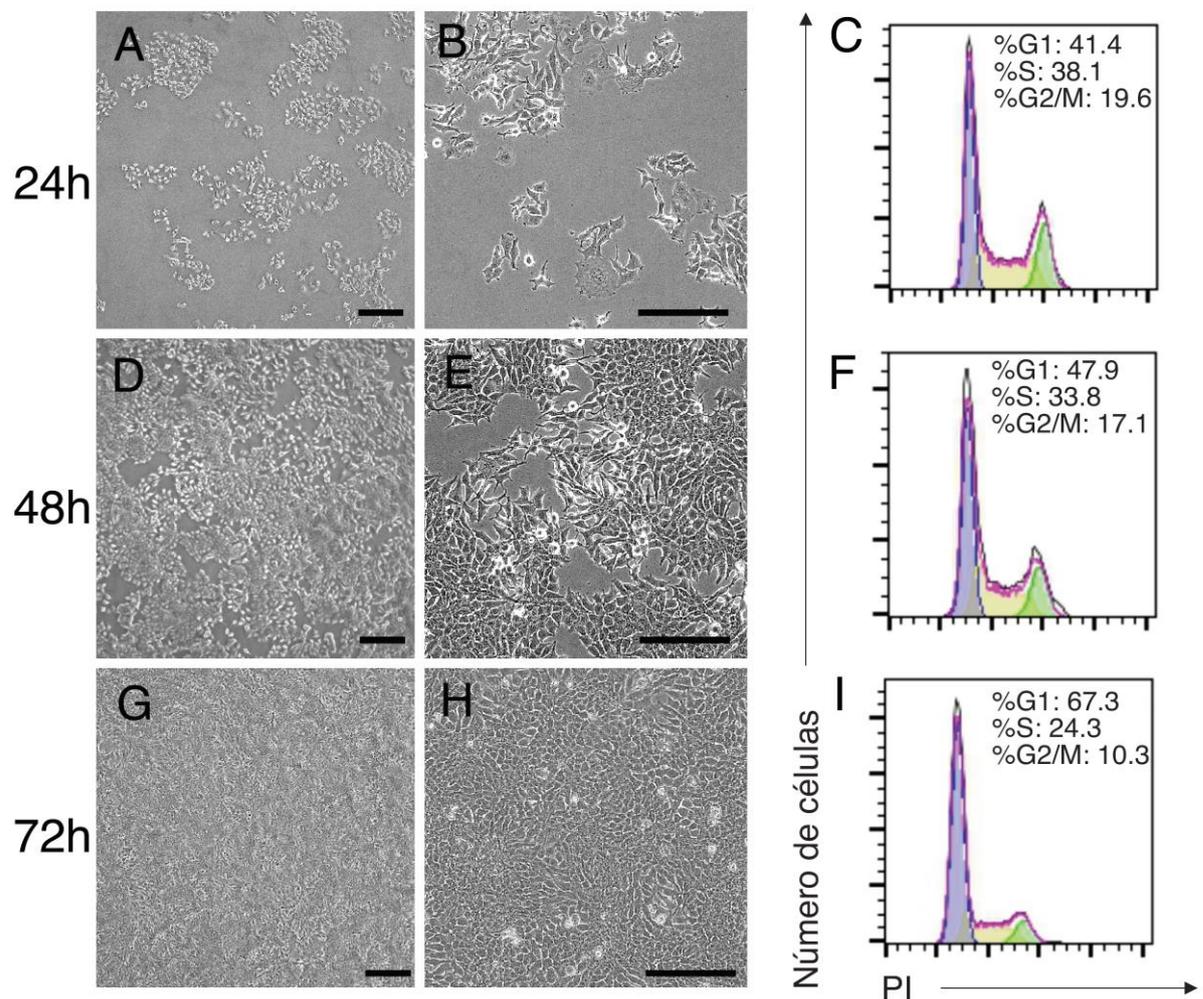
Os níveis proteicos das diferentes isoformas de CDK9 mostraram alterações ao longo do ciclo celular, como mostra a análise por densitometria normalizada pelo controle de carregamento ( $\beta$ -Actina), **Figura 5.5C**. Imediatamente após a sincronização (0 hora, fase G1), as isoformas apresentaram seus maiores níveis. Nos intervalos de 4 e 8 horas (correspondentes às fases S e G2/M, respectivamente), os níveis proteicos diminuíram progressivamente. No entanto, enquanto a isoforma 42k apresentou uma diminuição de aproximadamente 20% (8 horas), a isoforma 55k exibiu uma diminuição mais expressiva, próxima a 100% (**Figura 5.5 C**).

Os resultados obtidos nos ensaios de sincronização das linhagens hTERT-BJ e MCF7 indicaram um perfil ciclo dependente para os níveis proteicos de CDK9, sendo mais perceptível o aumento da isoforma 55k na fase G1.

Células tumorais ou imortalizadas sob condições ótimas de cultivo apresentam proliferação constante, no entanto, sob condições de estresse como a confluência da monocamada e esgotamento do meio de cultura, as células tendem a retardar a proliferação (MLADENOV et al., 2016). Considerando esse cenário, células MCF7 foram cultivadas até confluência da monocamada (sem trocas de meio ou subcultivo) e avaliadas em um curso temporal de 24, 48 e 72 horas após o inóculo.

A **Figura 5.6** mostra as culturas em imagem de microscopia de contraste de fase e sua respectiva análise de distribuição de populações ao longo do ciclo celular. Após 24 horas, ainda em baixa densidade celular (**Figura 5.6A e B**), o perfil populacional se assemelha a células assíncronas (**Figura 5.4, ASC**), com 41,4% da população em fase G1, 38,1% em S e 19,6% em G2/M (**Figura 5.6C**).

No intervalo de 48 horas, com aumento da densidade celular (monocamada pré-confluente; **Figura 5.6D e E**), constata-se um discreto aumento da população em fase G1 (47,9%; **Figura 5.6F**) e diminuição das populações em S e G2/M, indicando uma redução da proliferação. Após 72h, observa-se a cultura confluenta (**Figura 5.6G e H**), e o perfil de ciclo celular mostra um acentuado acúmulo da população em fase G1 (67,3%; **Figura 5.6I**).

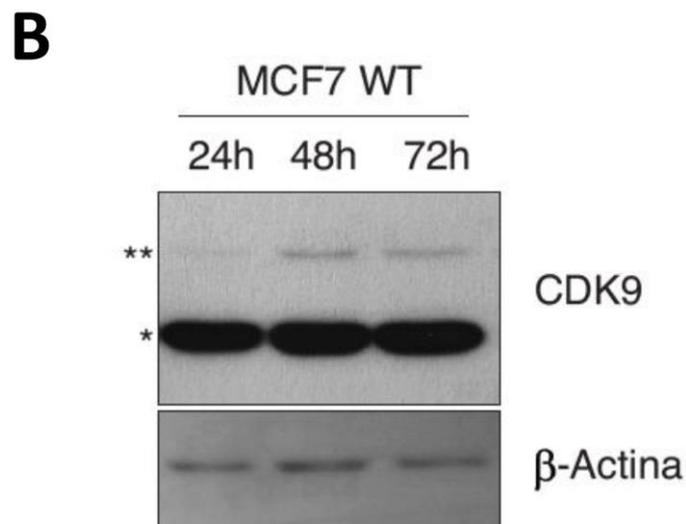
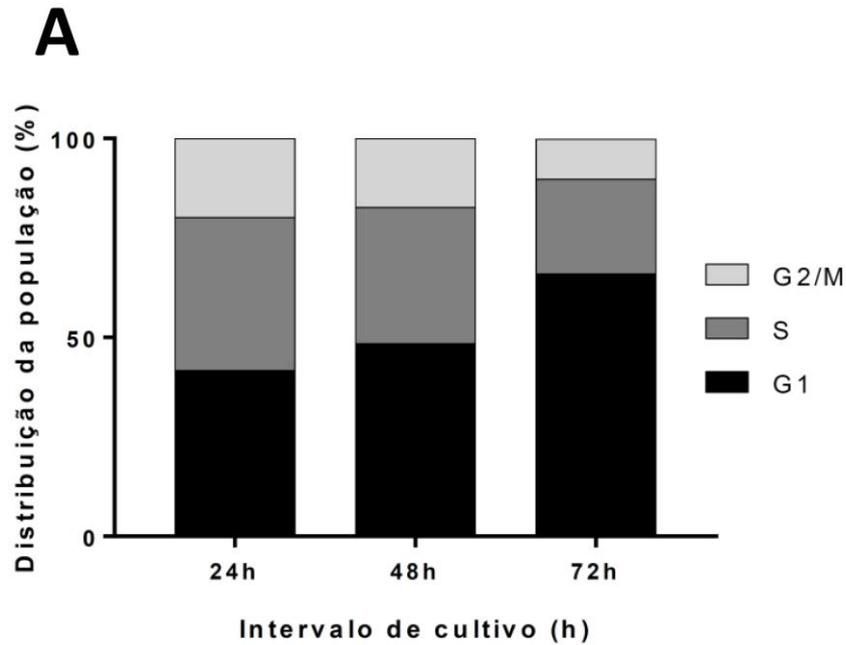


**Figura 5.6 – Perfil de distribuição de células MCF7 nas fases do ciclo celular em função da densidade populacional.** Células MCF7 mantidas em cultura foram avaliadas em um curso temporal até atingir a confluência. Imagens de microscopia de contraste de fase mostram as culturas nos diferentes intervalos a partir do inóculo original. Escala = 100  $\mu\text{m}$  (A e B, 24 horas; D e E, 48 horas; G e H, 72 horas). Avaliação da distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo e análise pelo *software* FlowJo (C, 24 horas; F, 48 horas e I, 72 horas). As cores usadas nos histogramas indicam as populações em G1 (azul), S (mostarda) e G2/M (verde). A figura retrata dados de um ensaio representativo de dois experimentos independentes.

A **Figura 5.7A** resume os resultados da análise de distribuição das populações no ciclo celular derivados da análise do *software* FlowJo, após normalização para 100%. O gráfico destaca o enriquecimento progressivo da população em G1 (e diminuição do número de células em S e G2/M) nos intervalos de 48 e 72 horas após o inóculo quando comparadas com as células coletadas em 24 horas.

A avaliação de extratos proteicos totais, obtidos paralelamente à análise de ciclo celular, demonstraram o aumento dos níveis da isoforma 55k nas amostras obtidas 48 e 72 horas após o inóculo (**Figura 5.7B**). Por outro lado, não foi percebida alteração dos níveis proteicos da isoforma 42k (**Figura 5.7B**).

Esses resultados reforçam a correlação de prevalência de CDK9 55k na fase G1 do ciclo celular, semelhante ao observado nos modelos de sincronização nas linhagens hTERT-BJ e MCF7.



**Figura 5.7 – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 ao longo das fases do ciclo celular como função da densidade populacional.** Células MCF7 mantidas em cultura até atingir a confluência, foram avaliadas em um curso temporal nos intervalos de 24, 48 e 72 horas (após o inóculo). **(A)** Perfil de distribuição populacional ao longo do ciclo celular obtida por meio do *software* FlowJo e normalizada para 100%. **(B)** *Immunoblotting* para identificação dos níveis proteicos das isoformas de CDK9 e de  $\beta$ -Actina; as isoformas 42k e 55k estão indicadas por (\*) e (\*\*). Experimento representativo de dois ensaios independentes.

