



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

JOÃO DE SÉLLOS ROCHA LACLETTE

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE BCCIP NA VIA DE REPARO DE DANO
AO DNA: SUA ASSOCIAÇÃO A BRCA1 E BARD1**

Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

Prof. Dr. Guilherme Suarez-Kurtz

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

JOÃO DE SÉLLOS ROCHA LACLETTE

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE BCCIP NA VIA DE REPARO DE DANO

AO DNA: SUA ASSOCIAÇÃO A BRCA1 E BARD1

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

Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

Prof. Dr. Guilherme Suarez-Kurtz

RIO DE JANEIRO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Palavras-chave: 1. Reparo de dano ao DNA 2. BRCA1. 3. BARD1. 4. BCCIP



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

JOÃO DE SÉLLOS ROCHA LACLETTE

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE BCCIP NA VIA DE REPARO DE DANO AO DNA:
SUA ASSOCIAÇÃO A BRCA1 E BARD1**

Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

Prof. Dr. Guilherme Suarez-Kurtz

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Martin Bonamino

Prof. Dr. Etel Gimba

Prof. Dr. Luciana Chiarini

Prof. Dr. Turán Urményi

Prof. Dr. Sheila Coelho – Suplente I

Prof. Dr. Rafael Mesquita – Suplente II

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE BCCIP NA VIA DE REPARO DE DANO AO DNA:

SUA ASSOCIAÇÃO A BRCA1 E BARD1

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por ter guiado minha vida em meios às dificuldades inerentes a todo o processo de doutoramento e me proporcionado a oportunidade de trabalhar com tantas pessoas boas e competentes ao longo desses quase 4 anos.

Agradeço ao meu orientador Dr. Marcelo Alex de Carvalho por ter me recebido como aluno e ter, como muita paciência, me mostrado a importância do que significa “formar pessoas”. Sou extremamente grato pelo tempo que passei como seu aluno, pela sua preocupação evidente por minha formação mais até do que com os resultados.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Guilherme Suarez-Kurtz por ter aberto prontamente as portas do laboratório, na ocasião de minha mudança de grupo de pesquisa. Sempre que precisei ele pôde me ajudar, sou sinceramente grato por isso.

Agradeço a Dr. Eliana Abdelhay e Dr. Luciana Pizzatti pelas análises de espectrometria de massas das amostras de rotinas de purificação sequencial por afinidade (TAP).

Agradeço aos meus amigos do grupo de pesquisa Renato Carvalho, Thales Nepomuceno, Vanessa Fernandes, Giuliana de Gregoris, Renata Barbosa, Thiago por todo apoio, discussões de bancada, companheirismo, conversas tomando café e companhia no terceiro turno, nos fins de semana e feriados. Agradeço especialmente ao meu amigo Renato pela ajuda em momentos oportunos como na mudança de grupo de pesquisa. Sou especialmente grato ao Thales pela amizade e toda ajuda disponibilizada na bancada desde o início até o fim do meu doutorado. Muito obrigado mesmo.

Agradeço aos amigos da divisão de Farmacologia: Diogo Piranda, Mateus Moraes, Daniela Vargens, Marcelo Sobral, Dr. Rosane Vianna, Vera Motta, Ivone Carvalho e toda equipe de apoio e preparo de materiais.

Agradeço aos amigos do Serviço de Pesquisa Clínica pelo apoio sempre que necessário, Joyce de Moraes, Vitor Hugo de Almeida, Isabela Guimarães, Viviane Monteiro e Haynna Inada.

Agradeço a minha mãe Eliane de Séllos e minha avó Wanda Maria de Séllos (*in memoriam*) por todo o investimento feito em minha educação. Agradeço o apoio de meus irmãos Pedro e Nina de Séllos. Agradeço o incentivo do meu pai Renato Laclette.

Agradeço especialmente a minha querida esposa Daniela Louback por todo apoio, incentivo e suporte que não permitiram que eu esmorecesse nos momentos de resultados negativos e desânimo. Agradeço imensamente por tê-la ao meu lado. Não posso deixar de agradecer o apoio de meus sogros Antônio Paulo Pereira e Cirene Louback, que mesmo sem entender meu trabalho me apoiaram sempre.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE BCCIP NA VIA DE REPARO DE DANO AO DNA: SUA ASSOCIAÇÃO A BRCA1 E BARD1

João de Séllos Rocha Laclette

BARD1 (*BRCA1 associated RING domain 1*) foi identificada originalmente como uma proteína de interação de BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) através de ensaio de dois híbridos em levedura (Y2H). Foi descrito que a formação do heterodímero BRCA1/BARD1 é essencial para que BRCA1 exerça sua função supressora de tumor. Ambas as proteínas interagem através de seus domínios RING N-terminais para formar o heterodímero BRCA1/BARD1 com atividade E3 ubiquina ligase, o que constitui a principal atividade catalítica deste complexo. A porção C-terminal de BRCA1 contém dois domínios BRCT em tandem (tBRCT), característicos de uma grande família de proteínas envolvidas no controle da estabilidade genômica. Esses domínios tBRCT medeiam a associação com uma plêiade de proteínas com papel importante no controle do reparo de dano ao DNA (RDD), transcrição gênica e ciclo celular. A fim de identificar novas proteínas de interação com BARD1 foi realizado Y2H utilizando o tBRCT (554-777aa) de BARD1 e uma biblioteca de cDNA de testículo humano. Como resultado, foi identificado, dentre outras proteínas, o cDNA que codifica para a porção C-terminal de BCCIP (*BRCA2 and CDKN1A Interacting Protein*) (240-322aa). BCCIP foi descrito por seu envolvimento em vias de RDD e controle do ciclo celular. BCCIP interage com BRCA2 e ambas são importantes para a formação de foco de RAD51 após o dano por radiação ionizante. BCCIP interage com p21, potencializando a inibição de CDK2, além de regular a atividade transcricional de p53 na região promotora de p21. O objetivo do presente estudo é analisar o papel de BCCIP na via de RDD. A interação BARD1/BCCIP foi confirmada por ensaios de *pull-down* e de co-imunoprecipitação (co-IP) de BARD1 e BCCIP produzidos ectopicamente. O complexo BARD1/BCCIP constitutivo também foi identificado em células humanas (ES2) através de rotinas de co-IP. Adicionalmente, foi identificada, também por co-IP, a associação de BCCIP com β -BARD1, uma isoforma de BARD1 que não contém o domínio RING. Curiosamente, a BCCIP identificada no complexo com BARD1 foi encontrada monoubiquitinada, o que foi confirmado por co-IP de BCCIP e ubiquitina produzidas ectópica e constitutivamente. A forma modificada de BCCIP foi identificada num painel de linhagens celulares humanas. Também identificamos a participação de BCCIP num complexo com BRCA1, sugerindo sua participação no fenômeno de ubiquitinação de BCCIP. A fim de melhor compreender o papel de BCCIP na via de RDD, desenvolvemos linhagens ES2 estavelmente silenciadas para *BCCIP* e analisamos os eventos iniciais do RDD como fosforilação de ATM e H2AX (substrato de ATM) além da ubiquitinação de H2AX. Observamos uma persistência dos sinais de fosforilação de ATM e H2AX (bem como de sua monoubiquitinação) nas células deficientes em BCCIP após o dano por irradiação em contraste com as células ES2 controle. A ausência de BCCIP também gerou um retardo na cinética do ciclo celular após o dano. Adicionalmente, foi conduzida uma varredura de interações proteicas de BCCIP através de TAP-MS, tendo como resultado a identificação de 5 novas proteínas putativas de interação com BCCIP. Em conjunto, nossos dados indicam BCCIP em associação com BARD1 e BRCA1, além de seu envolvimento nos eventos iniciais do RDD.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE ROLE OF BCCIP IN THE DNA DAMAGE REPAIR PATHWAY: ASSOCIATION WITH BRCA1 AND BARD1

João de Séllos Rocha Laclette

BARD1 (BRCA1 associated RING domain 1) was originally identified in a yeast-two-hybrid (Y2H) screen as a binding partner of BRCA1 (breast cancer 1, early onset). The functional heterodimer BRCA1/BARD1 is required for several of the cellular and tumor-suppressor functions of BRCA1. Both proteins interact through the N-terminal RING domain to form a heterodimeric E3 ubiquitin ligase that constitutes the major catalytic activity of the BRCA1-BARD1 complex. The carboxy terminus of BRCA1 is highly acidic and contains two tandem BRCA1 C-terminal (tBRCT) domains, which are characteristic of members of a large family of proteins involved in genome stability. These domains are protein-protein interacting regions that mediate the association with a number of other proteins with a role in DNA replication, DNA damage repair (DDR) pathway, transcription and cell cycle control. In order to identify putative interaction-proteins with BARD1 C-terminal region our group performed a Y2H assay using BARD1 tBRCT (aa 554-777) to screen a human testis cDNA library. As result, we identified, among other hits, a cDNA coding for BCCIP (BRCA2 and CDKN1A interacting protein) C-terminal region, residues 240-322. BCCIP is known for its involvement in DDR and cell cycle control. BCCIP interacts with BRCA2, and both proteins are important for RAD51 focus formation after ionizing radiation and homologous recombination (HR) repair of double-strand-breaks (DSBs). BCCIP enhances the p21 suppression activity towards CDK2 and its downregulation reduces p21 expression by abrogating p53 transcription activity. The aim of this study is to analyze the role of BCCIP in the DDR pathway. We confirmed the BARD1/BCCIP interaction by pull-down and co-immunoprecipitation (co-IP) analyzes of ectopically expressed BARD1 and BCCIP. We also identified the constitutive BCCIP/BARD1 complex in ES2 human cells by co-IP assays. Additionally, we identified a splicing isoform of BARD1, BARD1- β , which has no N-terminal RING domain, participating in a complex with BCCIP using co-IP assays. Interestingly, the BCCIP observed in complex with BARD1 corresponds to a post-translational modified form, suggesting that BCCIP may be a putative target for monoubiquitination. We confirm the monoubiquitination of BCCIP by IP analysis of both ectopic and constitutive expression of BCCIP and ubiquitin. The monoubiquitinated form of BCCIP was identified in a panel of human cell lines. We also identified constitutively expressed BRCA1 as a component of a BCCIP complex, suggesting its participation in the ubiquitination event. In order to better understand the role of BCCIP in the DDR pathway, we developed stably BCCIP silenced ES2 cells and analyzed initial events of the DNA damage response: the ATM phosphorylation, H2AX phosphorylation (an ATM substrate) and H2AX ubiquitination. We observed a persistent ATM and H2AX phosphorylation (as well as ubiquitination) signals in BCCIP deficient cells after DNA damage in contrast with the control ES2 cells. The absence of BCCIP also induced a delay in cell cycle kinetics after damage. In addition, we evaluated the BCCIP protein interaction network using tandem affinity purification followed by mass spectrometry (TAP-MS) revealing 5 new putative interaction partners. Taken together, our data points BCCIP in association with BARD1 and BRCA1 and involved in initial steps of DDR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.2. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	31
Tabela 4.7. Lista de anticorpos primários utilizados.....	36
Tabela 5.8. Proteínas candidatas de interação com BCCIP identificadas por rotinas de TAP e espectrometria de massas.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1. Representação esquemática da via de RDD por recombinação homóloga.....	06
Figura 1.2.2. Representação esquemática dos complexos de A, B e C de BRCA1.....	20
Figura 1.3.1.1. Organização estrutural de BRCA1.....	10
Figura 1.3.1.2. Representação esquemática da via de ubiquitinação.....	11
Figura 1.4: Representação esquemática dos domínios estruturais de BRCA1 e BARD1 humanos.....	16
Figura 1.5. Estrutura dos domínios BRCT N-terminal e C-terminal de BRCA1 representados tridimensionalmente pelo modelo de fitas.....	21
Figura 1.6. Representação esquemática da estrutura de BCCIP α e BCCIP β	24
Figura 4.1.2: Representação esquemática dos vetores utilizados na geração das construções pEGFP-BCCIP, pFlag-BCCIP e as proteínas de fusão derivadas GFP-BCCIP e Flag-BCCIP.....	29
Figura 4.1.3. Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados na geração das construções pNTAP-BCCIP, pNTAP-GAL4DBD e das proteínas de fusão derivadas CBP-SBP-BCCIP e CBP-SBP-GAL4DBD	30
Figura 4.8. Representação esquemática do vetor utilizado na geração da construção pGEX-BARD1 (FL, NT e CT) e das proteínas de fusão geradas.....	38
Figura 4.12. Representação esquemática das etapas de purificação por afinidade sequencial.....	42
Figura 5.1. Sequência de resíduos de aminoácidos das isoformas alfa e beta de BCCIP identificada no Y2H.....	44
Figura 5.2.1. Amplificação por rotina de PCR da sequência codificante de BCCIP α	46
Figura 5.2.2. Padrão de produção da proteína de fusão GFP-BCCIP em células humanas.....	47
Figura 5.3.1: Avaliação da interação entre GFP-BCCIP e GST-BARD1 por rotina de <i>Pulldown</i>	49
Figura 5.3.2. Mapeamento da região de interação de BARD1 com BCCIP por ensaio de <i>Pulldown</i>	50
Figura 5.4.1. Avaliação da associação de BCCIP e BARD1 produzidos ectopicamente em células humanas.....	52
Figura 5.4.2. Avaliação da associação de BCCIP e BARD1 produzidos constitutivamente em células humanas.....	54