### 5.3 Influência da superexpressão de *CDK9* na dinâmica do ciclo celular de células MCF7

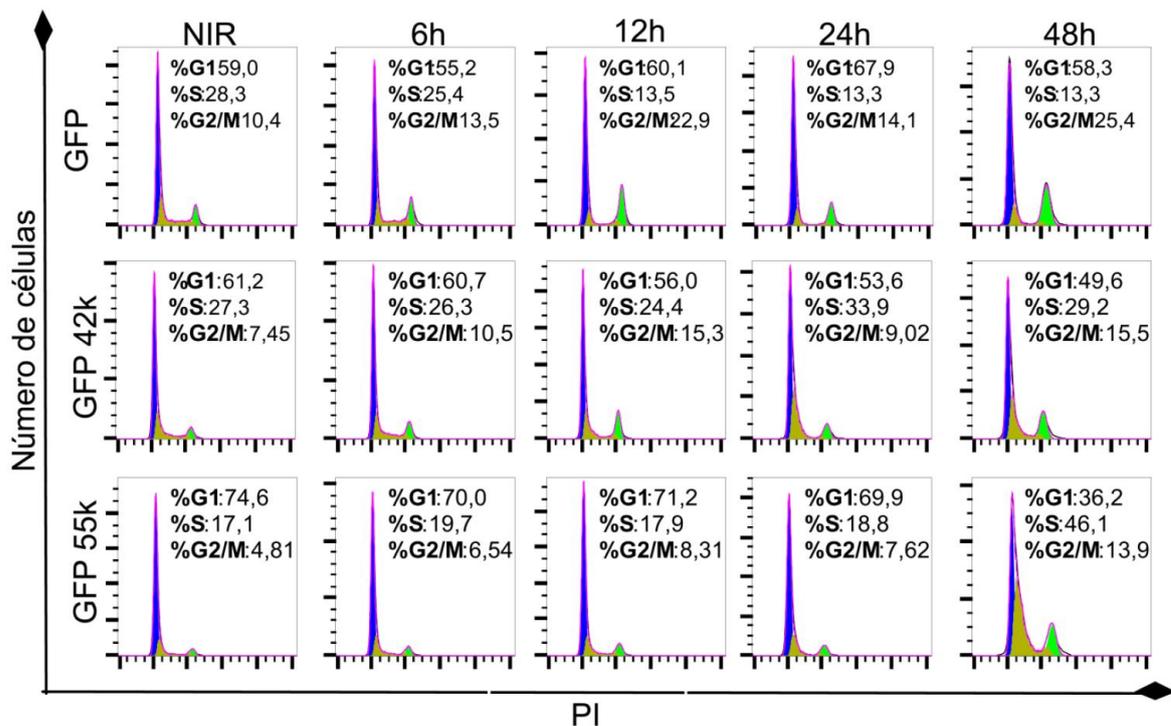
Nosso conjunto de dados, sugere uma correlação entre o ciclo celular e os níveis proteicos de *CDK9*, sobretudo da isoforma 55k. Para avaliar o impacto das isoformas de *CDK9* na dinâmica do ciclo celular, células MCF7 previamente transfectadas com construções codificantes de *GFP* (controle), *GFP-CDK9 42k* ou *GFP-CDK9 55k* foram irradiadas (10Gy), e o ciclo celular foi avaliado em um curso temporal nos intervalos de 6, 12, 24 e 48 horas após o dano, por citometria de fluxo.

A **Figura 5.8** apresenta os perfis de distribuição das populações celulares ao longo do curso temporal nas diferentes fases do ciclo analisados pelo *software* FlowJo.

As células MCF7 superexpressando *GFP* e não irradiadas apresentaram 59,0% da população na fase G1, 28,3% de células em S e 10,4% em G2/M. Após o tratamento com radiação ionizante, o perfil populacional foi alterado e dois eventos se destacam: (1) o aumento da população na fase G1 no intervalo de 24 horas e (2) o aumento da população em G2/M, nos intervalos de 12 e 48 horas.

Na superexpressão de *CDK9 42k* em células MCF7 não irradiadas, foi observado perfil de distribuição populacional semelhante ao controle (*GFP*), composto por 61,2% da população na fase G1, 27,3% em S e 7,45% de células em G2/M. No entanto, após o tratamento com radiação ionizante, a população apresentou uma diminuição progressiva da fração de células em G1, compondo 49,6% da população no intervalo de 48 horas. Vale ressaltar, que o acúmulo de células em G2/M observado nos intervalos de 12 e 48 horas na condição controle, também foi observado nas células com superexpressão da isoforma 42k (**Figura 5.8**).

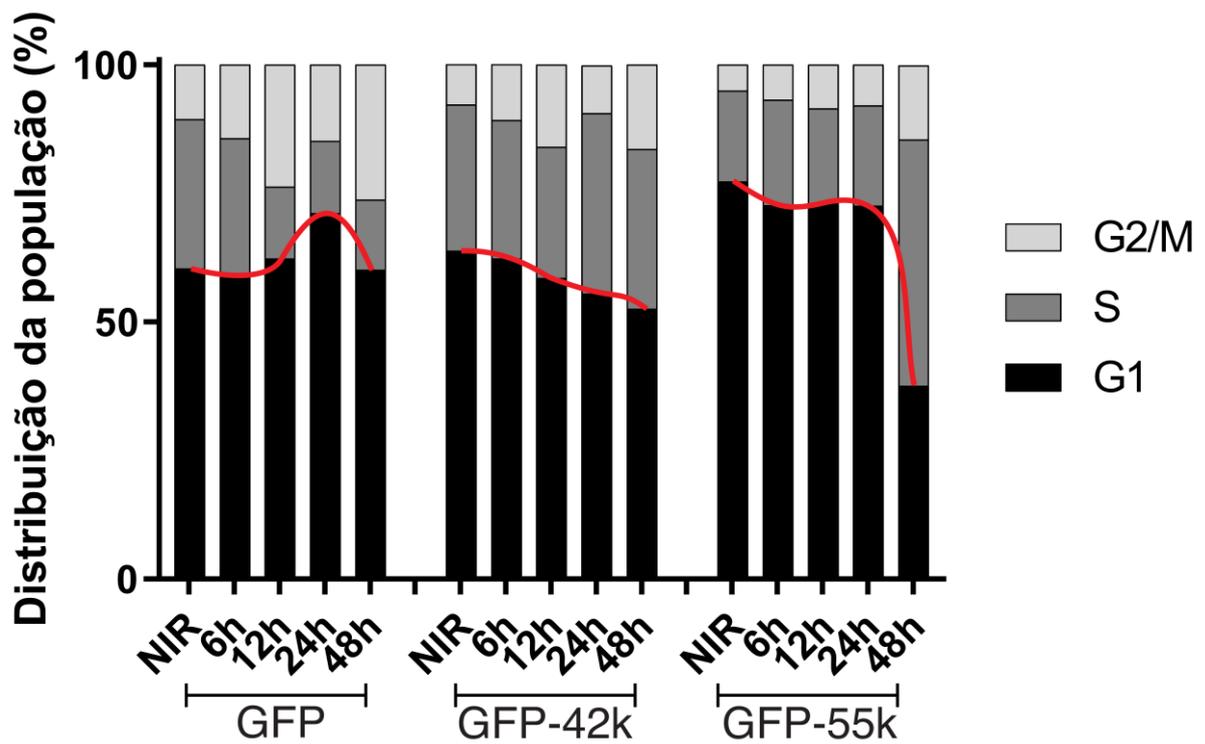
Já as células MCF7 superexpressando *CDK9 55k* não irradiadas apresentaram um aumento na população na fase G1 (74,6%) quando comparadas ao controle não irradiado (59,0%). Esse acúmulo de células em G1 se sustentou por até 24 horas após a exposição à radiação ionizante, – 70% no intervalo de 6 horas, 71,2% e 69,9% em 12 e 24 horas respectivamente. Somente no intervalo de 48 horas observou-se a diminuição da população em G1 (36,2%) e o aumento em S (46,1%) e G2/M (13,9%) (**Figura 5.8**).



**Figura 5.8 – Análise da dinâmica do ciclo celular na superexpressão de *CDK9* em células MCF7.** Células MCF7 superexpressando *GFP*, *GFP-CDK9 42k* ou *GFP-CDK9 55k* foram irradiadas (ou não) 72 horas após a transfecção e avaliadas em um curso temporal nos intervalos de 6, 12, 24 e 48 horas (pós-irradiação). A avaliação da distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular foi conduzida por citometria de fluxo e analisada pelo *software* FlowJo. As cores usadas nos histogramas indicam as populações em G1 (azul), S (mostarda) e G2/M (verde). A figura retrata o resultado de um ensaio representativo de dois experimentos independentes.

A **Figura 5.9** resume os resultados derivados da análise do *software* FlowJo, após normalização para 100%. A dinâmica do ciclo celular observada nas células controle sugere que, quando da superexpressão de *CDK9* (tanto da isoforma 42k quanto 55k), há alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular pós dano ao DNA.

Enquanto células superexpressando *CDK9 42k* apresentaram sucessivas diminuições na população em fase G1, a superexpressão de *CDK9 55k* levou ao acúmulo de células em G1. Os resultados observados pela superexpressão de *CDK9* sustentam os dados observados em modelos de sincronização, e sugerem um papel para *CDK9* no controle do ciclo celular, destacando-se a correlação entre a isoforma 55k e a fase G1 do ciclo.



**Figura 5.9 – Impacto da superexpressão de *CDK9* na dinâmica do ciclo celular em células MCF7.** Células MCF7 superexpressando *GFP*, *GFP-CDK9 42k* ou *GFP-CDK9 55k* foram irradiadas (ou não) 72 horas após a transfecção e avaliadas em um curso temporal nos intervalos de 6, 12, 24 e 48 horas (pós-irradiação). A avaliação da distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular foi conduzida por citometria de fluxo e analisada pelo *software* FlowJo. As barras indicam a distribuição das populações nas fases G1, S e G2/M. A curva destacada em vermelho ressalta a dinâmica da fase G1 para cada condição. Dados representativos de dois experimentos independentes.

#### 5.4 Influência da reconstituição das isoformas de CDK9 na dinâmica do ciclo celular em células MCF7

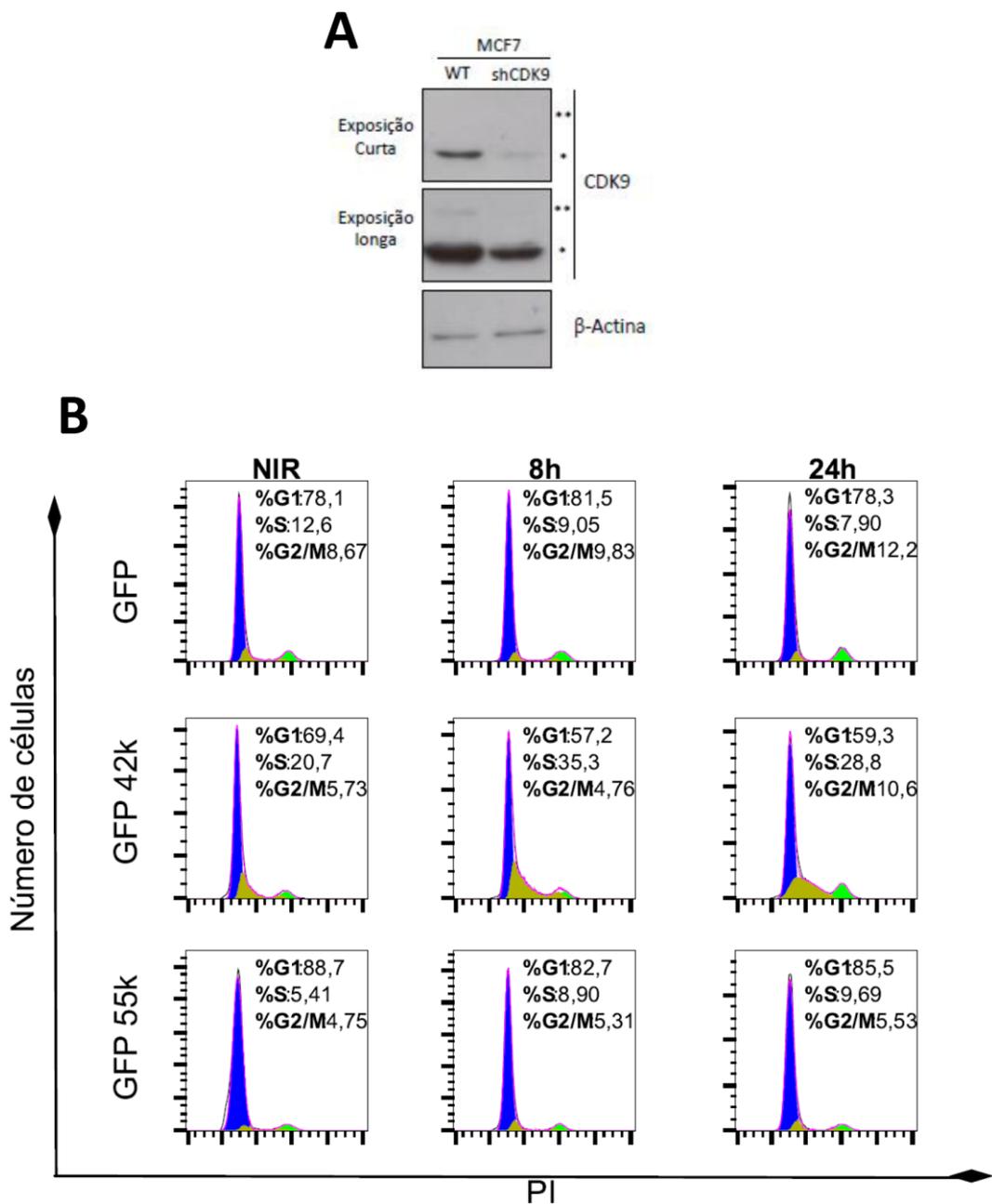
A linhagem MCF7 é proficiente na expressão das isoformas de *CDK9*, assim células MCF7 foram manipuladas para indução de deficiência e utilizadas para avaliar o impacto da reconstituição individual das isoformas 42k e 55k no ciclo celular.