Figura 5.5.1. Análise da modificação pós-traducional de BCCIP.....	57
Figura 5.5.2: Avaliação do padrão de produção de BCCIP em células humanas.....	58
Figura 5.6.1. Análise da associação de BCCIP com BARD1 em células da linhagem ES2.....	60
Figura 5.7.1. Avaliação do perfil proteico de BCCIP em células ES2 com expressão gênica de <i>BCCIP</i> estavelmente silenciada.....	62.
Figura 5.7.2. Análise do perfil de ativação de ATM em células com expressão de <i>BCCIP</i> estavelmente silenciada.....	64
Figura 5.7.3. Fosforilação de H2AX é mais intensa e duradoura nas células ES2 estavelmente silenciadas para <i>BCCIP</i>	65
Figura 5.7.4: A monoubiquitinação de H2AX é mais duradoura nas células ES2 silenciadas para BCCIP.....	66
Figura 5.7.5. Avaliação do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação de 2Gy.....	68
Figura 5.7.6. Avaliação do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação de 10Gy.....	69
Figura 5.7.7. Gráfico do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação nas doses de 2 e 10Gy.....	70
Figura 6. Alinhamento de ortólogos de BCCIP.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRAXAS - *family with sequence similarity 175, member A*
ATM - *ataxia telangiectasia mutated*
BACH1 - *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*
BARD1 – *BRCA1- associated ring domain 1*
BCL3 - *B-cell CLL/lymphoma 3*
BRCA1 - *breast cancer 1, early onset*
BRCA2 - *breast cancer 2, early onset*
BRCC36 - *BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3*
BRCC45, *BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 4*
BSA – *Bovine Serum Albumine*
CBP – *Calmodulin Binding Peptide*
CDK2 - *cyclin-dependent kinase 2*
CDKN1A - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
CHEK2- *checkpoint kinase 2*
CtIP - *retinoblastoma-binding protein 8*
CTRL – Controle
CVD - domínio C-terminal variável
CyEx – extrato proteico citoplasmático
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSB - quebra de fita dupla de DNA
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
E2N - *ubiquitin-conjugating enzyme E2N*
FHA - *forkhead associated*
HR - recombinação homóloga
ICD - domínio interno conservado
IPTG - *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
MDC1 - *mediator of DNA-damage checkpoint 1*
MERIT40, *Mediator of Rap80 Interactions and Targeting 40 kD*
MRE11 - *MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)*
NAD - domínio N-terminal ácido
NBS1 - *Nijmegen breakage syndrome 1*
NF- κ B - *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*

NHEJ - recombinação não homóloga de junção de pontas
NLS - sinal de localização nuclear
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PP2A - *protein phosphatase 2A*
RAD50 - *RAD50 homolog (S. cerevisiae)*
RAD51 - *RAD51 recombinase*
RAD54 - *RAD54-like (S. cerevisiae)*
RDD - reparo de dano ao DNA
RNF8 - *ring finger protein 8*
RNF168 - *ring finger protein 168*
RPA - *replication protein A1, 70kDa*
TAP - purificação de proteínas por afinidade sucessiva
tBRCT – domínio BRCT em tandem
TOPBP1 - *topoisomerase (DNA) II binding protein 1*
UbcH5 - *ubiquitin-conjugating enzyme E2D1*
UBE2K - *ubiquitin-conjugating enzyme E2K*
UBE2N - *ubiquitin-conjugating enzyme E2N*
Y2H - dois híbridos em levedura

ÍNDICE

1.	Introdução.....	01
1.1.	A susceptibilidade genética ao câncer de mama e o gene <i>BRCA1</i>	01
1.2.	Reparo de dano ao DNA (RDD).....	03
1.3.	<i>BRCA1 (breast cancer 1, early onset)</i>	08
1.3.1.	Organização estrutural de <i>BRCA1</i>	08
1.3.2.	<i>BRCA1</i> e o controle do ciclo celular após o dano ao DNA.....	13
1.4.	<i>BARD1 (BRCA1-Associated Ring Domain 1)</i>	14
1.5.	Domínios BRCT em tandem (tBRCT).....	19
1.6.	<i>BCCIP (BRCA2 and CDKN1A/p21 interacting protein)</i>	22
2.	Objetivo geral.....	25
3.	Objetivos específicos.....	25
4.	Materiais e Métodos.....	26
4.1.	Construções plasmidiais de <i>BCCIP</i>	26
4.1.1.	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	26
4.1.2.	PCR e clonagem de inserto em vetor.....	27
4.2.	Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmidial.....	32
4.3.	Sequenciamento.....	32
4.4.	Cultivo de linhagens celulares.....	33
4.5.	Transfecção de linhagens celulares humanas.....	33
4.6.	Extração de proteínas de células humanas.....	34
4.7.	<i>Western Blotting</i> e imunodeteção.....	35
4.8.	Ensaio de <i>Pulldown</i>	37
4.9.	Ensaio de Co-imunoprecipitação de proteínas.....	39
4.10.	Silenciamento da expressão gênica de <i>BCCIP</i>	39
4.10.1.	Geração de partículas lentivirais.....	39
4.10.2.	Transdução viral.....	40
4.11.	Ensaio de análise do ciclo celular induzido por dano ao DNA.....	40
4.12.	Purificação de proteínas por afinidade sequencial (TAP).....	41
5.	Resultados.....	43
5.1.	Identificação de <i>BCCIP</i> no Y2H.....	43
5.2.	Produção de proteínas quiméricas.....	45
5.3.	Avaliação da interação <i>BARD1-BCCIP</i> através de produção de proteína recombinante.....	48
5.4.	Avaliação da interação <i>BARD1-BCCIP</i> em células humanas.....	51
5.5.	Avaliação da modificação pós-traducional de <i>BCCIP</i>	55
5.6.	Avaliação da interação <i>BRCA1-BCCIP</i> em células humanas.....	59

5.7. Avaliação do envolvimento de BCCIP em vias RDD e no controle do ciclo celular.....	61
5.8. Determinação da rede de interações proteicas de BCCIP.....	71
6. Discussão.....	73
7. Conclusões.....	83
8. Referências.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. A susceptibilidade genética ao câncer de mama e o gene *BRCA1*

O câncer de mama é uma das doenças mais frequentes e importantes que acometem mulheres na atualidade, trata-se do segundo tipo de câncer mais incidente no mundo e o primeiro entre as mulheres. De acordo com o *American Cancer Society*, somente nos Estados Unidos, mais de 232.000 novos casos de câncer de mama eram esperados em 2014 e cerca de 40.000 mulheres seriam vítimas fatais dessa doença no mesmo ano (*American Cancer Society*, <http://www.cancer.gov>). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), o número de novos casos de câncer de mama esperados no Brasil em 2014 é de 57.120, com um risco estimado de 56 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda costuma ser diagnosticada em estádios avançados (INCA, <http://www.inca.gov.br>).

O câncer de mama pode ser classificado como hereditário ou esporádico, quando não há padrão de herança familiar aparente. Em 1990, Hall *et al.* mapearam o primeiro gene determinante de susceptibilidade ao câncer de mama, o *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) (HALL *et al.*, 1990; CAESTECKER e VAN DE WALLE, 2013). Quatro anos mais tarde, foi mapeado o segundo gene, o *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) (WOOSTER *et al.*, 1994; STRUEWING *et al.*, 1997). *BRCA1* e *BRCA2* não apresentam qualquer homologia de sequência, mas ambos são genes supressores de tumor e comportam-se como *caretakers* (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os alelos de *BRCA1* encontram-se mutados em cerca de 50% das famílias com casos hereditários de câncer de mama, e 80% das famílias com casos de câncer hereditário de mama e ovários. Mulheres com predisposição hereditária associada a mutações em *BRCA1* possuem um risco de 56-80% para o desenvolvimento do câncer de mama (contra 11% na população geral) e de 16-60% para câncer de ovário (contra 1.4-2.5% na população geral) (EASTON *et al.*, 1993).

Em trabalho recente, foram analisadas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* quanto ao risco de desenvolvimento de câncer de mama e ovário numa população composta por 676 famílias de judeus Ashkenazi e 1.272 famílias de outras etnias dos EUA. Nesse estudo foi observado que mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* possuem, na idade de 70 anos, um risco estimado de 39-54% de desenvolvimento de câncer de mama e 30-50% câncer de ovário. Mulheres portadoras de mutações no gene *BRCA2* têm, na idade de 70 anos, um risco de 36-51% de desenvolvimento de câncer de mama e 14-32% de câncer de ovário (CHEN *et al.*, 2006).

Apesar das mutações em *BRCA1* herdadas comporem uma parcela pequena dos casos de câncer de mama (2,5 a 5%), grande parte das neoplasias de mama (30 a 40%) apresentam níveis reduzidos da proteína BRCA1. A perda de função de BRCA1, por silenciamento epigenético, mutação ou por outros mecanismos pode ser um componente comum na patogênese do câncer esporádico de mama (RICE *et al.*, 1998; TAYLOR *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1999; ESTELLER *et al.*, 2000; STAFF *et al.*, 2003; ROSEN, 2013).

Desde a descoberta de *BRCA1*, outros genes foram descritos por sua importância na patogênese do câncer de mama, dentre eles, destacam-se por seu envolvimento em vias de reparo de dano ao DNA, *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*) e *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*) (KEAN, 2014).

Por meio de estratégias de clonagem posicional, *BRCA1* foi localizado na posição 21 do braço longo do cromossomo 17 (HALL, LEE *et al.*, 1990). O gene é composto por 24 éxons, dos quais 22 são codificantes e 2 não codificantes (MIKI *et al.*, 1994). O gene *BRCA1* é expresso na maioria dos tecidos, sendo mais abundante no testículo e no timo, codificando uma proteína nuclear de 1.863 resíduos de aminoácidos e 220 kDa (ROSEN, 2013).

BRCA1 possui um papel crucial em processos de manutenção da estabilidade genômica e promoção da sobrevivência celular. Através da interação e formação de complexos com uma gama de diferentes proteínas, BRCA1 age como uma plataforma de coordenação da resposta ao dano de DNA, incluindo o controle do ciclo celular e o reparo do DNA (OHTA *et al.*, 2011).

1.2. Reparo de dano ao DNA (RDD)

A integridade genômica de uma célula humana é continuamente desafiada por lesões no DNA milhares de vezes por dia (LINDAHL e BARNES, 2000). Enquanto a maioria dessas lesões ocorre como subprodutos do metabolismo natural da célula ou da replicação do DNA, elas também podem ser induzidas por radiação ionizante e agentes químicos ambientais (FRIEDBERG *et al.*, 2006; JACKSON e BARTEK, 2009; CICCIA e ELLEDGE, 2010). Lesões no DNA também ocorrem como intermediários no rearranjo genômico proveniente do desenvolvimento de linfócitos e células germinativas (JACKSON e BARTEK, 2009; LONGHESE *et al.*, 2009; TSAI e LIEBER, 2010).

O dano ao DNA pode ter efeitos deletérios, resultando em mutações e aberrações cromossômicas (HOEIJMAKERS, 2001a; CICCIA e ELLEDGE, 2010). Defeitos na detecção e sinalização de reparo de dano ao DNA podem contribuir para diversas patologias, como problemas no desenvolvimento, doenças neurodegenerativas e o câncer (JACKSON e BARTEK, 2009), o que evidencia a importância crucial de uma eficiente resposta ao dano de DNA para a viabilidade do organismo.

As principais formas de lesões no DNA são: quebras de fita dupla, quebras de fita simples, formação de adutos, alquilação e oxidação de bases nitrogenadas. Cada um destes tipos de dano requer processos distintos de reparo, como a recombinação homóloga, recombinação não homóloga com junção de pontas e o reparo por excisão de base ou excisão de nucleotídeos (LORD e ASHWORTH, 2012).

A quebra de fita dupla de DNA (DSB) é considerada a mais crítica forma de dano, pois compromete a integridade de duas fitas de DNA ao mesmo tempo. Os mecanismos de reparo de DSB incluem a recombinação homóloga (HR) e a recombinação não homóloga de junção de pontas (NHEJ). BRCA1 participa nos dois mecanismos de reparo.

A via de reparo por recombinação homóloga é o mais preciso mecanismo de reparo e se utiliza de um trecho da cromátide irmã como molde para a recombinação da região da quebra de DNA. Uma vez que as cromátides irmãs só estão presentes

nas fases S e G2 do ciclo celular, a recombinação homóloga só pode ocorrer durante essas fases do ciclo (HOEIJMAKERS, 2001b).

O processo de recombinação homóloga acontece de maneira ordenada através da ação sequencial de diversas proteínas que são recrutadas para o sítio de dano.

Logo nos momentos iniciais após o dano por quebra de fita dupla, a região da lesão é reconhecida pelo complexo de proteínas MRN (**MRE11**, *MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)*; **RAD50**, *RAD50 homolog (S. cerevisiae)*; **NBS1**, *Nijmegen breakage syndrome 1*) que atua como um sensor de dano ao DNA e é recrutado ao sítio de DSB (PAULL e LEE, 2005). A proteína ATM atua como um dos principais reguladores do RDD (LAVIN e KOZLOV, 2007). Células deficientes para ATM exibem hipersensibilidade à radiação ionizante e defeitos nos pontos de checagem do ciclo celular. ATM normalmente encontra-se na forma de dímero inativo, mantido pela ação de uma serina/treonina fosfatase PP2A (*protein phosphatase 2A*) (BAKKENIST e KASTAN, 2003; GOODARZI *et al.*, 2004). Em resposta ao dano de DNA, PP2A se dissocia de ATM, permitindo sua autofosforilação no resíduo de serina 1981 (além de outros resíduos) e a conversão em monômero ativo, que é facilitada pela interação entre o complexo MRN e ATM no sítio de dano.

Nas regiões de dano, ATM rapidamente fosforila a variante X da histona H2A (H2AX) no resíduo de serina 139 (cuja forma fosforilada é chamada de γ -H2AX). A H2AX fosforilada é reconhecida por MDC1 (*mediator of DNA-damage checkpoint 1*), permitindo que este seja recrutado para os sítios de DSBs (STEWART *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005). Esses eventos ocorrem em segundos após a quebra de fita dupla de DNA. Assim como H2AX, MDC1 também é fosforilado por ATM, e amplifica o sinal de reparo de dano ao DNA (LOU *et al.*, 2006). O mecanismo proposto para a amplificação de sinal é o de que MDC1, associado a γ -H2AX, pode recrutar outra molécula de ATM através da interação via domínio FHA (*forkhead associated*) de MDC1, o que permitiria a fosforilação de outra molécula de H2AX e subsequente recrutamento de uma nova molécula de MDC1 e assim sucessivamente, configurando uma regulação positiva (LOU, MINTER-DYKHOUSE *et al.*, 2006; YAN e JETTEN, 2008).

Na sinalização anterior à ATM, MDC1 e γ -H2AX, o complexo MRN também está envolvido na amplificação do sinal, pois MDC1 pode ser fosforilado por CK2 (*casein kinase 2*) e ser reconhecido por NBS (do complexo MRN) (SPYCHER *et al.*, 2008). MDC1 ligado à γ -H2AX é então reconhecido por duas proteínas com função E3 ubiquitina ligase: RNF8 (*ring finger protein 8*) e RNF168 (*ring finger protein 168*). Estas duas, juntamente com E2 ubiquitina conjugase E2N (*ubiquitin-conjugating enzyme E2N*), inserem cadeias de poliubiquitinas em H2AX e H2A (figura 1.2.1).

Posteriormente RAP80 é recrutada aos sítios de dano através de seu motivo UIM (*ubiquitin interacting motif*) que interage com os resíduos poliubiquitinados de H2AX, levando ao recrutamento de BRCA1 e das proteínas que compõe o complexo A de BRCA1 (BARD1, *BRCA1 associated RING domain 1*; BRCC36, *BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3*; BRCC45, *BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 4*; MERIT40, *Mediator of Rap80 Interactions and Targeting 40 kD*) (FONG *et al.*, 2009; WANG, 2012). BRCA1 pode ainda interagir, através de seus domínios BRCT (*BRCA1-associated C-terminal*), com a helicase BACH1 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*) e a nuclease CtIP (*retinoblastoma-binding protein 8*), assim como ocorre com Abraxas (*family with sequence similarity 175, member A*). A associação destas proteínas (Abraxas, BACH1, CtIP) com BRCA1 ocorre de maneira mutuamente exclusiva, formando complexos distintos baseados em BRCA1 (figura 1.2.2), requeridos em momentos diferentes nas rotinas de RDD (YU *et al.*, 1998; CANTOR *et al.*, 2001; KIM, HUANG, *et al.*, 2007).

O complexo B consiste em BRCA1, BACH1 e TOPBP1 (*topoisomerase (DNA) II binding protein 1*) (figura 1.2.2) e parece estar associado ao estresse replicativo que ocorre durante a fase S do ciclo celular. BACH1 é fosforilado no resíduo de serina 990 e então é reconhecido por BRCA1. O complexo B atua no ponto de checagem de G2/M responsivo ao dano de DNA, além de ser importante para as fases intra S e o ponto de checagem G1-S (HUEN *et al.*, 2010).

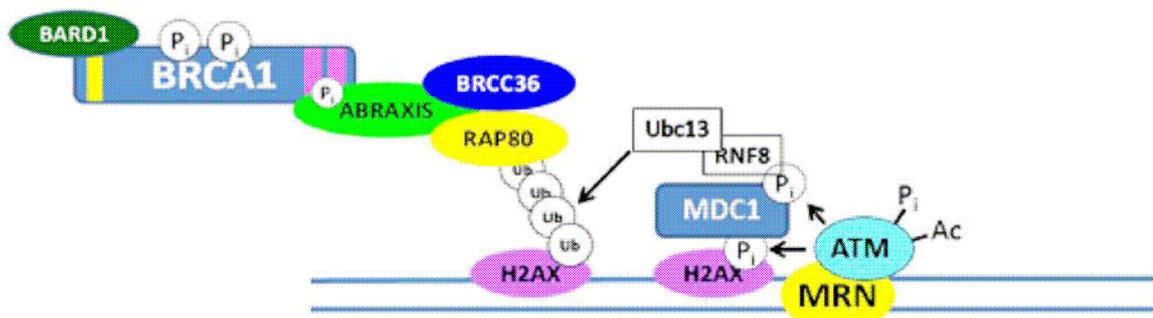


Figura 1.2.1. **Representação esquemática da via de RDD por recombinação homóloga.** Inicialmente, o complexo MRN é recrutado aos sítios de quebra de dupla fita e fosforilam a quinase ATM na serina 1981. ATM ativado, fosforila e recruta H2AX e MDC1 aos sítios de dano. MDC1 fosforilado é reconhecido pela E3 ubiquitina ligase RNF8 que é recrutado. RNF8, juntamente com E2 ubiquitina conjugase UBC13 inserem moléculas de ubiquitina em H2AX, formando cadeias poli-ubiquitinadas. H2AX ubiquitinada é reconhecida por RAP80, o que culmina no recrutamento de BRCA1 e formação do complexo A de BRCA1, contendo BARD1 ABRAXIS, BRCC36 e RAP80. Ub, ubiquitinação; Pi, fosforilação; Ac, acetilação. Adaptado de ROSEN, 2013.

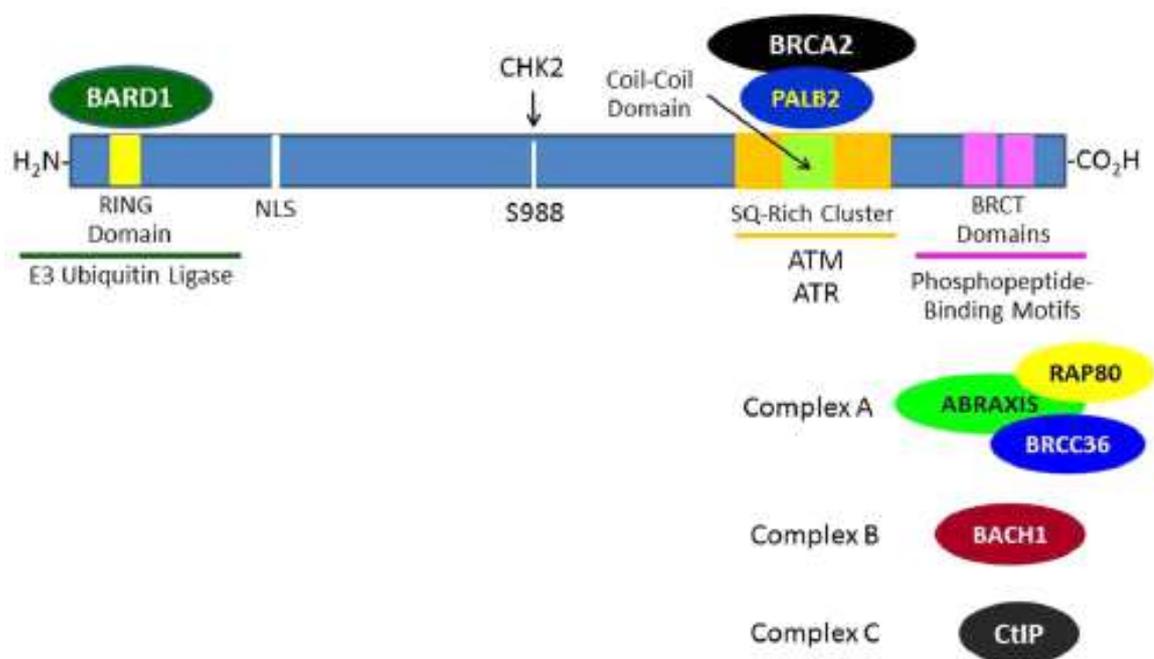


Figura 1.2.2. **Representação esquemática dos complexos de A, B e C de BRCA1.** A figura mostra os domínios de BRCA1 e as proteínas que interagem com os diferentes motivos de BRCA1. O domínio tBRCT é responsável pela interação com as proteínas ABRAXIS, BACH1 e CtIP de maneira mutuamente exclusiva de modo a formar os complexos A, B e C, respectivamente. Adaptado de ROSEN, 2013.

O complexo C é formado por BRCA1, CtIP e MRN (figura 1.2.2). BRCA1 reconhece, através de seus domínios BRCT, o resíduo fosforilado da serina 327 de CtIP e esse complexo é estimulado por MRE11 a realizar a ressecção das pontas das fitas de DNA geradas na quebra (revisado por WANG, 2012). Após a ressecção de pontas, ocorre o recrutamento de RPA (*replication protein A1, 70kDa*) para estabilização das regiões de DNA fita simples. Posteriormente, RAD51 (*RAD51 recombinase*) é recrutada para as regiões em que RPA está presente, num processo dependente de RAD54 (*RAD54-like (S. cerevisiae)*) e BRCA2 (o qual carrega várias cópias de RAD51) (GUDMUNDSDOTTIR e ASHWORTH, 2006). BRCA2, por sua vez, participa do mesmo complexo que PALB2 e BRCA1 (SY *et al.*, 2009; ZHANG, FAN, *et al.*, 2009; BUISSON e MASSON, 2012). A recombinase RAD51, recrutada pelo complexo BRCA1, PALB2 e BRCA2, é a proteína efetora da recombinação homóloga, estando envolvida nas etapas de conexão da fita de DNA lesionada com a fita da cromátide irmã que serve de molde para o reparo (KREJCI *et al.*, 2012).

1.3 BRCA1 (breast cancer 1, early onset)

1.3.1 Organização estrutural de BRCA1:

A análise da sequência de aminoácidos de BRCA1 revela a existências de vários motivos estruturais conservados entre os seus diferentes ortólogos (SZABO *et al.*, 2004). A proteína BRCA1 contém um domínio RING (*Really Interesting New Gene*) N-terminal bastante conservado e dois domínios BRCT em tandem em sua região C-terminal (figura 1.3.1.1) (ROY *et al.*, 2012). O domínio N-terminal de BRCA1 interage com BARD1 (WU *et al.*, 1996). Cerca de 80% do *pool* celular de BRCA1 encontra-se associado a BARD1 sob a forma de heterodímero (YU e BAER, 2000). O domínio RING de BRCA1 possui atividade E3 ubiquitina ligase que é potencializada pela interação com BARD1 (YU e BAER, 2000).

A ubiquitinação é um tipo de modificação pós-traducional na qual uma enzima E3 ligase insere resíduos de ubiquitina em seu substrato, podendo adicionar uma ou mesmo várias moléculas de ubiquitina (em cadeias lineares ou ramificadas). A ubiquitina possui sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63), é

inserida ao substrato da E3 ligase através de uma delas, e pode formar sete tipos distintos de cadeias de ubiquitina (PICKART, 2004).

A ligação do resíduo de glicina C-terminal de uma ubiquitina com a metionina N-terminal de outra ubiquitina dá origem a cadeias lineares de ubiquitina (IWAJ e TOKUNAGA, 2009). Enquanto cadeias de ubiquitina K11 e K48 sinalizam para proteólise via sistema proteassomal, cadeias ligadas por resíduo de lisinas 63 (K63) e cadeias lineares, bem como monoubiquitinação, regulam a formação de complexos proteicos (PICKART, 2004; PERRETT *et al.*, 2011) (figura 1.3.1.2).

Foi demonstrado que o dímero BRCA1-BARD1 é capaz de formar cadeias de ubiquitina do tipo K6 (utilizando UbcH5 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2D1*) como enzima E2 ubiquitina conjugase) *in vitro* e *in vivo* (utilizando modelos de superexpressão em células humanas) (WU-BAER *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2004; SATO *et al.*, 2004). As cadeias de ubiquitina ligadas pelo resíduo de K6 não são reconhecidas pelo proteassoma e parecem indicar outro tipo de sinalização, como a formação de complexos proteicos (OHTA, SATO *et al.*, 2011). O dímero BRCA1-BARD1 também é capaz de gerar *in vitro* cadeias de ubiquitina ligadas por resíduos de K48 e K63 através da combinação com as enzimas E2 UBE2K (*ubiquitin-conjugating enzyme E2K*) e UBE2N (*ubiquitin-conjugating enzyme E2N*) respectivamente (CHRISTENSEN *et al.*, 2007).