Para isso, células MCF7 foram previamente transduzidas com partículas virais, com sequências codificantes para o shRNA de interferência para expressão gênica de *CDK9* (MCF7 sh*CDK9*, **Figura 5.10A**) (NEPOMUCENO et al., 2017a).

As células MCF7 sh*CDK9* foram transfectadas com construções codificantes de *GFP* (controle), *GFP-CDK9 42k* ou *GFP-CDK9 55k* e irradiadas (10Gy). A distribuição das populações ao longo do ciclo celular foi avaliada nos intervalos de 8 e 24 horas após o dano, por citometria de fluxo. A condição controle (*GFP*) apresentou 78,1% da população na fase G1, 12,6% em S e 8,67% em G2/M. Após a exposição à radiação ionizante, a distribuição da população sofreu pequenas alterações, como observado na fase G1 tanto em 8 horas como em 24 horas (81,5% e 78,3%, respectivamente) (**Figura 5.10B**).

A reconstituição das células MCF7 sh*CDK9* com *CDK9 42k* na condição não irradiadas apresentou uma distribuição de populações ao longo do ciclo da seguinte forma: 69,4% de células na fase G1, 20,7% em S e 5,73% em G2/M. Após o dano, houve uma diminuição na população de células em G1 em 8 (57,2%) e 24 horas (59,3%), acompanhada do aumento da população em fase S (**Figura 5.10B**). Já as células MCF7 sh*CDK9* reconstituídas com a isoforma *CDK9 55k* apresentaram um aumento de células em G1 (88,7%), que se manteve em 8 e 24 horas após o dano (82,7% e 85,5%, respectivamente) (**Figura 5.10B**).

A **Figura 5.11A** retrata a o perfil de ciclo celular analisado pelo *software* FlowJo e normalizado para 100%. No gráfico, é possível observar que células MCF7 sh*CDK9* reconstituídas com *CDK9 42k* apresentam diminuição da população na fase G1, enquanto células MCF7 sh*CDK9* reconstituídas com a isoforma *CDK9 55k* exibem aumento da população de células em G1. Esses resultados estão em sintonia com o fenótipo observado nas células MCF7 com superexpressão de *CDK9* e sustentam a hipótese de que *CDK9 55k* atua nos mecanismos de controle do ciclo celular, mais precisamente nos mecanismos de monitoramento da fase G1.



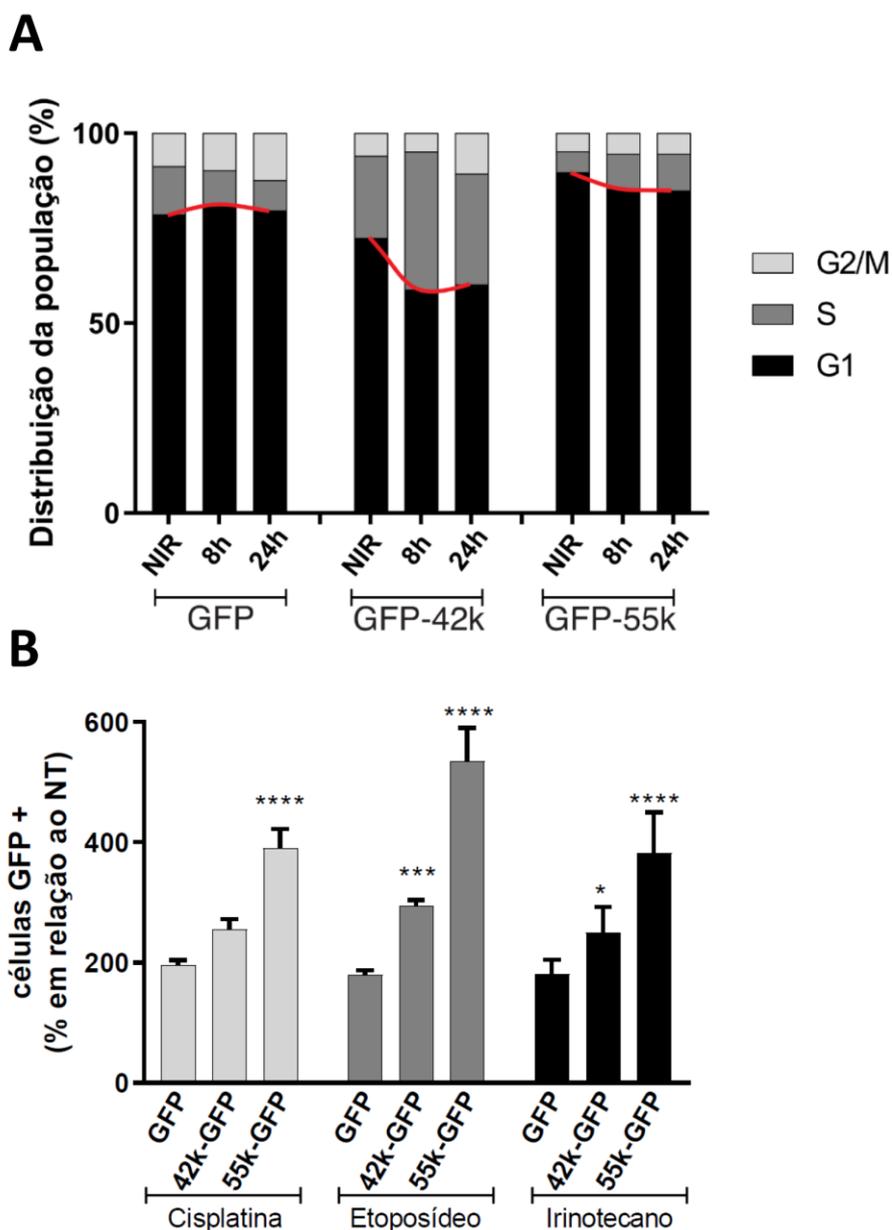
**Figura 5.10 – Análise da dinâmica do ciclo celular na reconstituição de CDK9 em células MCF7 deficientes.** (A) Extratos proteicos totais de células MCF7 selvagens e células MCF7 transduzidas com a construção codificante do shCDK9 avaliadas por *immunoblotting*, utilizando os anticorpos anti-CDK9 e anti-β-Actina. (B) Células MCF7 shCDK9 transfectadas com construções codificantes para as proteínas GFP, GFP 42k ou GFP 55k irradiadas (ou não) e avaliadas após 8 e 24 horas. A avaliação da distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular foi conduzida por citometria de fluxo e analisada pelo software FlowJo. As cores usadas nos histogramas indicam as populações em G1 (azul), S (mostarda) e G2/M (verde). Dados de um único experimento.

A fim de investigar o impacto das isoformas de CDK9 frente a insultos ao DNA diferentes da radiação ionizante, as células MCF7 shCDK9 reconstituídas com GFP, GFP 42k ou GFP 55k foram tratadas ou não com os quimioterápicos Cisplatina, Etoposídeo e Irinotecano por 72 horas. A população de células GFP positivas (e não marcadas com iodeto de propídeo) foi determinada por citometria de fluxo, e a relação entre a condição tratada e não tratada foi usada como referência para determinação de viabilidade celular.

De maneira geral, os quimioterápicos clássicos afetam diretamente o DNA, impedindo a transcrição e/ou replicação, o que pode levar à morte celular. A Cisplatina interage com as bases nitrogenadas do DNA, criando adutos, que podem ocorrer interfitas ou intrafitas, e que bloqueiam tanto a replicação quanto a transcrição (GHOSH, 2019). O Irinotecano e o Etoposídeo são inibidores das Topoisomerasas I e II, respectivamente. Essa classe de enzimas modula a topologia do DNA, garantindo a integridade genômica, sendo fundamentais na diminuição da tensão criada pela torção da dupla hélice na replicação (Topoisomerase I) e a correta segregação dos cromossomos (Topoisomerase II), por exemplo (BJORNSTI & KAUFMANN, 2019). Logo, tanto a Cisplatina, quanto o Irinotecano e o Etoposídeo atuam essencialmente em células proliferativas.

A **Figura 5.11B** representa o comportamento de células MCF7 shCDK9, reconstituídas com as diferentes construções codificantes das proteínas quiméricas (GFP) frente ao tratamento com os três quimioterápicos. Os resultados mostram que as células reconstituídas com CDK9 55k apresentaram cerca de duas vezes mais células GFP positivas (frente os 3 quimioterápicos) quando comparadas com a população controle submetida ao mesmo tratamento. As células MCF7 shCDK9 reconstituídas com a isoforma CDK9 42k apresentaram um aumento menos expressivo, porém significativo, de células GFP positivas frente aos quimioterápicos Etoposídeo e Irinotecano quando comparadas com o controle submetido ao mesmo tratamento.

Esse conjunto de dados sugere que CDK9 induz um aumento na resistência aos quimioterápicos. Essa resistência pode ser observada nas células reconstituídas com ambas isoformas de CDK9, no entanto, em células reconstituídas com a isoforma 55k ela é mais eficiente.



**Figura 5.11 – Impacto da reconstituição de CDK9 no ciclo celular e na resistência a quimioterápicos em células MCF7 deficientes.** (A) Células MCF7 shCDK9 transfectadas com construções codificantes para as proteínas GFP, GFP 42k ou GFP 55k irradiadas (ou não) e avaliadas após 8 e 24 horas. A avaliação da distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular foi conduzida por citometria de fluxo e analisada pelo *software* FlowJo. As barras indicam a distribuição das populações nas fases G1, S e G2/M. A curva destacada em vermelho ressalta a dinâmica da fase G1 para cada condição. Dados de um único experimento. (B) As células MCF7 shCDK9 reconstituídas e tratadas (72h) com Cisplatina, Etoposídeo ou Irinotecano foram coletadas, marcadas com iodeto de propídeo (sem permeabilização). A população de células viáveis e GFP positivas foi determinada por citometria de fluxo e normalizada pela frequência observada na população não tratada (100%). As barras representam a média das triplicatas de cada condição e análise estatística (Two-way ANOVA) foi realizada comparando células reconstituídas com CDK9 42k ou 55k com a condição controle (GFP). Pós-teste de Turkey. (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; (\*\*\*)  $p = 0.0005$ ; (\*)  $p < 0.05$ . Dados representativos de dois experimentos independentes.