Os putativos substratos para ubiquitinação mediada pelo heterodímero confirmam a participação de BRCA1 em processos de regulação da transcrição, de controle de centrossomos e no RDD. Já foram identificados *in vitro* como substratos de BRCA1-BARD1 as formas fosforiladas da RNA polimerase II (KLEIMAN *et al.*, 2005), a γ -tubulina (STARITA *et al.*, 2004), assim como histona H2AX (CHEN *et al.*, 2002; KALB *et al.*, 2014) e a proteína associada ao RDD claspina (SATO *et al.*, 2012)

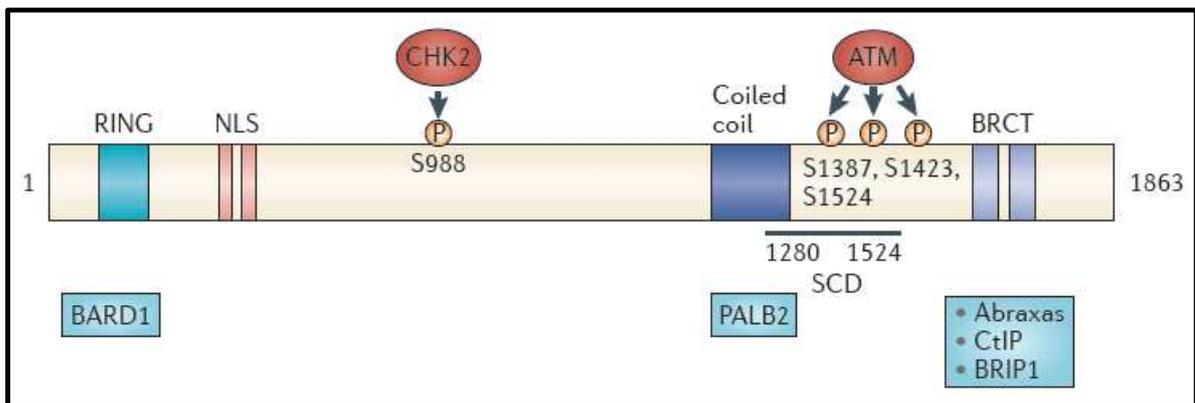


Figura 1.3.1.1. **Organização estrutural de BRCA1.** A região N-terminal de BRCA1 contém um domínio RING que se associa com BARD1 e contém um sinal de localização nuclear. A região central de BRCA1 contém um sítio de fosforilação por CHK2 no resíduo S988. A região C-terminal de BRCA1 contém: um domínio *coiled-coil* que interage com PALB2; um domínio SCD (*SQ/TQ cluster domain*) que contém aproximadamente 10 sítios de fosforilação por ATM e compreende os resíduos de aminoácidos 1280 a 1524; e domínio BRCT em tandem que interage com as proteínas fosforiladas por ATM: ABRAXAS, CtIP e BRIP1. O complexo BRCA1–ABRAXAS está associado ao recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA. O complexo BRCA1–BRIP1, que também contém TOPBP1 está associado ao reparo do DNA durante a replicação. O complexo BRCA1–CtIP promove a ativação de ATR e a recombinação homóloga através da associação com o complexo MRN (o qual é composto por MRE11, RAD50 e NBS1) além de facilitar a resecção de quebras de fitas duplas de DNA. A região central de BRCA1, na qual se encerra o SCD, é fosforilada por ATM. Essa fosforilação é importante para a ativação do ponto de checagem de G2/M e fase S do ciclo celular. Adaptado de ROY *et al.*, 2012.

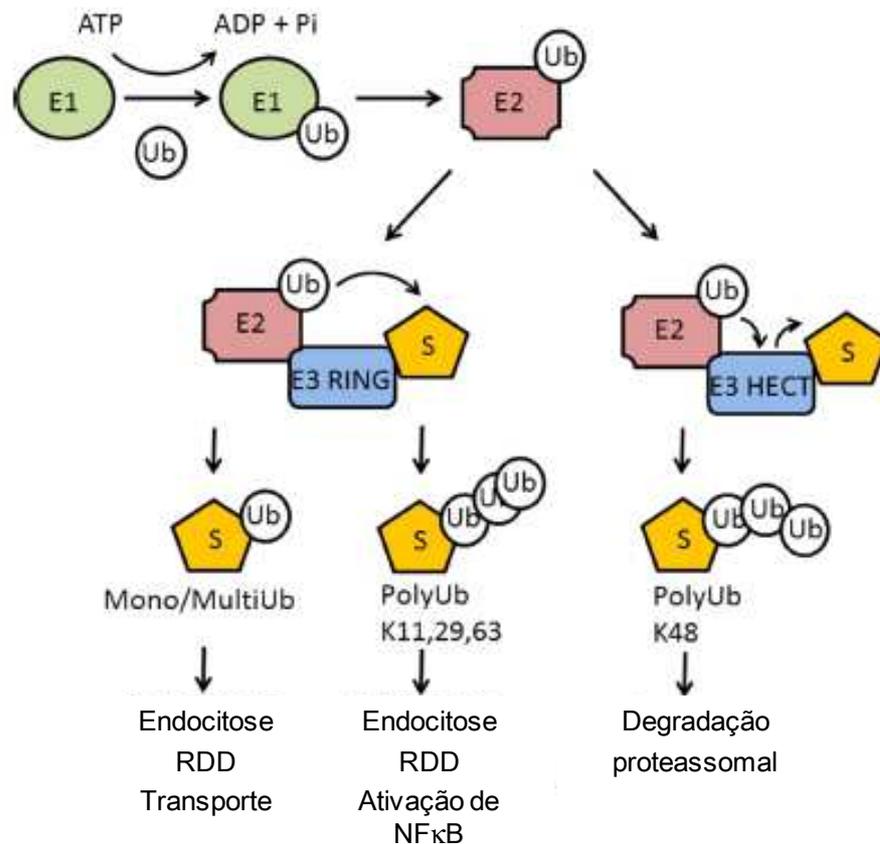


Figura 1.3.1.2. **Representação esquemática da via de ubiquitinação.** A molécula de ubiquitina (Ub) livre é ativada por uma enzima ativadora de ubiquitinas (E1) que se utiliza de um ATP para formar complexo com a ubiquitina. Esta então é transferida da E1 para uma enzima E2 ubiquitina conjugase. A E2 então se liga à enzima E3 ubiquitina ligase, a qual permite a polimerização de uma ou mais moléculas de ubiquitina na proteína substrato. A molécula de ubiquitina pode ser ligada ao substrato através de diferentes resíduos de lisina, que podem sinalizar a proteína alvo para degradação proteassomal (ubiquitinação do tipo K48) ou para outros processos bioquímicos como endocitose ou interações proteína-proteína (ubiquitinação do tipo K11, K29 ou K63). Adaptado de PERRETT *et al.*, 2011.

A porção central de BRCA1 encerra uma porção pouco conservada que separa os domínios RING e os domínios BRCT. Ela possui ainda uma região importante para a interação com diversas proteínas como, por exemplo, PALB2, em um complexo que contém também BRCA2, sendo assim, imprescindível para recombinação homóloga (ZHANG, MA, *et al.*, 2009).

Na região central também são identificados dois motivos que correspondem a sinais de localização nuclear (NLS; aa 500-508 e 609-615) (figura 1.3.1.1) (CHEN *et al.*, 1996), além de vários sítios fosforilados após o dano ao DNA (OUCHI, 2006).

A região C-terminal de BRCA1 (figura 1.3.1.1) contém dois domínios em tandem chamados de BRCTs. Os dois domínios BRCT em tandem (tBRCT) funcionam como um motivo único de reconhecimento de proteínas fosforiladas (MANKE *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2003) e está presente em uma gama de proteínas envolvida no RDD e controle de pontos de checagem do ciclo celular através de interações proteína-proteína. O tBRCT reconhece e interage com a sequência de aminoácidos pSPxF (Serina fosforilada, Prolina, qualquer resíduo de aminoácido, Fenilalanina) (BORK *et al.*, 1997; SCULLY *et al.*, 2004).

A região C-terminal de BRCA1 é tão importante para o exercício da função supressora de tumor que a deleção de apenas 11 aminoácidos na extremidade final da proteína é suficiente para conferir predisposição ao câncer (MONTEIRO *et al.*, 1997).

A concentração de resíduos acídicos na região C-terminal sugere a participação direta da região C-terminal de BRCA1 em processos de transcrição. Foi demonstrado que a região C-terminal de BRCA1, quando fusionada a um domínio heterólogo de ligação ao DNA, é capaz de ativar a expressão de um gene repórter (MONTEIRO *et al.*, 1996). Além disso, foi descrita a interação de BRCA1 e a holoenzima RNA Polimerase II (CHIBA e PARVIN, 2002), bem como sua interação com uma série de fatores de ativação transcricional, coativadores, correpressores, enzimas de remodelamento de cromatina e fatores de processamento de RNA (OUCHI *et al.*, 1998; HOUVRAS *et al.*, 2000; VIDARSSON *et al.*, 2002), cenário que deixou evidente a participação de BRCA1 em processos de transcrição.

1.3.2 BRCA1 e o controle do ciclo celular após o dano ao DNA

O ciclo celular divide-se em quatro fases principais G1 (início), S (síntese), G2 (preparação para a mitose) e M (mitose). A progressão do ciclo celular nas diferentes fases é finamente regulada por diversos pontos de checagem que monitoram vários parâmetros essenciais para que o resultado final da mitose seja finamente regulado. Além dos pontos de checagem que regulam a progressão natural do ciclo celular, existem também pontos de checagem responsivos ao dano ao DNA.

A literatura tem relacionado um papel de BRCA1 com o controle de pontos de checagem responsivo ao dano ao DNA. Esses pontos de checagem são ativados em resposta a lesões no DNA, como quebras de fita dupla de DNA e funcionam bloqueando a progressão do ciclo celular a fim de permitir o reparo das lesões e impedir que o dano seja propagado às células filhas (ROSEN, 2013).

Um dos pontos de checagem regulado por BRCA1 é o ponto de checagem G1/S induzido por dano por irradiação, o qual impede que as células com quebras cromossômicas passem para a fase S do ciclo. Nesse caso, ATM fosforila BRCA1 nos resíduos de serina 1.423 e de serina 1.524. BRCA1, quando fosforilado nesses resíduos citados, permite que ATM fosforile eficientemente p53 nos resíduos de serina 15, o que é importante para atividade transcricional de p53 e subsequente indução da expressão de *p21*. Nesse caso, o heterodímero BRCA1/BARD1 é necessário para a fosforilação de p53 por ATM e consequente arresto do ciclo em G1/S (FABBRO *et al.*, 2004).

Há também um ponto de checagem intra fase S induzido por dano ao DNA que pode resultar em inibição do início da replicação. Defeitos nesse ponto de controle podem resultar em síntese de DNA continuada, também chamada de síntese de DNA radorresistente. Nesse ponto de checagem, ATM fosforila BRCA1 no resíduo de serina 1.387 num processo que também depende de NBS1 (XU *et al.*, 2002).

Outro ponto de checagem controlado por BRCA1 é o da transição G2/M (XU *et al.*, 2001; YARDEN *et al.*, 2002; ROSEN, 2013). Nesse caso, BRCA1 regula a ativação de CHK1 (*checkpoint kinase 1*), um importante fator para o arresto em G2/M (YARDEN, PARDO-REOYO *et al.*, 2002). Tanto BRCA1 quanto ATM são

necessários para os pontos de checagem das fases S e G2 após o dano por irradiação, uma vez que a fosforilação de BRCA1 no resíduo de serina 1.423 promovida por ATM é necessária para o controle da fase G2 (XU *et al.*, 2001). Além disso, foi descrito que BRCA1 é importante para o ponto de checagem de G2 conhecido como ponto de decatenação (DEMING *et al.*, 2001). Esses pontos de checagem monitoram o status de enovelamento da cromatina e retardam a entrada da célula em mitose até que as cromátides estejam suficientemente desenoveladas (decatenadas) a fim de prevenir alterações cromossômicas que podem levar a aneuploidia ou poliploidia (ROSEN, 2013).

Além dos pontos de checagem responsivos ao dano de DNA, a literatura indica que BRCA1 também participa do controle do ponto de checagem do fuso mitótico através da regulação da expressão gênica associada à progressão ao longo da mitose (WANG *et al.*, 2004; BAE *et al.*, 2005). Nesse caso, defeitos em BRCA1 podem prejudicar a separação das cromátides irmãs e a citocinese, resultando no acúmulo de células multinucleadas. Além disso, foi descrito recentemente que a fosforilação de BRCA1 mediada por CHK2 é necessária para a formação ordenada do fuso mitótico e correta segregação dos cromossomos (STOLZ, ERTYCH e BASTIANS, 2010; STOLZ, ERTYCH, KIENITZ, *et al.*, 2010).

1.4 BARD1 (BRCA1-associated ring domain 1)

BARD1 foi primeiramente identificado como parceiro de interação de BRCA1 através de ensaio de dois híbridos em levedura (Y2H) utilizando como isca os 304 aminoácidos iniciais de BRCA1 (WU, WANG *et al.*, 1996). A sequência codificante de BARD1 é composta de 2.333 bases distribuídas em 11 éxons. A sequência proteica de BARD1 encerra 777 resíduos de aminoácidos que constituem uma proteína cujo peso molecular é de 87 kDa. Assim como BRCA1, BARD1 possui diversas funções relacionadas a vias de reparo de DNA e controle do ciclo celular.

A organização estrutural dos domínios de BARD1 assemelha-se muito a de BRCA1, uma vez que BARD1 também possui um domínio RING na porção N-terminal e dois domínios BRCT em tandem na região C-terminal. BARD1 possui

ainda três domínios de ankirina (*ANK repeats*) próximos do domínio RING (figura 1.4).

BARD1 e BRCA1 formam o heterodímero através da interação de seus domínios RING numa conformação que confere estabilidade a BRCA1 e é importante para sua localização subcelular, pois omite os sinais de exportação nuclear presentes em ambas as proteínas (FABBRO *et al.*, 2002).

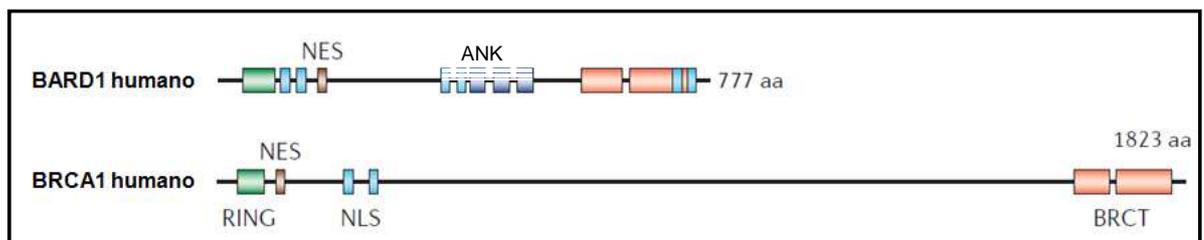


Figura 1.4: **Representação esquemática dos domínios estruturais de BRCA1 e BARD1 humanos.** Domínios estruturais de BARD1 em comparação à BRCA1: domínio RING (RING, caixas em verde), sinal de exportação nuclear (NES, caixas em marrom), sinal de localização nuclear (NLS, caixas em azul claro), repetições de anquirina (ANK, caixas em azul escuro) domínio tBRCT (caixas em vermelho). Adaptado de IRMINGER-FINGER & JEFFORD, 2006.

A relevância da atividade E3 ubiquitina ligase do dímero BRCA1-BARD1 para a função supressora de tumor também têm sido questionada, como se observa na literatura recente. Reid e cols. demonstraram que, células tronco embrionárias de camundongo produzindo o variante BRCA1 I26 (uma mutação que impede a ligação de BRCA1 com a enzima E2 ubiquitina conjugase, mas não a interação com BARD1) (BRZOVIC *et al.*, 2003), as células tronco embrionárias se mostraram resistentes ao estresse genotóxico, foram capazes de acumular RAD51 nos sítios de quebra de dupla fita de DNA e tiveram reparo de DNA nos mesmos níveis que as células nas quais é produzido BRCA1 selvagem (REID *et al.*, 2008).

Entretanto, a utilização de células tronco para avaliar impacto de alterações em vias de reparo de dano ao DNA pode ser questionada, uma vez que a capacidade das células tronco de reparar o DNA é muito superior a de células diferenciadas (TICHY e STAMBROOK, 2008; MANDAL *et al.*, 2011), visto que as células tronco proliferam rapidamente e produzem níveis muito maiores de RAD51 do que fibroblastos embrionários de camundongos (TICHY e STAMBROOK, 2008). Outro fator importante é que os níveis proteicos do variante BRCA1 I26A produzido nas células tronco são consideravelmente baixos, no entanto, as células continuam aptas para a recombinação homóloga (REID, SHAKYA *et al.*, 2008).

Foi reportado que a superexpressão de RAD51 em células DT40 silenciadas para BRCA1 recupera defeitos na proliferação, na sobrevivência após o dano ao DNA e recombinação homóloga (MARTIN *et al.*, 2007). Em conjunto, esses dados sugerem que a demanda por BRCA1 em células tronco poderia ser menor do que em células diferenciadas.

Outros dados que argumentam a favor da importância da atividade E3 ubiquitina ligase do dímero BRCA1-BARD1 são que as mutações na sequência que codifica para o domínio RING de BRCA1 e abolem a interação com enzimas E2 ubiquitina conjugases sem, contudo, perturbarem a ligação de BARD1 (incluindo as mutações T18M, T37R e H41R) (MORRIS *et al.*, 2006) quando investigadas em células HeLa, prejudicam substancialmente a capacidade de reparo por recombinação homóloga (RANSBURGH *et al.*, 2010).

Apesar de grande parte do conteúdo celular de BARD1 estar associado a BRCA1, foram descritas algumas funções de BARD1 independentes de sua interação com BRCA1.

BARD1 possui algumas isoformas geradas por processamento alternativo, dentre as quais a mais estudada é BARD1- β , que não contém o domínio RING e portanto não interage com BRCA1. BARD1- β é capaz de interagir diretamente com BRCA2 durante a mitose (RYSER *et al.*, 2009). Enquanto BARD1 interage e colocaliza com BRCA1 durante o início da mitose no fuso mitótico (HSU e WHITE, 1998), BARD1- β interage e colocaliza com BRCA2 antes da citocinese no centróssomo (RYSER, DIZIN *et al.*, 2009). Estudos de interação demonstraram que BARD1- β , mas não BRCA1, forma um complexo com BRCA2 e a quinase mitótica Aurora B no centróssomo e a depleção de BARD1- β gera um fenótipo semelhante à depleção de BRCA2 ou a superexpressão de Aurora B (RYSER, DIZIN *et al.*, 2009).

Outra função de BARD1 que independe de BRCA1 é a modulação da atividade transcricional de NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*), que ocorre quando BARD1 interage com BCL3 (*B-cell CLL/lymphoma 3*) através dos domínios de ankirina presentes em ambas as proteínas (DECHEND *et al.*, 1999). A importância da integridade deste domínio de BARD1, e provavelmente da interação com BCL3, pode ser comprovada pelo fato de mutações encontradas no resíduo de aminoácido Q564 de BARD1, responsável pela interação, serem observadas em tumores (IRMINGER-FINGER e LEUNG, 2002).

BARD1 parece estar envolvido com a apoptose de maneira dependente de sua localização subcelular. Quando não está interagindo com BRCA1, BARD1 é exportado para o citoplasma, atuando como uma proteína pró-apoptótica (JEFFORD *et al.*, 2004). Desta forma o desmembramento do heterodímero BRCA1-BARD1 aumenta a quantidade de BARD1 no citoplasma e inicia o processo de apoptose, como observado em células cuja expressão foi interferida para *BRCA1*. Este efeito, entretanto, é abolido em células que expressam formas inativas de p53 (RODRIGUEZ *et al.*, 2004), indicando que a atividade apoptótica de BARD1 depende de p53. Além disso, foi demonstrado que BARD1 interage fisicamente com p53 através de ensaio de coimunoprecipitação. A interação BARD1-p53 leva à estabilização de p53, uma vez que o aumento de BARD1, seja por estresse

genotóxico ou por produção ectópica, é acompanhado de um aumento nos níveis proteicos de p53 mas não de seu RNA mensageiro (IRMINGER-FINGER *et al.*, 2001). A importância de BARD1 para a apoptose pode ser corroborada pela resistência das linhagens celulares tumorais de ovário, previamente silenciadas para BARD1, à apoptose induzida por doxorubicina (IRMINGER-FINGER, LEUNG *et al.*, 2001).

1.5 Domínios BRCT em tandem (tBRCT).

O domínio BRCT foi descrito inicialmente na proteína supressora de tumor BRCA1. Mutações *missense* e mutações codificantes de variantes truncadas nessa região se correlacionam com aumento de risco para o câncer de mama e ovário, destacando sua importância para a função supressora de tumor de BRCA1 (FUTREAL *et al.*, 1994; MIKI, SWENSEN *et al.*, 1994). Subseqüentes análises por bioinformática revelaram que os domínios BRCT estão presentes em uma plêiade de proteínas, a maioria delas com funções no metabolismo e reparo do DNA (BORK, HOFMANN *et al.*, 1997; CALLEBAUT e MORNON, 1997).

A função conservada de ligação a fosfopeptídeos foi posteriormente identificada em BRCA1 e outras proteínas que contém domínios tBRCT ou mesmo no caso de domínios BRCT isolados (MANKE, LOWERY *et al.*, 2003; YU, CHINI *et al.*, 2003). Por exemplo, como citado anteriormente, os tBRCT de BRCA1 reconhecem o motivo peptídico fosforilado pSPxF em várias proteínas parceiras como BACH1 (BRZOVIC, KEEFFE *et al.*, 2003; MANKE, LOWERY *et al.*, 2003), CtIP (YU e CHEN, 2004) e Abraxas (KIM, HUANG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). A habilidade de BRCA1 em reconhecer diferentes parceiros de interação na resposta de dano ao DNA regula o recrutamento e função de BRCA1 nos sítios de dano.

Os domínios BRCTs têm sido descritos como capazes de mediar também interações proteicas independentes de fosforilação, ligação ao DNA e ligação à poli-(ADP-ribose). Essa diversidade pode ser atribuída não somente à variações na seqüência e estrutura mas também à habilidade de agrupar complexos multi-domínios com outros domínios BRCTs ou mesmo outros domínios funcionais

adicionando outro nível de complexidade, especificidade e regulação (LEUNG e GLOVER, 2011).

Estudos cristalográficos dos domínios tBRCT de BRCA1 demonstraram que as repetições de BRCT se enovelam de uma maneira singular (como um único domínio proteico), definida como essencial à sua atividade supressora de tumor (WILLIAMS *et al.*, 2001; MIRKOVIC *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2004; MESQUITA *et al.*, 2010). A estrutura globular do BRCT foi caracterizada primeiramente através de estudos cristalográficos da estrutura do BRCT N-terminal de XRCC1 (ZHANG *et al.*, 1998). A estrutura central é composta por 4 fitas β -pregueadas flanqueadas por uma única α -hélice (α_2) de um lado e duas α -hélice (α_1 e α_3) do lado oposto (figura 1.5). Esta conformação dos domínios BRCT de BRCA1 faz com que se forme um sulco em sua estrutura, região importante para o papel de ligação de fosfopeptídeos de BRCA1, maneira como é dada, por exemplo, sua interação com as proteínas CtIP e BACH1 (TISCHKOWITZ *et al.*, 2008).

Uma análise criteriosa, a partir dos dados disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), permite a identificação de, ao menos, 24 proteínas humanas que encerram o domínio BRCT como demonstrado por Mesquita *et. al* (MESQUITA, WOODS *et al.*, 2010). No genoma humano encontram-se identificadas proteínas que apresentam domínios tBRCT e, se não todos, uma porção significativa está relacionada à resposta ao dano de DNA (GRAWUNDER *et al.*, 1998; RAPPOLD *et al.*, 2001; GOLDBERG *et al.*, 2003; WESTERMARK *et al.*, 2003; JOWSEY *et al.*, 2004). Apesar da associação ao câncer não ter sido determinada de forma definitiva, muitas dessas proteínas parecem estar, de alguma forma, envolvidas no desenvolvimento de câncer de mama (DAPIC *et al.*, 2005).

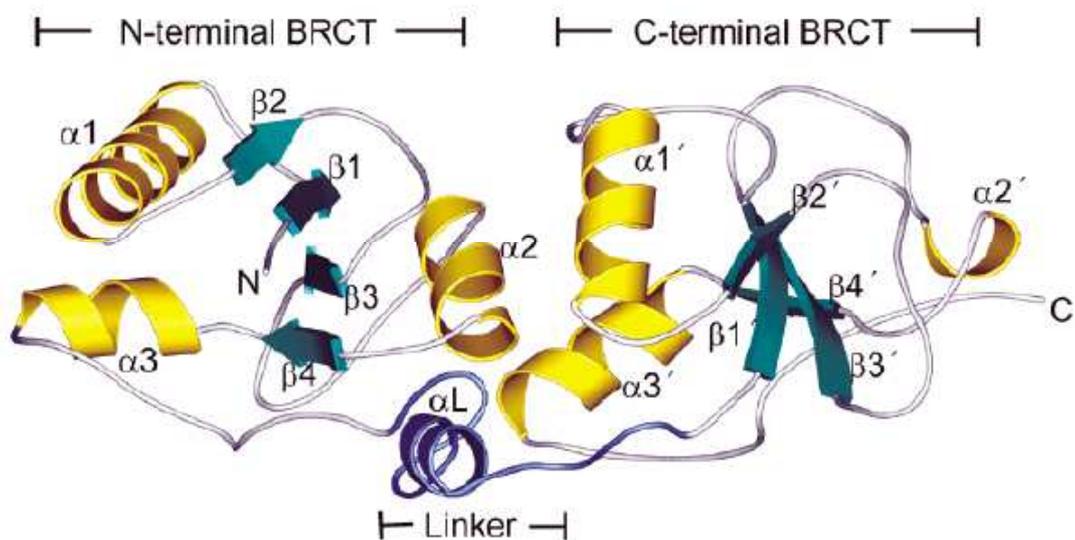


Figura 1.5. Estrutura dos domínios BRCT N-terminal e C-terminal de BRCA1 representados tridimensionalmente pelo modelo de fitas. O estudo cristalográfico foi realizado com a região C-terminal de BRCA1 compreendendo os aminoácidos 1646-1859. Representação dos domínios BRCT N-terminal e C-terminal de BRCA1. A região denominada “Linker” consiste na região de aminoácidos que conecta os domínios BRCT N-terminal e C-terminal de BRCA1. Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2001.

1.6 BCCIP (*BRCA2 and CDKN1A/p21 interacting protein*)

A proteína BCCIP (*BRCA2 and CDKN1A/p21 interacting protein*) foi originalmente descrita como uma proteína que interage com BRCA2 (LIU *et al.*, 2001) e p21 (ONO *et al.*, 2000). BCCIP possui duas isoformas geradas por processamento alternativo (*splicing*): BCCIP α (322 resíduos de aminoácidos) e BCCIP β (314 resíduos de aminoácidos) as quais diferem na porção C-terminal, mais especificamente a partir do resíduo de aminoácido 258 (figura 1.6).

Estruturalmente, BCCIP possui uma região N-terminal acídica (NAD), um domínio interno conservado entre diferentes espécies (ICD) e uma região C-terminal variável entre as espécies (CVD) (figura 1.6). A região central de BCCIP possui um sinal de localização nuclear. Além disso, a porção N-terminal do domínio ICD possui aproximadamente 50% de similaridade com os domínios de ligação ao cálcio das proteínas calmodulina e M-calpaína, sugerindo uma possível regulação pelo cálcio intracelular (LIU, YUAN *et al.*, 2001).

Ambas isoformas de BCCIP são capazes de interagir com BRCA2 através de sua região N-terminal e participar do mecanismo de reparo de dano ao DNA por recombinação homóloga (LU *et al.*, 2005). No contexto de reparo de dano, BCCIP também pode participar do mesmo complexo proteico que a recombinase RAD51 (LIU, YUAN *et al.*, 2001; LU, GUO *et al.*, 2005). Além disso, foi descrito que células deficientes para BCCIP apresentam uma diminuição na formação de focos de BRCA2 e RAD51 após o dano por irradiação (LU, GUO *et al.*, 2005). É importante ressaltar que BRCA2 é descrito em complexos funcionais junto com BRCA1 (ZHANG, MA *et al.*, 2009).