## 5.5 Avaliação da interação entre CDK9 e PTIP

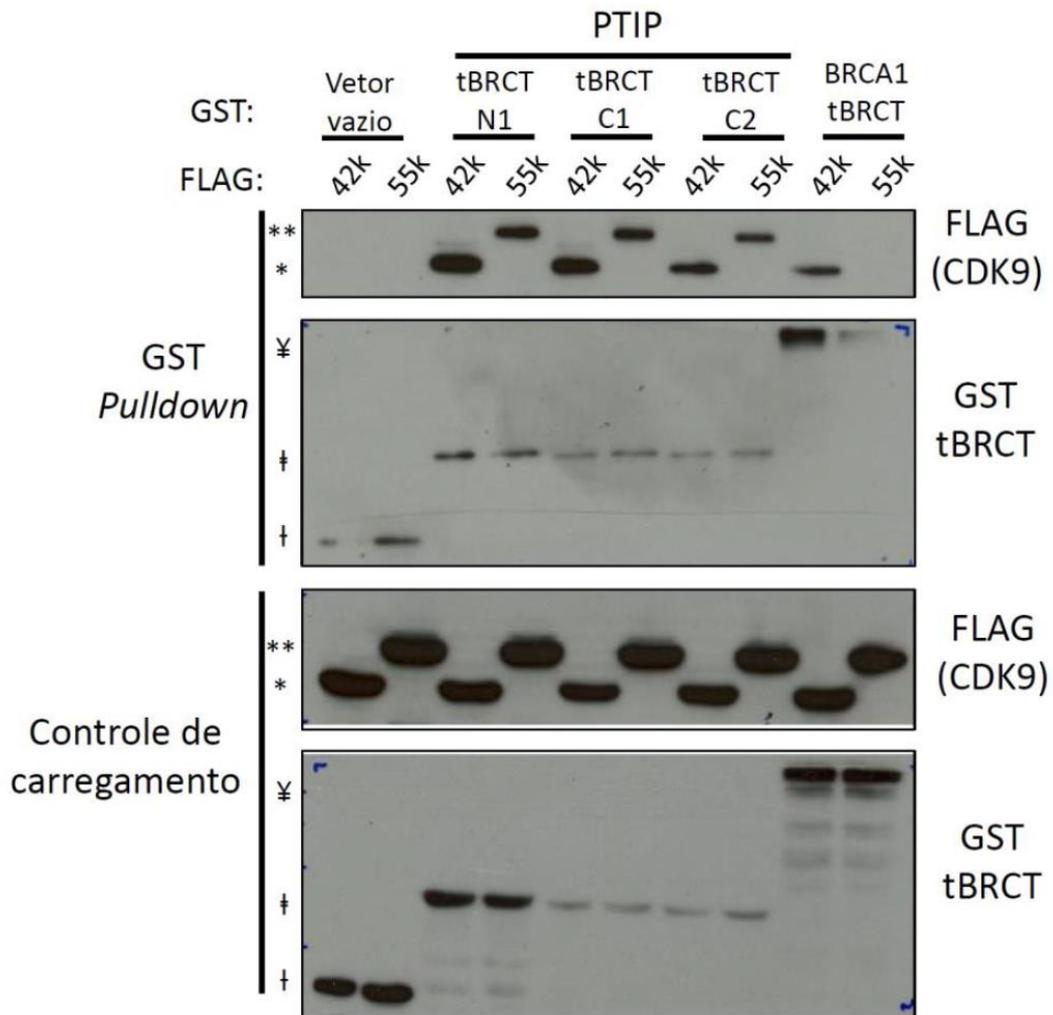
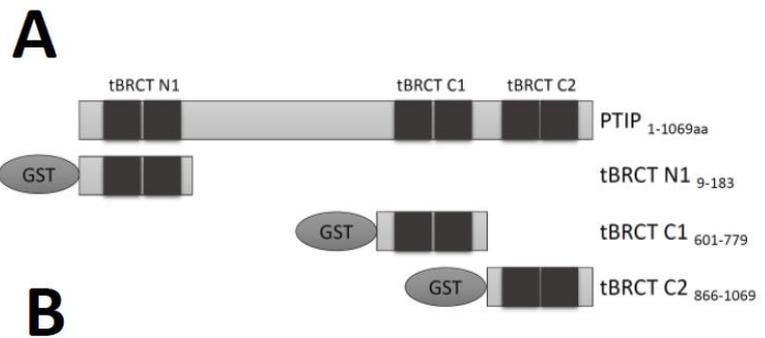
Os mecanismos de controle da estabilidade genômica abrangem vias de RDD que são reguladas ao longo do ciclo celular. As DSBs que ocorrem na fase G1 do ciclo são majoritariamente reparadas pela via de NHEJ. Em 2010, Liu e colaboradores demonstraram a interação entre a isoforma 55k de CDK9 e o dímero Ku70/80, envolvido na via de NHEJ. Em 2012, nosso grupo descreveu a putativa interação de CDK9 com o domínio tBRCT C2 da proteína PTIP (**Figura 5.12A**), também envolvida na via de NHEJ (WOODS et al., 2012).

Como abordagem para interrogar o papel de CDK9 nas vias de RDD, avaliamos a interação entre as diferentes isoformas de CDK9 e PTIP. Para isso, células HEK293FT foram cotransfectadas com as construções codificantes para as proteínas FLAG-CDK9 42k ou FLAG-CDK9 55k e as construções codificantes para os tBRCTs de PTIP (N1, C1, C2; **Figura 5.12A**) ou tBRCT de BRCA1 (controle positivo). Os extratos totais obtidos das células transfectadas foram empregados em rotinas de GST-*pull-down* e, ao final avaliados por *immunoblotting*.

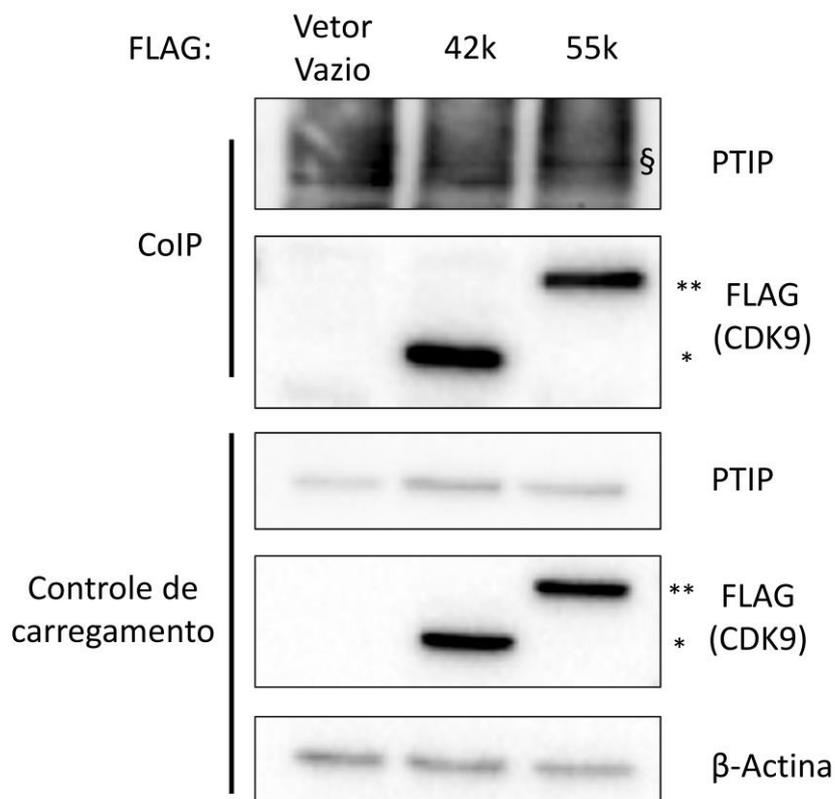
No ensaio de interação (**Figura 5.12B**, painel superior), ambas isoformas de CDK9 interagiram com os três tBRCTs de PTIP quando testados individualmente. Além disso, como esperado, o tBRCT de BRCA1 (controle) interagiu somente com a isoforma 42k e não interagiu com a isoforma 55k (NEPOMUCENO, 2016; NEPOMUCENO et al., 2017a). Vale ressaltar que todas as proteínas produzidas apresentaram níveis detectáveis e que, apesar dos menores níveis observados para os tBRCTs C1 e C2 de PTIP, a interação com as isoformas de CDK9, no ensaio de GST-*pull-down*, ocorreu de forma semelhante ao tBRCT N1 (**Figura 5.12B**, painel inferior).

Tendo em vista que o ensaio de GST-*pull-down* foi realizado mediante superexpressão dos tBRCTs de PTIP, para melhor compreender a interação entre CDK9 e PTIP, rotinas de coimunoprecipitação foram conduzidas utilizando extratos nucleares de células HEK293FT transfectadas com construções pCMV-FLAG (vetor vazio), pCMV FLAG CDK9 42k ou pCMV FLAG CDK9 55k.

Os resultados da coimunoprecipitação, em um ensaio inicial, sugerem que a proteína PTIP constitutiva interage somente com a isoforma 55k de CDK9 (**Figura 5.13**, painel superior), diferente do observado nos ensaios de GST-*pull-down* utilizando os tBRCTs de PTIP.



**Figura 5.12 – Avaliação da interação entre CDK9 e os tBRCTs de PTIP (pull-down).** (A) Representação esquemática da proteína PTIP, em destaque os três tBRCT presentes ao longo da proteína (denominados N1, C1 e C2), a localização (em aminoácidos) de cada um e a representação esquemática das proteínas quiméricas GST-tBRCT. (B) Células HEK293FT foram cotransfectadas com construções codificantes de CDK9 (55k ou 42k) e GST (vetor vazio ou codificante dos tBRCT de PTIP ou do tBRCT de BRCA1). Todas proteínas apresentaram níveis detectáveis (painel inferior). CDK9 42k e CDK9 55k estão indicados por (\*) e (\*\*). A proteína GST, os tBRCTs de PTIP e o tBRCT de BRCA1 estão indicados por “†”, “‡” e “¥” respectivamente. Imagem representativa de dois ensaios independentes. Dados de um único experimento.



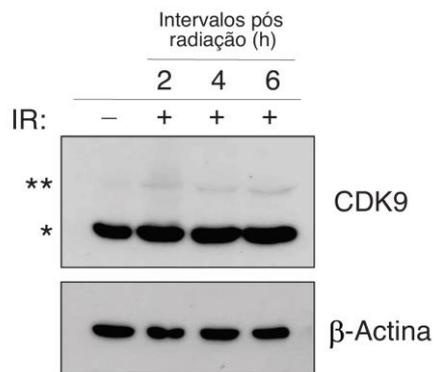
**Figura 5.13 – Avaliação da interação entre as isoformas de CDK9 e PTIP (coimunoprecipitação).** (A) Extratos nucleares de células HEK293FT transfectadas com pCMV FLAG (vetor vazio), pCMV FLAG CDK9 42k ou pCMV FLAG CDK9 55k foram utilizados em rotinas de coimunoprecipitação (CoIP) utilizando anticorpos anti-FLAG e, posteriormente, analisados em rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-PTIP e anti-FLAG. (painel superior). O painel inferior indica os níveis proteicos de PTIP e das proteínas ectópicas, bem como do controle de carregamento.

## 5.6 Perfil proteico de CDK9 mediante dano

Nosso conjunto de resultados sugerem que os níveis proteicos de CDK9 são responsivos ao ciclo celular e que a proteína CDK9 55k participa dos mecanismos de controle da fase G1, interagindo com proteínas envolvidas na RDD. Assim, avaliamos os níveis proteicos de CDK9 em resposta à radiação ionizante, a fim de investigar eventuais alterações mediante danos ao DNA.

Extratos proteicos totais de células MCF7 irradiadas (10Gy), ou não, foram coletados em diferentes intervalos de tempo pós-irradiação (2, 4 e 6 horas) e avaliados em rotinas de *immunoblotting*. Como esperado, as células MCF7 não irradiadas apresentaram níveis detectáveis apenas da isoforma 42k de CDK9. Porém, após a exposição à radiação ionizante, houve um aumento dos níveis de CDK9, tanto da isoforma 42k quanto da 55k, observados até 6 horas após a exposição à radiação ionizante (**Figura 5.14**).

Esses resultados sugerem que, os níveis proteicos de CDK9 também são regulados mediante danos ao DNA. E, em conjunto com os dados de interação proteica, reforçam um putativo papel para a isoforma 55k em mecanismos de RDD.