A produção ectópica de BCCIP inibe a proliferação das linhagens tumorais de mama MCF-7 e glioblastoma A172 (LIU, YUAN *et al.*, 2001).

Células silenciadas para BCCIP apresentam instabilidade genômica, uma vez que acumulam quebra de fitas duplas de DNA espontaneamente e apresentaram hiperploídia (LU *et al.*, 2007). É razoável sugerir que BCCIP também é importante para o controle do ciclo celular, pois regula a transcrição de p21, de modo dependente de p53, (MENG, LU, *et al.*, 2004) além da localização nuclear de p21 (FAN *et al.*, 2009). BCCIP também regula a transição G1/S do ciclo celular por

potencializar a inibição da atividade de CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*) por p21 (ONO, KITaura *et al.*, 2000).

Recentemente, foi desenvolvido um modelo de camundongos deficientes para *BCCIP* (LU *et al.*, 2011). Os camundongos deficientes em *BCCIP* foram inviáveis, apresentando letalidade embrionária. A análise dos fibroblastos embrionários mostrou alterações cromossômicas espontâneas associadas ao estresse replicativo. Além disso, foi demonstrado que fibroblastos embrionários de camundongos deficientes em *BCCIP* apresentaram ativação espontânea de p53 e p21 (LU, HUANG *et al.*, 2011).

Num experimento utilizando shRNA para silenciamento condicional de *BCCIP* em células progenitoras neuronais e gliais, os camundongos deficientes em *BCCIP* apresentaram microcefalia, sugerindo a importância de *BCCIP* para o desenvolvimento neural. Além disso, as células da glia no camundongo deficiente adulto possuem alterações na proliferação, ativação espontânea de γ -H2AX e ativação espontânea da apoptose (HUANG *et al.*, 2012).

Recentemente, o mesmo modelo de silenciamento condicional de *BCCIP* em células precursoras neuronais e gliais foi utilizado pra demonstrar o papel de *BCCIP* como supressor de tumor (HUANG *et al.*, 2013). No modelo de silenciamento condicional de *BCCIP* em células neuronais e gliais, os camundongos deficientes em *BCCIP* apresentaram microcefalia (HUANG, LU *et al.*, 2012), no entanto ao silenciar simultaneamente a proteína p53, o desenvolvimento encefálico dos camundongos era adequado. Entretanto, nesse caso, os camundongos silenciados para *BCCIP* e p53 desenvolvem tumores do tipo meduloblastomas, sugerindo que *BCCIP* possa atuar como supressor de tumor. Curiosamente, nos meduloblastomas de camundongos com mais de três meses de vida, o cassete de silenciamento de *BCCIP* foi perdido e a expressão de *BCCIP* foi restaurada, o que pode significar que *BCCIP* possa ser importante para a progressão tumoral, uma vez estabelecido o tumor. A hipótese sugerida é a de que *BCCIP* atuaria como supressor da iniciação do tumor, mas seria necessário para a progressão tumoral (HUANG, DAI *et al.*, 2013).

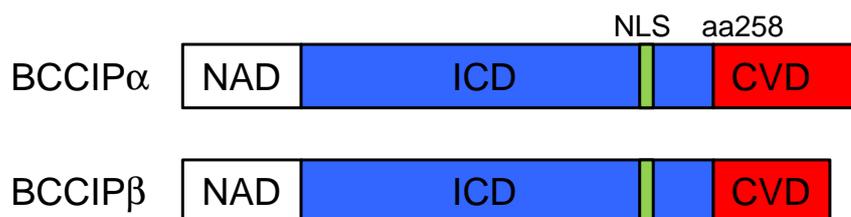


Figura 1.6: **Representação esquemática da estrutura de BCCIP α e BCCIP β .** As isoformas alfa e beta de BCCIP comungam dos 258 resíduos de aminoácidos iniciais que encerram os domínios NAD e ICD, diferindo no domínio CVD. BCCIP α contém 322 resíduos de aminoácidos e BCCIP β contém 314 resíduos de aminoácidos. NAD, domínio N-terminal ácido; ICD, domínio interno conservado; CVD, domínio C-terminal variável.

2 Objetivo geral:

Analisar o papel de BCCIP na via de reparo de dano ao DNA.

3 Objetivos específicos:

1. Avaliar a participação de BCCIP em complexos proteicos com BARD1 em células humanas.
2. Avaliar a participação de BCCIP em complexos proteicos com BRCA1 em células humanas.
3. Avaliar putativas modificações pós traducionais de BCCIP em células humanas.
4. Avaliar o papel de BCCIP nos estágios iniciais da via de reparo de dano ao DNA induzido por irradiação.
5. Avaliar o papel de BCCIP no arresto do ciclo celular induzido por dano ao DNA por irradiação.
6. Identificar proteínas de interação com BCCIP através de purificação de afinidade sequencial seguida de espectrometria de massas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Construções plasmidiais de BCCIP

4.1.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

A partir de amostra de sangue periférico de um doador sadio, foi isolada a fração de células mononucleares em coluna de fracionamento de *Histopaque 1077* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*), conforme instruções do fabricante. A extração de RNA total da fração de células mononucleares foi conduzida utilizando o reagente *Trizol* (*Invitrogen, Carlsbad, EUA*) conforme as especificações do fabricante. Resumidamente, as células mononucleares isoladas de sangue periférico foram ressuspensas em *Trizol*, adicionadas de clorofórmio, homogeneizadas apropriadamente, incubadas por 5 minutos (min) à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000xg por 5min à 4°C, resultando na separação da mistura em 3 fases: uma inferior, vermelha, contendo fenol e clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior contendo o RNA total. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente com o auxílio de pipeta e transferida para outro tubo de 1,5 mililitros (mL). Posteriormente, foi adicionado isopropanol à fase aquosa a fim de isolar o RNA total por precipitação. A mistura então foi incubada à temperatura ambiente por 10min e centrifugada a 12000xg por 10min à 4°C. O *pellet* de RNA obtido foi lavado com etanol 75%, centrifugado e resuspenso em H₂O livre de RNase. O RNA foi então quantificado utilizando-se espectrofotômetro *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA*) e armazenado em freezer a -80°C.

A partir do RNA total de células mononucleares humanas foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) utilizando-se o sistema *Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase* e oligo dT (ambos *Invitrogen*) como iniciador em termociclador *Verity* (*Life Technologies, Carlsbad, EUA*), seguindo especificações do fabricante.

4.1.2 PCR e clonagem de inserto em vetor:

A sequência codificante completa de BCCIP foi obtida através rotina de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SAIKI *et al.*, 1988) utilizando-se o cDNA de células mononucleares humanas como molde, oligonucleotídeos iniciadores específicos (ver tabela 4.1.2) e uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Pfx50 DNA Polymerase*) (*Invitrogen*), segundo especificações do fabricante. O programa de termociclagem utilizado foi definido com uma etapa de desnaturação inicial de 5min a 94°C, seguida por 30 ciclos de contendo um passo de desnaturação de 30s a 94°C, um passo de anelamento de 30 s a 63°C e um passo de extensão de 1min a 72°C e por fim uma etapa de extensão de 5min a 72°C. O produto amplificado, bem como o plasmídeo pEGFP-C3 (*Clontech Laboratories, Mountain View, EUA*), foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (*New England Biolabs, Ipswich, EUA*) e purificados utilizando-se o sistema *GFX PCR DNA and Gel Purification Kit* (*GE Healthcare, Pittsburgh, EUA*) de acordo com especificações do fabricante. Os produtos purificados foram utilizados em uma reação de ligação utilizando enzima *T4 DNA Ligase* (*New England Biolabs*) em temperatura ambiente por 16h. Dessa forma, o inserto BCCIP cadeia completa foi direcionalmente clonado no vetor pEGFP no mesmo quadro de leitura com a proteína verde fluorescente (GFP), gerando a construção pEGFP-BCCIP, que codifica para a produção da proteína quimérica GFP-BCCIP (figura 4.1.2, painel A).

Posteriormente foi realizada outra rotina de PCR utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificação da cadeia completa de BCCIP, utilizando o programa de termociclagem já descrito. O produto amplificado e o vetor pCMV-Flag (*Sigma-Aldrich*) foram digeridos com enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall* (*New England Biolabs*) e purificados utilizando-se o sistema *GFX PCR DNA and Gel Purification Kit* (*GE Healthcare*) de acordo com especificações do fabricante. Os produtos purificados foram utilizados em uma reação de ligação utilizando enzima *T4 DNA Ligase* (*New England Biolabs*) em temperatura ambiente por 16h. Dessa forma, o inserto BCCIP cadeia completa foi direcionalmente clonado no vetor pCMV-Flag no mesmo quadro de leitura com o epítipo de marcação Flag, gerando a construção pFlag-BCCIP, que codifica para a produção da proteína de fusão Flag-BCCIP (figura 4.1.2, painel B). O mesmo procedimento foi realizado para clonar

direcionalmente a sequência codificante de BCCIP nos sítios de clonagem *EcoRI* e *Sall* do vetor pNTAPA (*Agilent Technologies, Santa Clara, EUA*), assim gerando o vetor pNTAP-BCCIP para produção da proteína de fusão CBP-SBP-BCCIP (figura 4.1.3, painel A). Foi gerada também a construção pNTAP-GAL4DBD (figura 4.1.3, painel B), através da subclonagem direcional da sequência que codifica para o domínio GAL4 de ligação ao DNA (DBD) de pGBT9 (*Clontech Laboratories*) nos sítios *HindIII* e *Sall* no vetor pNTAPA, a ser usado como controle negativo. As construções geradas foram confirmadas por sequenciamento automático como descrito no item 4.3.

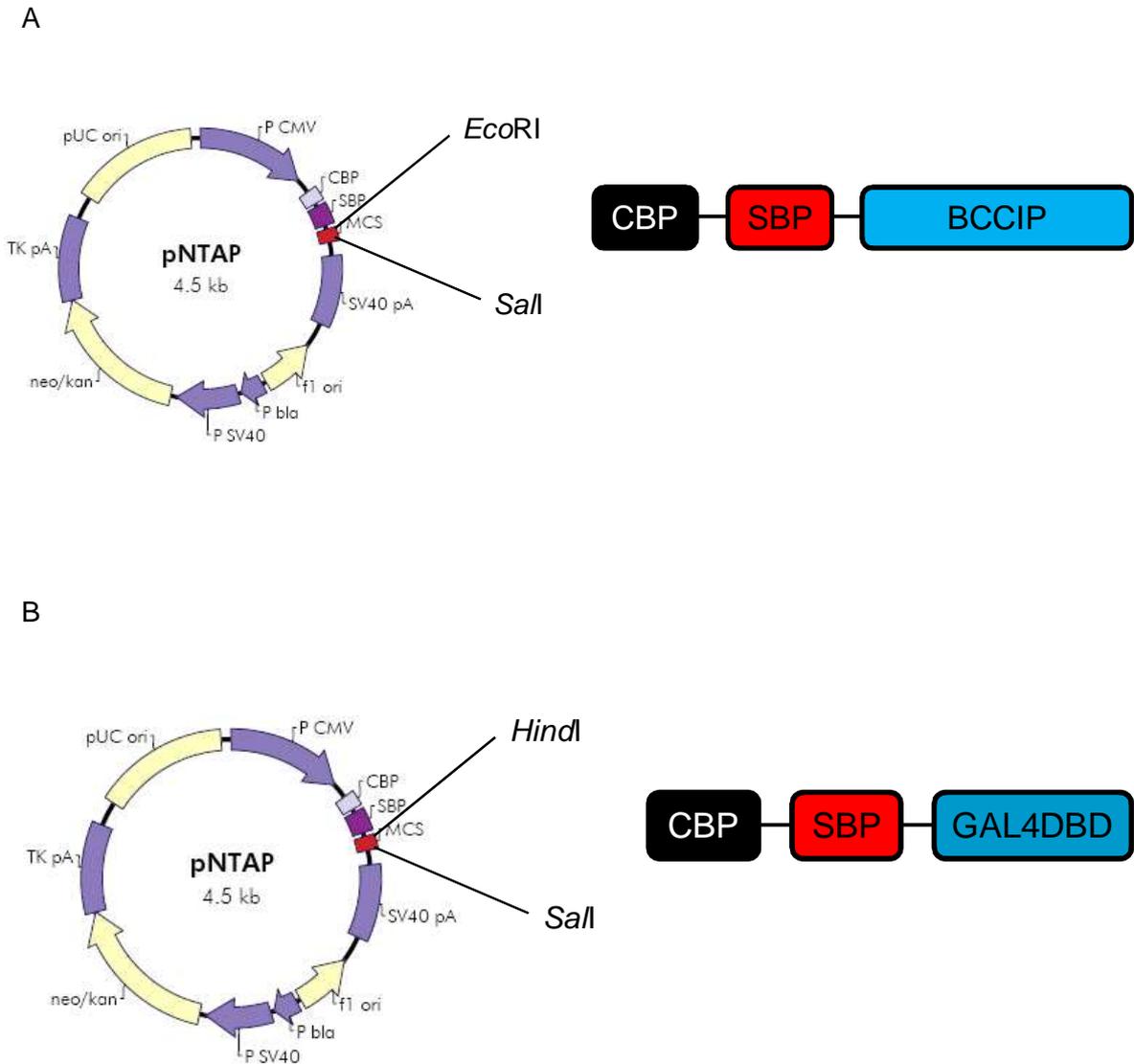


Figura 4.1.3. Representação esquemática dos vetores utilizados na geração das construções pNTAP-BCCIP, pNTAP-GAL4DBD e das proteínas de fusão derivadas CBP-SBP-BCCIP e CBP-SBP-GAL4DBD. **A.** A cadeia completa de BCCIP foi clonada direcionalmente no vetor pNTAPA nos sítios *EcoRI/SalI* dando origem à construção pNTAP-BCCIP. **B.** A sequência que codifica para o domínio GAL4 de ligação ao DNA (GAL4DBD) foi clonada direcionalmente no vetor pNTAPA nos sítios *HindI/SalI* dando origem à construção pNTAP-GAL4DBD.