**Figura 5.14 – Perfil proteico de CDK9 em células MCF7 expostas à radiação ionizante.** Extratos proteicos totais de células MCF7 e irradiadas (10Gy) e não irradiadas, coletados 2, 4 e 6 horas após o tratamento, foram analisados por rotinas de *immunoblotting* para caracterização dos níveis de CDK9 pós-dano ao DNA. As isoformas 42k e 55k estão indicadas por (\*) e (\*\*) respectivamente. Os níveis proteicos de CDK9 estão apresentados no painel superior e os níveis de  $\beta$ -Actina no painel inferior. Imagem representativa de dois experimentos independentes.

## 5.7 Impacto de CDK9 42k e CDK9 55k na formação de focos de 53BP1

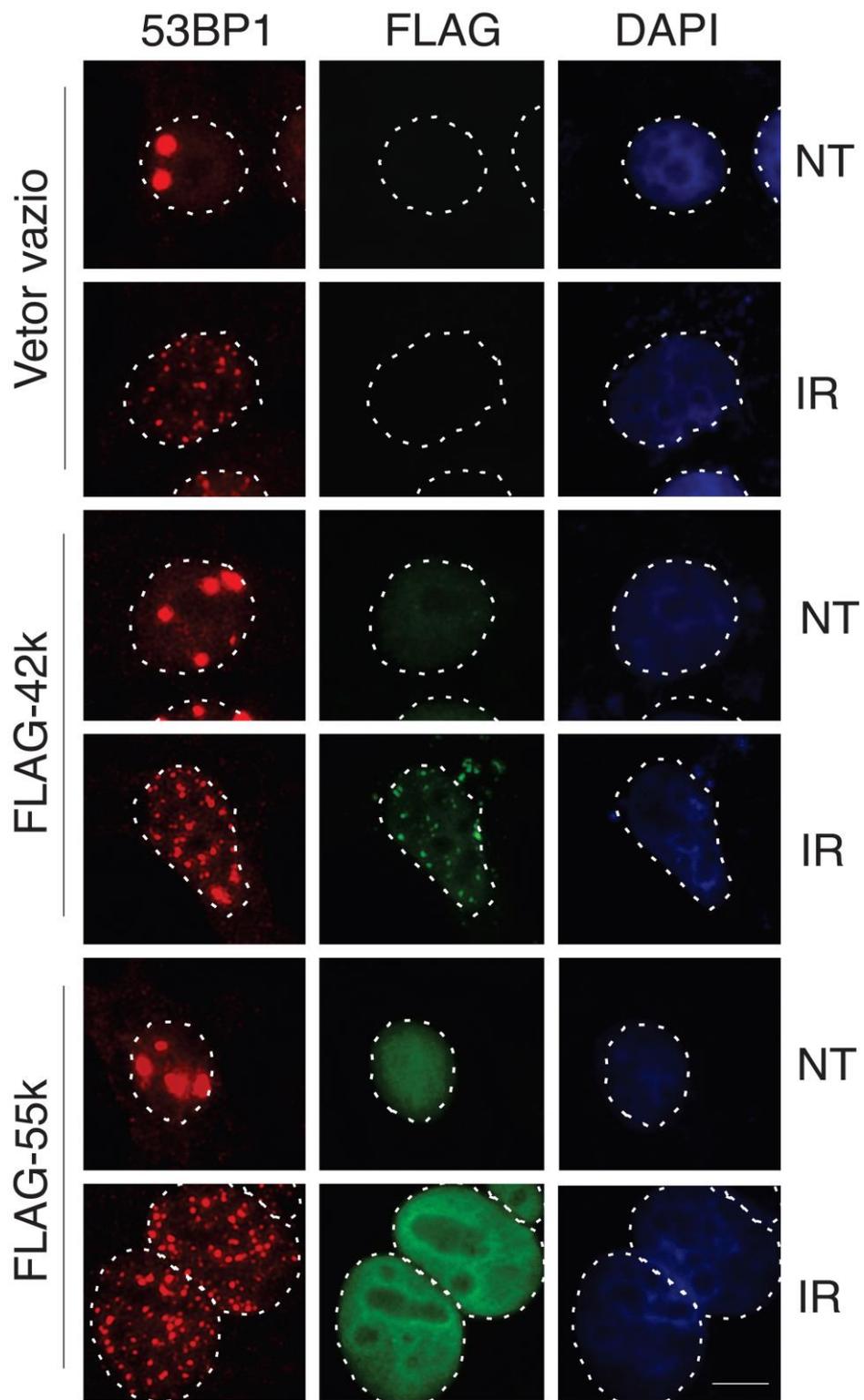
Em geral, proteínas envolvidas no reparo do dano ao DNA formam estruturas denominadas focos, que são uma consequência de seu recrutamento e acúmulo nas regiões de dano. Nosso grupo demonstrou que, em resposta ao dano de DNA, CDK9 forma focos e estes colocalizam com proteínas envolvidas no reparo do DNA, como BRCA1 e  $\gamma$ H2AX (NEPOMUCENO et al., 2017a).

A fim de determinar qual das isoformas (ou se ambas) apresenta o fenótipo de formação de focos mediante dano ao DNA, células MCF7 foram transfectadas com construções pCMV FLAG, pCMV FLAG CDK9 42k ou pCMV FLAG CDK9 55k, expostas à radiação ionizante (10Gy) e avaliadas após 3 horas.

Corroborando dados da literatura, tanto a proteína FLAG CDK9 42k, quanto a proteína FLAG CDK9 55k apresentaram marcação nuclear difusa em células não irradiadas (LIU & HERRMANN, 2005; NEPOMUCENO et al., 2017a; SHORE et al., 2005). No entanto, após a exposição à radiação ionizante, apenas a proteína FLAG CDK9 42k apresentou o fenótipo de formação de focos, diferente de FLAG CDK9 55k, que manteve sua localização nuclear difusa (**Figura 5.15**).

As DSBs são majoritariamente reparadas por duas vias distintas, a via de HR e NHEJ. A seleção da via de reparo depende do recrutamento de proteínas associadas a cada mecanismo e, inicialmente, é regulada pelo recrutamento de BRCA1 e 53BP1, que favorecem a via de HR e NHEJ, respectivamente.

Para avaliar o impacto de CDK9 na via de NHEJ, investigamos a formação de focos de 53BP1. Células MCF7 superexpressando as isoformas de CDK9, individualmente, foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e a formação de focos de 53BP1 foi avaliada após 3 horas (**Figura 5.15**). Quando comparadas à condição controle (vetor vazio), a superexpressão da isoforma 42k de CDK9 não impactou quantitativamente nos focos de 53BP1. Por outro lado, a superexpressão da isoforma 55k apresentou um aumento relevante no número de focos de 53BP1 quando comparada à condição controle (**Figuras 5.15 e 5.16A**).

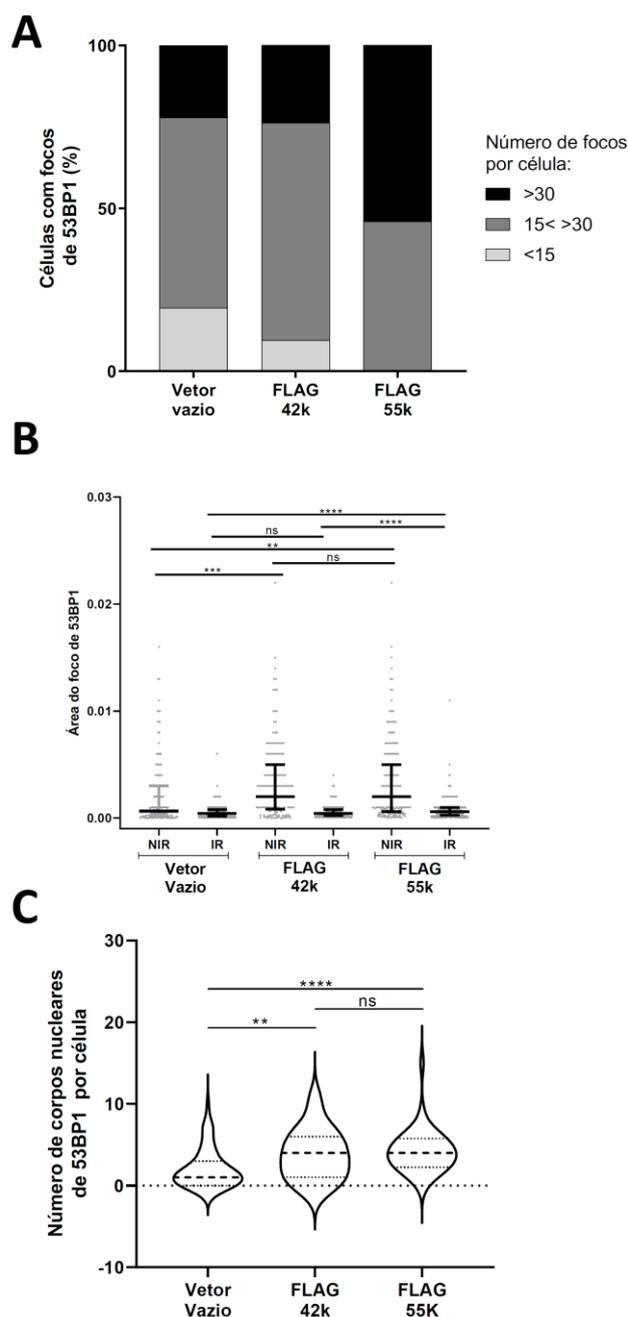


**Figura 5.15 – Localização das isoformas de CDK9 mediante dano e impacto da expressão ectópica de *CDK9* na formação de focos de 53BP1.** Células MCF7 transfectadas com as construções pCMV FLAG (vetor vazio), pCMV FLAG 42k ou pCMV FLAG 55k e expostas a radiação ionizante (10Gy) foram avaliadas quanto a localização de CDK9 (verde) e formação de focos de 53BP1 (vermelho), três horas após o dano. As marcações foram realizadas usando anticorpos anti 53BP1, anti-FLAG e DAPI (azul). NT, células não tratadas; IR, células expostas à radiação ionizante. Imagem representativa de dois experimentos independentes

Além do quantitativo de focos, o tamanho dos focos de 53BP1 também foi analisado. As células superexpressando *CDK9 55k*, quando irradiadas, apresentaram um discreto aumento do tamanho dos focos quando comparadas com a condição controle ou com as células que superexpressam *CDK9 42k*, também irradiadas (**Figura 5.16B**).

Os dados dos ensaios de microscopia mostraram focos maiores de 53BP1 em células não irradiadas (em todas as condições). Esses focos são denominados corpos nucleares e indicam regiões de DSBs, que ocorreram durante a mitose e não foram reparados. Nesses casos, as quebras são sinalizadas pela proteína TopBp1 durante a mitose, que é substituído por 53BP1, e promove o reparo na fase G1 do ciclo celular (PEDERSEN et al., 2015). Curiosamente, células superexpressando *CDK9* (ambas isoformas) não irradiadas apresentaram aumento, tanto do número quanto no tamanho dos corpos nucleares de 53BP1 (**Figuras 5.16B e C**)

Esses resultados sugerem que *CDK9 55k* atua no controle da formação de focos de 53BP1 nos sítios de DSBs, enquanto a isoforma 42k parece não influenciar.



**Figura 5.16 – Impacto das isoformas de CDK9 na formação de focos de 53BP1.** Células MCF7 transfectadas com pCMV FLAG (controle, vetor vazio), pCMV FLAG 42k ou pCMV FLAG 55k e expostas a radiação ionizante (10Gy) foram avaliadas quanto a formação de focos de 53BP1 3 horas após o dano. As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ. **(A)** Quantificação dos focos de 53BP1 em células irradiadas. As populações foram categorizadas em: células com menos de 15 focos, células com 15 a 30 focos e células com mais de 30 focos de 53BP1. **(B)** Mediana do tamanho dos focos de 53BP1 em células não irradiadas (NIR) e irradiadas (IR). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; (\*\*\*)  $p < 0.0005$ ; (\*\*)  $p = 0.05$ ; (ns) não significativo. **(C)** Quantificação do número de corpos nucleares de 53BP1 em células não irradiadas. A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; (\*\*)  $p = 0.05$ ; (ns) não significativo. Dados representativos de dois experimentos independentes.

## 6 Discussão

A estabilidade genômica é fundamental para a homeostase celular, assim as vias de RDD constituem uma barreira que impede a progressão de disfunções celulares, como a tumorigênese. Apesar do amplo conhecimento sobre os mecanismos de RDD, a regulação das vias de reparo e sua correlação com outras vias celulares ainda é limitada (LORD & ASHWORTH, 2012; JEGGO *et al.*, 2016; BASU, 2018).

A rede de interação dos tBRCTs de 7 proteínas envolvidas nas vias de RDD, descrita pelo nosso grupo em 2012, sugere a participação de proteínas ainda não diretamente correlacionadas com a manutenção da estabilidade genômica e que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de RDD (WOODS *et al.*, 2012).

Nesse cenário, a proteína CDK9 foi identificada interagindo com os tBRCTs de BRCA1, BARD1 e PTIP. A função mais bem descrita de CDK9 é a fosforilação da cauda CTD da holoenzima RNA polimerase II, que ocorre mediante sua interação com suas subunidades regulatórias e permite o alongamento da transcrição (BACON & D'ORSO, 2018). Porém, estudos mais recentes expõe sua importância em mecanismos de manutenção da integridade genômica (ZHANG *et al.*, 2013; CAIRNS *et al.*, 2015; STORCH & CORDES, 2016; NEPOMUCENO *et al.*, 2017a).

De acordo com Garriga e colaboradores (2003), *CDK9* apresenta perfil de expressão semelhante a outras *CDKs*, sendo continuamente expressa ao longo do ciclo celular (GARRIGA *et al.*, 2003). No entanto, como a maioria dos estudos, a avaliação do perfil de expressão de *CDK9* considerou somente a isoforma 42k (a mais abundante). Assim, o perfil da isoforma 55k ao longo do ciclo celular, bem como seu comportamento mediante dano ao DNA e seu papel no contexto celular permanecem pouco estudados. Por isso, inicialmente, investigamos a correlação entre as isoformas de *CDK9* (42k e 55k) e o ciclo celular.

Células das linhagens hTERT-BJ e MCF7 foram empregadas em dois modelos distintos de sincronização para avaliação dos níveis proteicos e de mRNA codificante de *CDK9*. A linhagem hTERT-BJ é composta por fibroblastos normais, imortalizados pela superexpressão da sequência codificante para a unidade catalítica da telomerase humana, hTERT. Enquanto, a linhagem MCF7 é composta por células transformadas, derivadas de um tumor de mama metastático.

A comparação entre o perfil assíncrono das duas linhagens mostra que células hTERT-BJ assíncronas apresentaram uma maior população em G1 (53,3%) e menor em S, quando comparadas com as células MCF7 assíncronas (31,5% em G1 e 47,4%

em S) (**Figura 5.1**, ASC e **5.4**, ASC). Essa diferença pode ser explicada pela duração da fase G1 do ciclo, passível de variação entre tipos celulares diferentes, e sendo determinante para o tempo total de duplicação das células. Linhagens imortalizadas não neoplásicas (como a hTERT-BJ) apresentam maior duração de G1 do que linhagens tumorais (como a MCF7), que apresentam ativação contínua das vias de controle da proliferação (OLASHAW & PLEDGER, 2002).

Tendo em vista as características de cada linhagem, foram utilizadas abordagens distintas para suas sincronizações. As células hTERT-BJ foram sincronizadas por privação de SFB e confluência, o que preconiza o acúmulo de células em G0, e a liberação das células para progressão no ciclo celular ocorre mediante expansão da cultura e suplementação com SFB (CHUANG et al., 2009). Já as células MCF7 foram sincronizadas por pulso de timidina, que altera o balanço de nucleotídeos e ocasiona o arresto das células no limite entre G1 e S, e a liberação ocorre mediante a retirada da timidina do sistema (WHITFIELD et al., 2002).

Nas células hTERT-BJ, imediatamente após a sincronização, a população predominante foi discriminada como em G0/G1. Segundo a literatura, o protocolo de sincronização promove o acúmulo de células em G0, porém a marcação exclusiva com iodeto de propídeo não permite a diferenciação de células em G0 ou em G1. Apesar da utilização do mesmo protocolo de marcação para as células MCF7, somente a fase G1 do ciclo é indicada, isso porque são esperadas poucas células em G0 em razão da manutenção da cultura com constantes subcultivos (DOLATABADI et al., 2017).

A avaliação dos níveis proteicos da isoforma 42k apresentou discretas variações a depender do modelo de sincronização. Enquanto foi observado um aumento dos níveis na população em G2/M nas células hTERT-BJ (**Figuras 5.2B e 5.3A**), foi constatada uma diminuição nas células MCF7 (**Figuras 5.5B e C**). Já a avaliação de células MCF7 que não foram submetidas a um protocolo canônico de sincronização, mas apenas ao enriquecimento da população na fase G1 por confluência e esgotamento do meio, não foi percebida alteração nos níveis proteicos da isoforma 42k (**Figura 5.7B**). A divergência observada nos modelos avaliados, considerando, ainda, os resultados de Garriga e colaboradores (2003), sugere que as variações dos níveis proteicos da isoforma 42k decorrem de questões intrínsecas aos modelos (tipo celular e abordagem experimental).

Uma das questões é que a sincronização por pulso de timidina promove o arresto do ciclo celular por estresse replicativo, resultado do desequilíbrio do *pool* de

nucleotídeos. A isoforma 42k, dimerizada com a ciclina K, desempenha um papel na resposta ao estresse replicativo, interagindo com ATR e ATRIP (YU et al., 2010). Assim, é possível que o aumento dos níveis proteicos da isoforma 42k, imediatamente após a sincronização, ocorra em resposta ao quadro de estresse replicativo, e não por um comportamento ciclo dependente *per se*.

Para a isoforma 55k, em ambos modelos de sincronização, foi observado um aumento dos níveis proteicos mediante o enriquecimento de células na fase G1 e uma diminuição com a progressão do ciclo celular (**Figura 5.3A e 5.5C**). Nas células hTERT-BJ, o perfil de expressão da isoforma 55k (mRNA) acompanhou os níveis proteicos, apresentando um aumento em G1 e diminuição com a progressão para S (**Figura 5.3B**). A correlação entre os níveis proteicos da isoforma 55k e o acúmulo de células na fase G1, também foi observado no modelo de células MCF7 confluentes (**Figura 5.7B**).

Esse conjunto de dados sugere que os níveis proteicos da isoforma 55k são regulados ao longo do ciclo celular, independentemente da abordagem e do tipo celular. A regulação da expressão, tanto da isoforma 55k quanto de *CDK9* total, observada em células hTERT-BJ também sugere uma regulação ciclo dependente. Até por isso, a análise do perfil de expressão da isoforma 55k e de *CDK9* total em células MCF7 sincronizadas por pulso de timidina e também de células MCF7 confluentes (enriquecidas na população em fase G1) seria importante para consolidar a ideia de um perfil de expressão gênica de *CDK9*, mais especificamente da isoforma 55k, ciclo dependente.

Através da análise do ciclo celular também identificamos putativas modificações pós-traducionais, presentes nos dois modelos (**Figura 5.2B e 5.5B**), que não demonstraram um padrão ciclo dependente. No entanto, a avaliação dessas bandas através de espectrometria de massas seria importante para identificar a putativa isoforma modificada e a modificação pós-traducional, auxiliando na compreensão dos mecanismos regulatórios de *CDK9*.

A variação dos níveis proteicos, ao longo do ciclo celular, da isoforma 55k sugere duas hipóteses: (i) sua atuação em mecanismos de controle do ciclo celular, onde a alteração de seus níveis proteicos funciona como mecanismo regulatório, semelhante a regulação do ciclo celular segundo a expressão de ciclinas (MALUMBRES, 2014); (ii) a isoforma 55k atua em vias reguladas pelo ciclo celular, como as vias de RDD.

Nesse cenário, investigamos o impacto das isoformas 42k e 55k mediante dano ao DNA, avaliando a dinâmica do ciclo celular ou a sensibilidade das células aos danos ao DNA.

A radiação ionizante promove quebras de dupla fita, que são reconhecidas pelo complexo MRN e levam a ativação de ATM, que ativa CHK2. Em seguida, CHK2 fosforila CDC25A e/ou CDC25B, promovendo sua degradação/inibição. Em situações normais, CDC25A e B desfosforilam CDK2 e CDK1, respectivamente, permitindo suas interações com suas ciclinas e, conseqüentemente, a fosforilação de seus alvos, promovendo a progressão do ciclo celular. Assim, quando da inibição de CDC25A e B por CHK2, ocorre a inibição de CDK2 e CDK1 e o arresto do ciclo celular. Portanto, o arresto mediado por CHK2 promove a parada do ciclo em G1 ou G2, dependendo da fase do ciclo celular que a célula se encontra (WARMERDAM & KANAAR, 2010; SMITH et al., 2020;).

A análise da dinâmica de ciclo celular de células MCF7 superexpressando *GFP* pós-irradiação sugere a ativação desses pontos de checagem, através do acúmulo de células nas fases G1 e G2/M (**Figura 5.8 e 5.9**). Após o dano ao DNA, as células comprometidas com o ciclo celular prosseguem com a síntese do DNA até G2, quando ocorre a ativação do ponto de checagem e retardo do ciclo celular, resultando no acúmulo de células, observado nos intervalos de 12 horas e 48 horas. No intervalo de 24 horas ocorre um acúmulo de células em G1, que é resultado de uma fração de células que concluiu a mitose e progrediu para G1 (nova duplicação). Devido a persistência do dano, ocorre a ativação do ponto de checagem em G1, gerando o arresto do ciclo celular.

Quando comparadas com a condição controle, as células MCF7 superexpressando *CDK9* (ambas isoformas) apresentaram alterações na dinâmica do ciclo celular após dano. Semelhante à condição controle, as células com a superexpressão da isoforma *42k* apresentaram acúmulo em G2/M nos intervalos de 12 a 48 horas, o que sugere a manutenção da integridade do ponto de checagem em G2. Por outro lado, diferente do observado na condição controle, não houve acúmulo de células em G1 no intervalo de 24 horas, e sim uma diminuição constante da fração de células na fase G1, o que sugere alteração dos controles do ponto de checagem em G1 (**Figura 5.8 e 5.9**).

As células superexpressando a isoforma *55k* apresentaram aumento da fração de células em G1, tanto nas células não irradiadas, quanto nas células irradiadas até

24 horas após o dano. Esses resultados sugerem a participação da isoforma 55k no controle do ciclo celular, mais precisamente na fase G1 (**Figura 5.8 e 5.9**).

Para investigar a extensão do fenótipo observado no ciclo celular manifestado por cada isoforma, a mesma avaliação foi realizada em células MCF7 shCDK9 (deficientes em CDK9, ambas isoformas) e reconstituídas, individualmente, com as isoformas 42k ou 55k. As células reconstituídas reproduziram os fenótipos observados nas células proficientes. Após o dano ao DNA, células reconstituídas com isoforma 42k apresentaram diminuição da população em G1, enquanto células reconstituídas com a isoforma 55k apresentaram aumento da fração de células em G1, tanto nas condições não irradiada quanto nas irradiadas até o intervalo de 12 horas (**Figura 5.10 e 5.11**).

As alterações na dinâmica de ciclo celular mediante a superexpressão das isoformas de *CDK9*, nos dois contextos analisados, sugere que tanto a isoforma 42k quanto a isoforma 55k atuam em mecanismos de controle do ciclo celular.

O papel mais bem descrito de CDK9 é na regulação da transcrição, no entanto, alguns trabalhos sugerem o envolvimento de CDK9 em mecanismos de controle do ciclo celular. Esses trabalhos sugerem que CDK9 possa interagir/fosforilar as proteínas Rb (GRAÑA et al., 1994; SIMONE et al., 2002) e p53 (CLAUDIO et al., 2006; BAGASHEV et al., 2013). Tanto Rb quanto p53 regulam negativamente o ciclo celular, no entanto, a fosforilação de Rb permite a progressão do ciclo celular, enquanto a fosforilação de p53 promove o arresto.