Tabela 4.1.2: Lista de oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores utilizados

Oligonucleotídeos	Sequência 5'→3'
BCCIP Fw <i>Xho</i>I	AACTCGAGATGGCGTCCAGGTCTAAG
BCCIP Rv <i>Eco</i>RI	CTGAATTCTTATGACAGAGCAATTCCAAC
BCCIP Fw <i>Eco</i>RI	AAGAATTCATGGCGTCCAGGTCTAAG
BCCIP Rv <i>Sal</i>I	CTGTGCACTTATGACAGAGCAATTCCAAC
BCCIP NTAP Fw <i>Eco</i>RI	AAGAATTCAATGGCGTCCAGGTCTAAG

4.2 Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmidial

A transformação de bactérias usando as construções plasmidiais foi realizada através de rotina de eletroporação (NEUMANN *et al.*, 1982). Bactérias eletrocompetentes foram obtidas conforme previamente descrito (MILLER e NICKOLOFF, 1995). Resumidamente, bactérias *E.coli* da cepa DH5 α foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani; peptona 1%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5%) (BERTANI, 1951) até fase logarítmica de crescimento; as bactérias foram recuperadas e lavadas sucessivamente com água e glicerol 10% v/v, ambos gelados; as bactérias foram estocadas a -80°C.

Para a transformação, as bactérias eletrocompetentes foram incubadas com o DNA plasmidial (previamente dessalinizado) em banho de gelo, transferidas para uma cubeta própria e submetidas a um pulso elétrico rápido de 1.8 kV em eletroporador MicroPulser (*BIO-RAD, Hercules, EUA*). As bactérias foram, então, recuperadas em meio LB a 37°C sob agitação; posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (30 μ g/mL).

A extração do DNA plasmidial foi conduzida pelo método de lise alcalina como descrito previamente (ENGBRECHT *et al.*, 2001). Resumidamente, as células foram ressuspensas em tampão GTE (Glicose 50mM, Tris-Cl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM), lisadas em solução de hidróxido de sódio/SDS (NaOH 0.2M, SDS 1% p/v) e neutralizadas em tampão de acetato de potássio (ácido acético glacial 29,5 mL, pedras de KOH até pH 4,8, H₂O para 100mL). O material foi desproteínizado com tratamento com mistura de fenol/clorofórmio e precipitado em isopropanol.

Para rotinas de transfecção em linhagens humanas, a extração de DNA plasmidial foi conduzida usando o sistema *QIAprep Spin Miniprep* (*QIAGEN, Hiden, Alemanha*), segundo instruções do fabricante.

4.3 Sequenciamento

As construções geradas foram confirmadas através de rotinas de sequenciamento automático utilizando-se o kit *BigDye Terminator* (*Life*

Technologies), segundo instruções do fabricante, e utilizando-se os *primers* listados na Tabela 4.1.2. A análise dos produtos da rotina de sequenciamento foi conduzida em sequenciador *Applied Biosystems 3130xl (Life Technologies)* e foi realizada em colaboração com a Divisão de Genética do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.

4.4 Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares tumorais derivadas de mama MDA-MB-231 (adenocarcinoma metastático) (disponibilizada gentilmente pela Dra. Patricia Zancan - UFRJ), MCF-7 (adenocarcinoma), T47D (carcinoma ductal) (gentilmente doadas pela Dra Maria Isabel Rossi – PCM/UFRJ), HCC1937 (carcinoma ductal), SUM1315 (carcinoma ductal) (generosamente doadas por Dr. Alvaro Monteiro do Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, EUA), de ovário, ES2 (adenocarcinoma de células claras), TOV-21G (adenocarcinoma de células claras), A2780 e ACRP (adenocarcinoma seroso) (disponibilizadas generosamente pela Dra. Letícia Rangel da UFES, Vitória, ES), além da linhagem imortalizada de rim de embrião humano HEK293FT foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*GIBCO/ Invitrogen, Carlsbad, EUA*) suplementado com penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino (*GIBCO/ Invitrogen*) utilizando estufa úmida à 37°C em atmosfera de CO₂. A linhagem imortalizada de mama MCF10A (epitélio mamário cistofibroso imortalizado) (também disponibilizada pela Dra. Patricia Zancan - UFRJ) foi cultivada em meio RPMI suplementado com penicilina/estreptomicina (*GIBCO/ Invitrogen*), soro fetal equino e toxina botulínica também em estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O subcultivo das linhagens foi realizado a cada 48-72h, quando as culturas apresentavam de 70-90% de confluência da área cultivada, através de dissociação enzimática com solução de tripsina 0,25% p/v e EDTA 0.01% p/v (ambos Sigma).

4.5 Transfecção de linhagens celulares humanas

A transfecção de células humanas com as construções plasmidiais foi realizada através do uso do reagente de base lipídica *X-tremeGENE 9 DNA Transfection*

Reagent (Roche, Indianapolis, EUA) segundo instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram mantidas em cultura conforme descrito no item 4.4. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com a mistura de transfecção composta pelas construções plasmidiais, *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* (Roche) e meio de cultura sem soro. A mistura de transfecção foi previamente incubada a temperatura ambiente por 15min, quando então foi gotejada sobre a cultura celular. Após 24-36h, as células foram processadas para obtenção dos extratos proteicos.

4.6 Extração de proteínas de células humanas

Para obtenção dos extratos proteicos totais, as células foram recolhidas, lavadas com PBS, ressuspensas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, dodecil sulfato de sódio 0,1%, Triton X-100 1%, desoxicolato de sódio 0,1%) contendo coquetel de inibidores de protease (*Sigma-Aldrich*) e mantidas no banho de gelo por 30min, sendo, então, centrifugadas a 12.000xg por 15min à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -80°C.

Para obtenção de extratos de proteínas nucleares, citoplasmáticas e de proteínas ligadas à cromatina, as culturas foram lavadas com PBS e centrifugadas como anteriormente descrito. As células foram ressuspensas em tampão de extração de fração citoplasmática (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 0,5% glicerol, 10mM KCl, 0,1% NP40, 5mM EDTA, 2,5mM β -mercapto-etanol e coquetel com inibidores de protease), incubadas no banho de gelo por 5min e centrifugadas a 12.000xg por 5min, sendo recolhido os sobrenadantes, que correspondem às frações citoplasmáticas e armazenados a -80°C. Os *pellets* então foram ressuspensos no tampão de extração de fração nuclear (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 0,5% glicerol, 10mM KCl, 5mM EDTA, 2,5mM β -mercapto-etanol, 40mM de NaCl e coquetel com inibidores de protease), incubados em banho de gelo por 30min, centrifugados a 12.000xg por 15min e os sobrenadantes correspondentes às frações nucleares recolhidas e armazenadas a -80°C. Para extração da fração proteica ligada à cromatina, os *pellets* foram ressuspensos em tampão de extração ácida (500mM

HCl, 10% Glicerol, 100mM β -mercapto-etanol), homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 2min, sendo posteriormente centrifugados à 12.000xg por 5min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram recolhidos, acrescidos de tampão de neutralização (40mM Tris pH7,4; 500mM NaOH, coquetel com inibidores de protease) e armazenados à -80°C.

A concentração de proteínas nos extratos proteicos totais e fracionados foi determinada através de ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.7 Western blotting e imunodeteção

A análise da produção das proteínas ectópicas e constitutivas foi feita por *Western blotting* seguida de imunodeteção (BURNETTE, 1981). Os extratos celulares totais, citoplasmáticos, nucleares e de proteínas ligadas à cromatina foram resolvidos por *SDS-PAGE* (*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*) e eletro-transferidos para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (*Amersham Biosciences, Piscataway, EUA*), usando o sistema *Trans-Blot Semidry* (*BIORAD*), segundo especificações do fabricante. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% (p/v) em TBS-Tween (TBS: Tris 50mM, NaCl 150mM; Tween: 0,1%), sob agitação, por 1h à 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos (conforme tabela 4.7) diluídos em TBS-Tween contendo leite desnatado 0,5%(p/v). A membrana foi, então, incubada com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho sc-2005; ambos *Santa Cruz* (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA*) e posteriormente a membrana foi revelada com o sistema *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents* (*Amersham Biosciences*) e exposta ao filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (*Amersham Biosciences*).

Tabela 4.7: Lista de anticorpos primários utilizados.

Anticorpo	Fabricante	Código	Utilização
anti-GFP	Millipore	MAB3580	Wb, IP
anti-BCCIP policlonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-130898	Wb, IP
anti-BCCIP monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-136104	Wb, IP
anti-BARD1	Bethyl Laboratories	BL518	Wb, IP
anti-BRCA1	Santa Cruz Biotechnology	sc-642	Wb, IP
anti-fosfo-ATM	Cell Signaling	5883	Wb
anti-Flag	Sigma-aldrich	F1804	Wb, IP
anti-HA-probe	Santa Cruz Biotechnology	sc-805	Wb, IP
anti-HSC70	Santa Cruz Biotechnology	sc-1059	Wb
anti-ubiquitina	Dako	Z0458	Wb, IP

Wb: *Western blotting*, IP: imunoprecipitação

4.8 Ensaio de pull-down

Para expressão proteica condicional das proteínas de fusão bactérias *E.coli* BL21 previamente transformadas com as construções pGEX-BARD1FL, pGEX-BARD1NT, pGEX-BARD1CT (previamente gerado pelo grupo) (figura 4.8) ou vetor pGEX-6P1 (GE) foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina (10µg/mL) sob agitação em estufa 37°C até a fase logarítmica de crescimento, avaliada pela D.O. que deveria encontrar-se entre 0,4 e 0,6 à 600nm. Posteriormente, foi adicionado 0,5mM de IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) à suspensão e o sistema foi incubado em estufa à 30°C, sob agitação lenta, por 4hs para produção das proteínas recombinantes. Após a indução, a suspensão de bactérias foi centrifugada, ressuspensa em tampão de lise (20mM Tris pH 7,5, lisozima à 1mg/mL, DNase à 1µg/mL e Triton X100 à 0,1%) e incubada a 37°C por 1h. Posteriormente o extrato foi sonicado (sonicador modelo *Autotune Series High intensity ultrasonic processor - 100/130 watt, Sonics & Materials, Newtown, EUA*) em ciclos curtos de 15s. Em seguida o material sonicado foi centrifugado (modelo *Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg, Alemanha*) a 12.000xg por 30min à 4°C e o sobrenadante filtrado em membrana 0.22µm. O material foi submetido a rotinas de *Western blotting* e imunodeteccção para avaliação das proteínas fusionadas ao GST.

Para o ensaio de *pull-down*, foi utilizada a resina *Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)* conforme instruções do fabricante. Resumidamente, a resina foi lavada com PBS, adicionada ao extrato lisado total de bactérias (transformadas com a construção pGEX-BARD1) na presença de coquetel com inibidores de protease, e incubados à temperatura ambiente. Posteriormente o material foi lavado com tampão PBS modificado (PBS, 2,5mM DTT, 100mM NaCl e 0,1% Triton x100 e inibidor de protease). À resina conjugada com GST ou GST-BARD1 foi adicionado o extrato de células HEK293FT transfectadas por 24h com pEGFP-BCCIP na presença do tampão de incubação (PBS, 5mM DTT, 100mM NaCl e 0,1% Triton x100, coquetel inibidor de protease) e deixados sob agitação à 4°C por 16hs. Posteriormente, o material foi lavado com o mesmo tampão de incubação, centrifugado à 4.000xg por 5min e o pellet analisado através de *Western blotting* seguido de imunodeteccção.

4.9 Ensaio de coimunoprecipitação de proteínas

Para rotinas de coimunoprecipitação, foram utilizados extratos proteicos totais ou nucleares obtidos conforme descrito no item 4.6, na presença de esferas de agarose *Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent* (Santa Cruz Biotechnology), de anticorpos primários, coquetel com inibidores de protease e tampão RIPA sob agitação à 4°C por 16h. Posteriormente, a resina juntamente com os complexos proteicos foram lavados com tampão RIPA por 10min à 4°C sob agitação e centrifugados a 1.000xg por 5min à 4°C. Essa etapa de lavagem foi repetida 3 vezes, depois, a resina lavada contendo os complexos proteicos foi ressuspensa em tampão de Laemmli (BURNETTE, 1981) e recuperada para análise por Western *blotting* seguido de imunodeteção conforme descrito no item 4.7.

4.10 Silenciamento da expressão gênica de BCCIP

4.10.1 Geração de partículas lentivirais

Partículas lentivirais contendo as construções pLKO1 shBCCIP (Openbiosystems, Lafayette, EUA) contendo a sequência para RNA do tipo *short hairpin* (shRNA) contra os transcritos de BCCIP ou pLKO1 shScramble (Openbiosystems) contendo a sequência codificante para shRNA contra sequência não relacionada utilizada como controle negativo (scramble, SCR) (OpenBiosystems) foram geradas através de transfecção de células HEK293FT. Resumidamente, nas rotinas de transfecção, foram utilizadas misturas contendo as construções pLKO1 shBCCIP ou pLKO1 shSCR, em conjunto com as construções pLP1, pLP2 e pLP/VSVG do kit de produção de partículas lentivirais Virapower (*Invitrogen*). Após 48h da transfecção, o meio de cultura contendo as partículas virais foi coletado e filtrado com filtro de poro 0,45 µm (*Millipore*).