Curiosamente, a superexpressão das isoformas 42k e 55k sugerem a mesma contraposição, a isoforma 42k diminui a eficiência do arresto em G1, favorecendo a transição das células para S, enquanto a isoforma 55k promove um acúmulo de células em G1. Essa hipótese é reforçada pelo trabalho de Bagashev e colaboradores (2013), que demonstraram que a superexpressão de p53 promove o arresto de células em G1, e esse arresto pode ser revertido pela superexpressão da isoforma 42k, que promove a progressão para a fase S (BAGASHEV et al., 2013).

Uma vez que os trabalhos que descrevem a interação entre CDK9 e Rb ou p53 consideraram somente a isoforma 42k, poderíamos especular que o papel das isoformas de CDK9 no ciclo celular ocorre através da interação com as proteínas Rb e p53, exercendo um controle dicotômico do ciclo celular (BAGASHEV et al., 2013; GRAÑA et al., 1994; SIMONE et al., 2002). Nesse sentido, a avaliação das interações de Rb e p53 com as duas isoformas de CDK9 pode auxiliar a compreensão do seu papel nos mecanismos de controle do ciclo celular. A avaliação da dinâmica do ciclo

celular em células deficientes em p53 (ou Rb) e em CDK9 (em ambas isoformas e individualmente) submetidas a radiação ionizante pode fornecer informações que auxiliem a compreensão dos mecanismos de controle do ciclo mediados por essa CDK.

Para uma melhor caracterização dos fenótipos das isoformas de CDK9, avaliamos a sensibilidade de células MCF7 shCDK9 reconstituídas com as isoformas 42k e 55k frente a quimioterápicos (Cisplatina, Etoposídeo e Irinotecano). Os quimioterápicos clássicos atuam diretamente no DNA, promovendo quebras ou alterando sua estrutura, impedindo a transcrição ou replicação do DNA e levando a morte, por isso, células com maiores taxas de proliferação apresentaram maior sensibilidade (GHOSH, 2019).

Quando comparadas com a condição controle (GFP), as células reconstituídas com a isoforma 42k apresentaram um aumento da resistência frente aos quimioterápicos Etoposídeo e Irinotecano (aproximadamente 1,5 vezes). Esses quimioterápicos promovem DSBs, através da inibição de enzimas responsáveis pela integridade estrutural do DNA nas fases S, G2 e M (BJORNSTI & KAUFMANN, 2019). Durante essas fases, as DBS são preferencialmente reparadas pela via de HR, com a participação da isoforma 42k (NEPOMUCENO et al., 2017a). Assim, o aumento da resistência a esses quimioterápicos pode decorrer do aumento da eficiência do reparo. Essa hipótese é reforçada pelo comportamento dessas células frente a cisplatina. O mecanismo de ação da cisplatina consiste na formação de adutos, que são reconhecidos e processados por vias de reparo que atuam em danos de simples fita (GHOSH, 2019). Como a isoforma 42k não participa dessas vias, sua reconstituição não impacta significativamente sobre a resistência dessas células.

As células reconstituídas com a isoforma 55k mostraram um aumento próximo de 2 vezes (ou mais de 3 vezes, no caso do Etoposídeo) na resistência aos quimioterápicos quando comparadas à condição controle (GFP) submetida ao mesmo tratamento. Em conjunto com os dados anteriores, o perfil de resistência dessas células reforça um putativo papel da isoforma 55k no controle da fase G1, impedindo a progressão do ciclo, e resultando na diminuição da taxa de proliferação e, conseqüentemente, diminuição da citotoxicidade dos quimioterápicos.

Nossos resultados sustentam a hipótese de que CDK9 atua em mecanismos de controle do ciclo celular, particularmente a isoforma 55k operando na fase G1. No entanto, a participação de CDK9 nesses mecanismos não exclui uma atuação em outras vias. Nesse sentido, a interação entre a isoforma 55k e o dímero Ku 70/80

(descrita por LIU e colaboradores [2010]) e a putativa interação entre a isoforma 55k e PTIP (WOODS *et al.*, 2012), sugerem um papel em mecanismos de reparo do DNA através da via de NHEJ.

Para investigar o possível papel da isoforma 55k na via de NHEJ, avaliamos a interação entre CDK9 e PTIP, tanto por rotinas de *GST-pulldown*, quanto por rotinas de coimunoprecipitação. Os ensaios de *GST-pulldown* mostraram que as duas isoformas interagem de maneira irrestrita com todos os tBRCTs de PTIP (**Figura 5.12B**). Consideramos a possibilidade de que uma eventual seletividade da interação dependesse de outros elementos na cadeia de PTIP.

Como a interação entre 53BP1 e PTIP depende dos dois tBRCTs localizados na região C-terminal de PTIP (**Figura 5.12A**, tBRCT C1 e C2) (Munoz et al, 2007), analisamos a interação de proteínas produzidas de forma ectópica CDK9 FLAG 42k ou CDK9 FLAG 55k e a proteína PTIP constitutiva. Nesse contexto, resultados iniciais sugerem que interação ocorra exclusivamente entre a isoforma 55k e PTIP (**Figura 5.13**). A ausência de interação entre a isoforma 42k e PTIP corrobora dados da literatura, que mostram a participação da isoforma 42k restrita ao mecanismo de HR, através de sua interação com as proteínas BRCA1 e BARD1 (NEPOMUCENO et al., 2017a).

Tendo em vista que proteínas envolvidas em vias de RDD podem apresentar alterações mediante dano ao DNA, avaliamos os níveis proteicos e a localização celular das isoformas 42k e 55k em células expostas a radiação ionizante. O aumento dos níveis proteicos de CDK9 mediante danos ao DNA indicam que, assim como as vias de controle de ciclo celular, os mecanismos de RDD regulam os níveis proteicos de CDK9 - sendo o aumento dos níveis proteicos da isoforma 55k mais evidente (**Figura 5.14**). Em conjunto, os dados de ciclo celular e de interação sugerem a participação da isoforma 55k em mecanismos de RDD, possivelmente na via de NHEJ.

Mediante dano ao DNA, somente a isoforma 42k apresenta o fenótipo de formação de focos (corroborando dados da literatura [Nepomuceno et al, 2017]). Após dano ao DNA, a isoforma 55k mantém sua localização nuclear difusa; naturalmente, isso não exclui sua participação em mecanismos de RDD, mas denota um comportamento em contraponto ao da isoforma 42k (Figura 5.15).

Quando investigamos o impacto das isoformas 42k e 55k na via de NHEJ, através da avaliação dos focos de 53BP1, as análises das microscopias mostraram que a isoforma 55k promove um aumento do número de focos de 53BP1, que não ocorre com a isoforma 42k (**Figura 5.15 e 5.16A**). Curiosamente, tanto a

superexpressão de *CDK9* 42k quanto de 55k aumentaram tanto o tamanho como a quantidade dos corpos nucleares de 53BP1 (**Figura 5.16B e C**).

Como a proteína 53BP1 é o principal regulador da via de NHEJ, favorecendo o reparo por essa via e inibindo a via de HR (SCULLY et al., 2019), é razoável inferir que modificações no padrão de focos de 53BP1 resultem na alteração da eficiência da via de NHEJ em uma extensão semelhante. Dessa forma, poderíamos especular que a isoforma 55k aumenta eficiência do reparo por NHEJ, enquanto a isoforma 42k não influencia a via de NHEJ (corroborando dados da literatura, Nepomuceno et al 2017). Para tanto, é necessário determinar o efetivo impacto da reconstituição das isoformas 42k e 55k, em células deficientes (MCF7 sh*CDK9*), na eficiência das vias de NHEJ e HR.

Apesar da consistência dos fenótipos observados para as isoformas 42k e 55k, a superexpressão de *CDK9* pode alterar a homeostase celular, amplificando eventos menores ou gerando artefatos. Por isso, os fenótipos observados na dinâmica do ciclo celular e formação de focos de 53BP1, também deveriam ser avaliados em células seletivamente deficientes para as isoformas de *CDK9*, por exemplo, em populações genomicamente editadas através de rotinas CRISPR/Cas-9.

A caracterização do papel da isoforma 55k sugere sua participação tanto na regulação da fase G1 do ciclo celular quanto em vias de RDD. Investigar se esses eventos são associados ou independentes aumenta a compreensão da correlação entre mecanismos de regulação das vias de reparo ao dano no DNA e o controle do ciclo celular.

## 7 Conclusões

Neste trabalho, mostramos que, diferente da isoforma CDK9 42k, os níveis proteicos da CDK9 55k são regulados ao longo do ciclo celular, prevalecendo na fase G1. Demonstramos também, que a regulação da expressão de *CDK9 55k* apresenta o mesmo perfil ciclo dependente dos níveis proteicos, com aumento na população em G1 e diminuição com a progressão do ciclo celular.

Nossos resultados indicam que CDK9 promove alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular. Sugerindo que, em resposta a danos no DNA, a isoforma CDK9 42k prejudica o arresto de células em G1, promovendo a progressão de células para S, em contraponto à isoforma CDK9 55k, que promove o acúmulo de células em G1.

Demonstramos também que a interação entre PTIP e CDK9 é restrita à isoforma 55k. E, mediante dano ao DNA, ocorre o aumento dos níveis proteicos da CDK9, particularmente de CDK9 55k.

Mostramos que CDK9 55k promove o aumento do número de focos de 53BP1 após dano ao DNA, diferente do comportamento da isoforma CDK9 42k. E que, enquanto CDK9 55k mantém sua localização nuclear difusa, a CDK9 42k apresenta o fenótipo de formação de focos.

Coletivamente, nossos dados sugerem uma relação recíproca de regulação entre os níveis da CDK9 55k e o ciclo celular. E que CDK9 55k participa das vias de RDD influenciando a via de NHEJ.

## 8 Bibliografia

- ABBOTTS, Rachel; WILSON III, David. Coordination of DNA Single Strand Break Repair. **Free Radic Biol Med.**, v. 107, p. 228–244, 2017.
- AKINCILAR, Semih Can; UNAL, Bilal; TERGAONKAR, Vinay. Reactivation of telomerase in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1659–1670, 2016.
- ALHMOUD, Jehad F et al. DNA Damage/Repair Management in Cancers and. **Cancers**, v. 12, 2020.
- ANDOR, Noemi; MALEY, Carlo C.; JI, Hanlee P. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. **Cancer Research**, v. 77, n. 9, p. 2179–2185, 2017.
- ATAIAN, Yeganeh; KREBS, Jocelyn E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. **Biochem Cell Biol**, 2006.
- AWASTHI, P.; FOIANI, M.; KUMAR, A. ATM and ATR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 6, p. 1285–1285, 2016.
- BACON, Curtis W.; D'ORSO, Iván. CDK9: a signaling hub for transcriptional control. **Transcription**, 2018.
- BAGASHEV, Asen et al. Cdk9 phosphorylates Pirh2 protein and prevents degradation of p53 protein. **Cell Cycle**, v. 12, n. 10, p. 1569–1577, 2013.
- BASU, Ashis K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 970, 2018.
- BJORNSTI, Mary-ann; KAUFMANN, Scott H. Topoisomerases and cancer chemotherapy : recent advances and unanswered questions. **F1000 Research**, v. 8, 2019.
- BLACKFORD, Andrew N.; JACKSON, Stephen P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. **Molecular Cell**, v. 66, n. 6, p. 801–817, 2017.
- BRADFORD, Marion 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, p. 248–254, 1976.
- BURNETTE, W. Neal. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical**

- Biochemistry**, v. 112, p. 195–203, 1981.
- CAESTECKER, Kevin W.; VAN DE WALLE, Gerlinde R. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: Past and present. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 5, p. 575–587, 2013.
- CAIRNS, Junmei et al. Bora Downregulation Results in Radioresistance by Promoting Repair of Double Strand Breaks. **Plos One**, v. 10, n. 3, 2015.
- CHANG, Howard H Y et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double - strand break repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 8, p. 495–506, 2017.
- CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017.
- CHUANG, Li-chiou et al. Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell cycle re-entry. **Molecular Cell**, v. 35, n. 2, p. 206–216, 2009.
- CICCIA, Alberto; ELLEDGE, Stephen J. The DNA Damage Response : Making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2011.
- CLAUDIO, Pier Paolo et al. Cdk9 Phosphorylates p53 on Serine 392 Independently of CKII. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, p. 602–612, 2006.
- COJOCARU, Marilena et al. Transcription Factor IIS Cooperates with the E3 Ligase UBR5 to Ubiquitinate the CDK9 Subunit of the Positive Transcription Elongation Factor B \*. **the journal**, v. 286, n. 7, p. 5012–5022, 2011.
- DE FALCO, Giulia et al. Cdk9 regulates neural differentiation and its expression correlates with the differentiation grade of neuroblastoma and PNET tumors. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n. 3, p. 277–281, 2005.
- DESHPANDE, Amit; SICINSKI, Peter; HINDS, Philip W. Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2909–2915, 2005.
- DOLATABADI, Soheila et al. Cell Cycle and Cell Size Dependent Gene Expression Reveals Distinct Subpopulations at Single-Cell Level. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, n. Janeiro, 2017.
- DUNN, Gavin P. et al. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.
- DURONIO, Robert J.; XIONG, Yue. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. 1–12, 2013.

- FISHEL, Richard. Mismatch Repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 44, p. 26395–26403, 2015.
- FLOWJO V10. Becton Dickinson. Disponível em: <https://docs.flowjo.com/flowjo/experiment-based-platforms/cell-cycle-univariate/>. Acesso em: Julho, 2020
- FU, Tsu-ju et al. Cyclin K Functions as a CDK9 Regulatory Subunit and Participates in RNA Polymerase II Transcription \*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34527–34531, 1999.
- GARRIGA, Judit et al. CDK9 Is Constitutively Expressed throughout the Cell Cycle , and Its Steady-State Expression Is Independent of SKP2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 15, p. 5165–5173, 2003.
- GEORGOULIS, Anastasios et al. Genome Instability and  $\gamma$  H2AX. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1979, p. 1–10, 2017.
- GHOSH, RAJIB; DAS, Debamitra;; FRANCO, Sonia. The Role for the DSB Response pathway in regulating chromosome translocations. **Chromosome Translocation**, v. 1044, 2018.
- GHOSH, Sumit. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, 2019.
- GIACINTI, Cristina et al. Cdk9-55: A new player in muscle regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, n. 3, p. 576–582, 2008.
- GOLIAS, C.H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 12, p. 1134–1141, 2004.
- GOODWIN, Jonathan; KNUDSEN, Karen. Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 10, p. 1126–1139, 2014.
- 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**, v. 91, n. April, p. 3834–3838, 1994.
- GUAN, Xiangming. Cancer metastases: Challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.
- HAKEM, Razqallah. DNA-damage repair: the good, the bad, and the ugly. **EMBO Journal**, v. 27, n. 4, p. 589–605, 2008.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: The next generation. Cell**. 2011
- HARPER, J. Wade; ELLEDGE, Stephen J. The DNA Damage Response: Ten Years

- After. **Molecular Cell**, v. 28, n. 5, p. 739–745, 2007.
- HEIDEN, Matthew G. Vander; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 22, n. 324, p. 1029–1033, 2009.
- HEIJINK, Anne Margriet; KRAJEWSKA, Małgorzata; VAN VUGT, Marcel A T M. The DNA damage response during mitosis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 750, p. 45–55, 2013.
- HOUTGRAAF, Jaco H.; VERSMISSEN, Jorie; VAN DER GIESSEN, Wim J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.
- INCA. **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. 2020.
- INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. 2017.
- IYER, Divya Ramalingam; RHIND, Nicholas. The intra-S checkpoint responses to DNA damage. **Genes**, v. 8, n. 2, 2017.
- JACHIMOWICZ, Ron D; GOERGENSE, Jonas; REINHARDT, H Christian. DNA double-strand break repair pathway choice - from basic biology to clinical exploitation. **Cell Cycle**, 2019.
- JEGGO, Penny A; PEARL, Laurence H; CARR, Antony M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, p. 1–8, 2016.
- JHURANEY, Ankita et al. PAXIP1 potentiates the combination of WEE1 inhibitor AZD1775 and platinum agents in lung cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 7, p. 1669–1681, 2016.
- JIANG, W. G. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S244–S275, 2015.
- KAO, Johnny et al. Cellular response to DNA damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, p. 243–258, 2005.
- KIERNAN, Rosemary E et al. Interaction between Cyclin T1 and SCF SKP2 Targets CDK9 for Ubiquitination and Degradation by the Proteasome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 23, p. 7956–7970, 2001.
- KOWALCZYKOWSKI, Stephen C. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, p. 1–36, 2015.
- LAW, Andrew M.K. et al. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 24, n.

- 4, p. R123–R144, 2017.
- LI, Jing; XU, Xingzhi. DNA double-strand break repair : a tale of pathway choices. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. May, p. 641–646, 2016.
- LI, Zhongdao; PEARLMAN, Alexander H; HSIEH, Peggy. DNA mismatch repair and the DNA damage response. **DNA Repair**, v. 38, p. 94–101, 2016.
- LIBERTI, Maria V; LOCASALE, Jason W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells ? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.
- LIM, Shuhui; KALDIS, Philipp. Cdks , cyclins and CKIs : roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 3093, p. 3079–3093, 2013.
- LIU, Hongbing et al. 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 245–250, 2010.
- LIU, Hongbing; HERRMANN, Christine H. Differential localization and expression of the Cdk9 42k and 55k isoforms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 203, n. 1, p. 251–260, 2005a.
- LIU, Hongbing; RICE, Andrew P. Genomic organization and characterization of promoter function of the human CDK9 gene. **Gene**, v. 252, p. 51–59, 2000.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LORD, Christopher J; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, p. 287–294, 2012.
- MA, Xiancai et al. TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb. **eLife**, v. 8, p. 1–45, 2019.
- MALUMBRES, Marcos. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. 1–10, 2014.
- MALUMBRES, Marcos; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature reviews: Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222–31, 2001.
- MANCEBO, Helena S Y et al. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. **Genes and Development**, v. 11, p. 2633–2644, 1997.
- MATT, Sonja; HOFMANN, Thomas G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 15, p. 2829–2850, 2016.
- MCVEY, Mitch et al. Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination.

- Annu Rev Genet**, v. 23, n. 50, p. 393–421, 2016.
- MIYATA, Yoshihiko; NAKAMOTO, Hitoshi; NECKERS, Len. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 3, p. 347–365, 2012.
- MLADENOV, Emil et al. DNA Double-Strand-Break Repair in Higher Eukaryotes and its Role in Genomic Instability and Cancer: Cell cycle and Proliferation-Dependent Regulation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. março, 2016.
- MUENST, S. et al. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 279, n. 6, p. 541–562, 2016.
- NEGRINI, Simona; GORGOULIS, Vassilis G.; HALAZONETIS, Thanos D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, 2010.
- NEPOMUCENO, T. C. **Avaliação do papel de CDK9 no reparo ao dano de DNA**. Dissertação de mestrado - INCA, 2016.
- NEPOMUCENO, Thales C.; FERNANDES, Vanessa C.; et al. BRCA1 recruitment to damaged DNA sites is dependent on CDK9. **Cell Cycle**, v. 16, n. 7, p. 665–672, 2017a.
- NEPOMUCENO, Thales C.; GREGORIIS, Giuliana De; et al. The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, 2017b.
- OH, Julyun; SYMINGTON, Lorraine. Role of the Mre11 Complex in Preserving Genome Integrity. **Genes**, v. 9, n. 12, p. 589, 2018.
- OLASHAW, Nancy; PLEDGER, W J. Paradigms of Growth Control : Relationship to Cdk Activation. **STKE**, n. May, p. 1–15, 2002.
- PAN, Mei Ren et al. Connecting the dots: From DNA damage and repair to aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.
- PANIER, Stephanie; BOULTON, Simon J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 1, p. 7–18, 2013.
- PANNUNZIO, Nicholas R.; WATANABE, Go; LIEBER, Michael R. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10512–10523, 2018.
- PAPARIDIS, Nikolas Ferreira dos Santos; DURVALE, Maxwell Castro; CANDURI, Fernanda. The emerging picture of CDK9 / P-TEFb : more than 20 years of advances since PITALRE. **Molecular BioSystems**, 2016.
- PEARCE, Alison et al. Productivity losses due to premature mortality from cancer in

- Brazil, Russia, India, China, and South Africa (BRICS): A population-based comparison. **Cancer Epidemiology**, v. 53, n. July 2017, p. 27–34, 2018.
- PEDERSEN, Rune Troelsgaard et al. TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 4, p. 565–582, 2015.
- PENG, Junmin et al. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. **Genes and Development**, v. 12, p. 755–762, 1998.
- PRAGER, Gerald W.; ZIELINSKI, Christoph C. Angiogenesis in cancer. **Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis**, v. 2, n. 3, p. 335–356, 2013.
- RAJABI, Mehdi; MOUSA, Shaker. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 34, 2017.
- RAPOSO, T. P. et al. Inflammation and cancer: Till death tears them apart. **Veterinary Journal**, v. 205, p. 161–174, 2015.
- SANDER VAN DEN HEUVEL. Cell-cycle regulation. **Worm B**. [S.l: s.n.], 2005. v. 28. .
- SCULLY, Ralph et al. DNA double: strand break pathway choice in somatic mammalian cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 698–714, 2019.
- SHALTIEL, I. A. et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 4, p. 607–620, 2015.
- SHCHEBET, Andrei et al. Phosphorylation by cyclin-dependent kinase-9 controls ubiquitin-conjugating enzyme-2A function. **Cell Cycle**, v. 11, n. 11, p. 2122–2127, 2012.
- SHORE, Sarah M. et al. Characterization of Cdk9 and differential regulation of two Cdk9 isoforms. **Gene**, v. 350, n. 1, p. 51–58, 2005.
- SHORE, Sarah M et al. Identification of a novel isoform of Cdk9. **Gene**, v. 307, p. 175–182, 2003.
- SIMONE, Cristiano et al. Physical interaction between pRb and cdk9/cyclinT2 complex. **Oncogene**, v. 21, n. 26, p. 4158–4165, 2002.
- SIRBU, Bianca M.; CORTEZ, David. DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, 2013.
- SMITH, Hannah L et al. DNA damage checkpoint kinases in cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 22, p. 1–15, 2020.
- SMITS, Veronique A.J.; GILLESPIE, David A. DNA damage control: Regulation and

- functions of checkpoint kinase 1. **FEBS Journal**, v. 282, n. 19, p. 3681–3692, 2015.
- SOBINOFF, Alexander P.; PICKETT, Hilda A. Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 12, p. 921–932, 2017.
- STORCH, Katja; CORDES, Nils. 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. 191–198, 2016.
- TUBBS, Anthony & NUSSENZWEIG, André. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 644–656, 2017.
- WARMERDAM, Daniël O.; KANAAR, Roland. Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 704, n. 1–3, p. 2–11, 2010.
- WHITFIELD, Michael L et al. Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. June, p. 1977–2000, 2002.
- WHO. **Global Cancer Observatory**, França, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acessado em: Junho, 2020.
- WOODS, Nicholas T. et al. Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions. **Science Signaling**, v. 5, n. 242, p. 82–91, 2012.
- 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, 2008.
- YU, David S.; CORTEZ, David. A role for cdk9-cyclin k in maintaining genome integrity. **Cell Cycle**, v. 10, n. 1, p. 28–32, 2011.
- YU, David S et al. Cyclin-dependent kinase 9–cyclin K functions in the replication stress response. **EMBO reports**, v. 11, n. 11, p. 876–882, 2010.
- YU, Fang et al. SUMO suppresses and MYC amplifies transcription globally by regulating CDK9 sumoylation. **Cell Research**, 2018.
- ZANNINI, Laura; DELIA, Domenico; BUSCEMI, Giacomo. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 442–457, 2014.
- ZHANG, Hui et al. SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. **PNAS**, v. 110, n. 33, p. 13546–13551, 2013.
- ZHAO, Xin et al. Cell cycle-dependent control of homologous recombination. **Acta**

**Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 8, p. 655–668, 2017.

ZHU, Yuerong et al. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. **Genes and Development**, v. 11, p. 2622–2632, 1997.