4.10.2 Transdução viral

O meio de cultura contendo partículas lentivirais obtido foi imediatamente suplementado com 6µg/mL de brometo de hexadimetrina (*Polybrene, Sigma*). A mistura foi transferida para cultura de células ES2 apresentando confluência da área de cultura entre 80-90%. As células foram incubadas por 24h conforme descrito no item 4.4.

Após este período, o meio das culturas foi repostado com meio fresco na presença de 2 µg/ml de puromicina (*Invitrogen*). Paralelamente, foi realizado o mesmo procedimento com uma cultura de células ES2 não transduzidas. As culturas foram mantidas sob pressão seletiva de puromicina, com reposição periódica do meio de cultura, até a morte de toda a população de células não transduzidas.

A produção de BCCIP nas linhagens transduzidas foi verificada através de ensaio de Western *blotting* seguido de imunodeteção conforme descrito anteriormente.

4.11 Ensaio de análise do ciclo celular induzido por dano ao DNA

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células das linhagens ES2 por placa de 35mm e incubadas conforme descrito no item 4.4. Cerca de 16h depois, as células foram submetidas à radiação ionizante de 2 ou 10Gy, tripsinizadas, centrifugadas, lavadas em PBS e posteriormente ressuspensas em etanol 70% pra fixação em diferentes tempos após a irradiação, sendo armazenadas à -20°C. Posteriormente, as células fixadas foram centrifugadas a 3000xg por 5min a 4°C, descartado o etanol e ressuspensas em tampão PI (40µg/mL de iodeto de propídeo, 100µg/mL de RNase A em tampão PBS). Depois disso, as células foram incubadas por 30min ao abrigo da luz e analisadas por citometria de fluxo em citômetro *Accuri C6 (BD Biosciences, Mississauga, Canadá)* quanto ao seu conteúdo de DNA e a fim de acompanhar possíveis alterações no ciclo celular após o dano por irradiação. Os dados foram analisados através do programa *Cflow Plus (BD Biosciences)*.

4.12 Purificação de proteínas por afinidade sequencial (*Tanden Affinity Purification, TAP*)

Células HEK293FT foram transfectadas, conforme descrito no item 4.5, com as construções pNTAP-BCCIP FL (Figura 4.1.3, painel A) ou pNTAP-GAL4DBD (Figura 4.1.3, painel B), contendo a sequência de cDNA referente domínio de ligação ao DNA de GAL4, que codifica a produção da proteína de fusão CBP-SBP-GAL4.

Após incubação por 36h de cultura, como descrito no item 4.4, os extratos proteicos totais das células foram obtidos utilizando Tampão NETN (Nonidet P40 0,5% v/v, Tris pH8,0 20 mM, NaCl 50 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100 mM, DTT 1mM, PMSF 50 µg/ml, todos reagentes *Sigma*) suplementado com coquetel de inibidores de protease (*Sigma*). As suspensões celulares foram submetidas a 3 ciclos sucessivos de congelamento a -80°C e descongelamento em banho de gelo. Os lisados foram centrifugados a 12.000xg em centrífuga refrigerada por 10min. Os sobrenadantes foram submetidos a rotinas de purificação por afinidade sequencial, utilizando-se o *kit Interplay Mammalian TAP System (Stratagene, La Jolla, EUA)*, segundo instruções do fabricante. Resumidamente, os sobrenadantes obtidos foram suplementados com solução de EDTA 0.5M e β-mercapto-etanol 4.4mM (ambos *Sigma*) e resina SBP (*Stratagene*) e incubadas por 4h sob agitação a 4°C. Após este período as suspensões foram centrifugadas a 1500xg em centrífuga refrigerada por 2min e lavadas com tampão NETN por 3 vezes a 4°C. A primeira etapa de purificação foi concluída através da incubação da resina SBP com tampão de eluição de estreptoavidina (*Stratagene*) por 1h. As suspensões foram centrifugadas a 1.500xg em centrífuga refrigerada por 5min e os sobrenadantes recolhidos.

O segundo ciclo de purificação foi feito utilizando-se o sobrenadante obtido ao final do primeiro ciclo, acrescido de resina CBP (*Stratagene*) e tampão de ligação a calmodulina. (tampão CBB, *Stratagene*). A suspensão foi incubada por 4h sob agitação a 4°C. Após este período as suspensões foram centrifugadas a 1500xg em centrífuga refrigerada por 5 min e lavadas com tampão CBB por 3 vezes. O produto obtido foi analisado em espectrômetro de massas *MALDI-TOF-TOF instrument 4700 (Applied Biosystems)* para identificação de novas putativas proteínas de interação com BCCIP (figura 4.12).

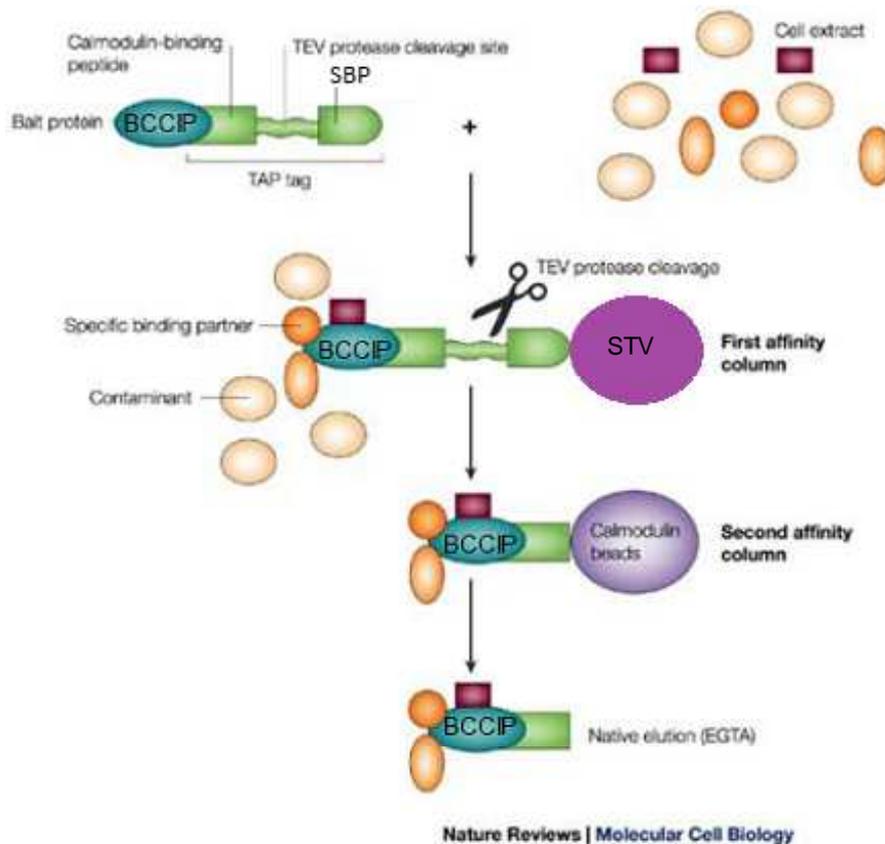


Figura 4.12. **Representação esquemática das etapas de purificação por afinidade sequencial.** Primeiramente os extratos de células HEK293FT transfectados com as construções pTAP-BCCIP e pTAP-GAL4DBD por 36h, sendo purificados os extratos totais contendo a proteína quimérica CBP-SBP-BCCIP e CBP-SBP-GAL4DBD. Os extratos foram precipitados com resina ligadora de estreptoavidina (STV). Posteriormente, os extratos foram precipitados utilizando-se resina ligadora de calmodulina (CAM). SBP, peptídeo ligador de estreptoavidina, CBP: peptídeo ligador de calmodulina.

5 Resultados

5.1 Identificação de BCCIP no Y2H

Recentemente, nosso grupo descreveu uma rede de interações proteicas a partir de 7 proteínas contendo domínios tBRCT através de varredura de interações utilizando diferentes abordagens: ensaio de dois híbridos em levedura (Y2H), purificação de proteínas por afinidade sucessiva (TAP) seguida de espectrometria de massas e curadoria da literatura (WOODS *et al.*, 2012). Em uma das estratégias conduzidas, foram realizadas rotinas de Y2H utilizando como isca o domínio tBRCT de BARD1, e identificadas 50 proteínas putativas de interação. Dentre as proteínas candidatas de interação foi identificada uma, cujo cDNA codificante correspondente aos resíduos de aminoácidos 240-322 da isoforma alfa de BCCIP (figura 1.6), descrita inicialmente por interagir com BRCA2 e p21. Outra isoforma de BCCIP, denominada de BCCIP beta (BCCIP β), comunga dos 258 resíduos iniciais de aminoácidos de BCCIP α , contendo, portanto, 19 dos 83 resíduos de aminoácidos identificados no Y2H (figura 5.1).

Sequência de resíduos de aminoácidos de BCCIP α (referência NP057651.1):

MASRSKRRAVESGVPQPPDPPVQRDEEEEKEVENENEDEDDDDSDKEKDEEDEVIDEEVNIEFEAYSLSNDND
YDGIKLLQQLFLKAPVNTAELTDLLIQNHIGSVIKQTDVSEDSNDDMDEDEVFGFISLLNLTERKGTQ
CVEQIQELVLRFCENCKESMVEQLDKFLNDTTKPVGLLLSERFINVPPQIALPMYQQLQKELAGARTN
KPCGKCYFYLLISKTFVEAGKNSKKKPSNKKKAALMFANAEEFFYEEQGKPEVLGGPDTRRGLEPVPI
QHNGGSRGQVTALVSLKAGLIQSRSTLSDFQGTFTVGIALS

Sequência de resíduos de aminoácidos de BCCIP β (referência NP510868.1):

MASRSKRRAVESGVPQPPDPPVQRDEEEEKEVENENEDEDDDDSDKEKDEEDEVIDEEVNIEFEAYSLSNDND
YDGIKLLQQLFLKAPVNTAELTDLLIQNHIGSVIKQTDVSEDSNDDMDEDEVFGFISLLNLTERKGTQ
CVEQIQELVLRFCENCKESMVEQLDKFLNDTTKPVGLLLSERFINVPPQIALPMYQQLQKELAGARTN
KPCGKCYFYLLISKTFVEAGKNSKKKPSNKKKAALMFANAEEFFYKAILKFNYSVQEESDTCLGGKW
SFDDVPMTPLRTVMLIPGDKMNEIMDKLKEYLSV

Figura 5.1. Sequência de resíduos de aminoácidos das isoformas alfa e beta de BCCIP identificada no Y2H. Sequência de resíduos de aminoácidos das isoformas alfa (322 aa) e beta (314 aa) de BCCIP (OMIM 611883), com a região identificada no Y2H destacada em amarelo. A isoforma beta de BCCIP comunga de 19 dos 83 resíduos de aminoácidos da sequência identificada no Y2H.

5.2 Produção de proteínas quiméricas

Tendo em vista as limitações da abordagem de Y2H na identificação de putativas novas proteínas de interação fomos avaliar a interação BCCIP-BARD1 utilizando-se de outras abordagens como rotinas de *pull-down* e ensaios de co-precipitação utilizando proteínas recombinantes. Para esse fim, a sequência codificante de BCCIP foi clonada nos plasmídeos pEGFP e pFlag.

A geração da sequência codificante de BCCIP, correspondente à sua cadeia completa de 322 aminoácidos, foi realizada através de rotinas de PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos. O produto de PCR com o tamanho esperado de 985 pares de base (pb) foi obtido satisfatoriamente (figura 5.2.1). O produto amplificado foi adequadamente clonado nos vetores pEGFP-C3 e pCMV-Flag, resultando, respectivamente, nas construções pEGFP-BCCIP e pFlag-BCCIP. Ambas as construções foram confirmadas por rotinas de sequenciamento automático.

A construção pEGFP-BCCIP foi utilizada em rotinas de transfecção com reagente lipídico *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche)* em células HEK293FT conforme descrito anteriormente. Transcorridas 24h após a transfecção, as células foram processadas para obtenção dos lisados total, fração citoplasmática e nuclear, sendo posteriormente avaliados os padrões de produção das proteínas quiméricas por Western *blotting* e imunodeteção. Conforme mostra a figura 5.2.2, a proteína de fusão GFP-BCCIP localiza-se tanto no citoplasma quanto no núcleo, conforme esperado (LIU, YUAN *et al.*, 2001; PHILLIPS-MASON *et al.*, 2008).

Curiosamente, além do tamanho predito para a proteína de fusão GFP-BCCIP de 63kDa (36kDa de BCCIP somado à 27kDa de GFP), observamos também a presença de uma banda de cerca de 72kDa, além de uma banda de tamanho intermediário (figura 5.2.2), provavelmente fruto de modificações pós-traducionais da químera GFP-BCCIP. Interessante notar a prevalência da banda de maior peso molecular na preparação nuclear e no extrato total.

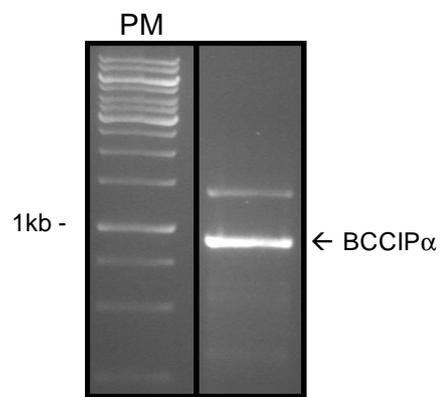


Figura 5.2.1: **Amplificação por rotina de PCR da sequência codificante de BCCIP α .** Eletroforese em gel de agarose 1% em TBE. Produto de amplificação de BCCIP (985pb) indicado pela seta. PM, padrão de peso molecular.

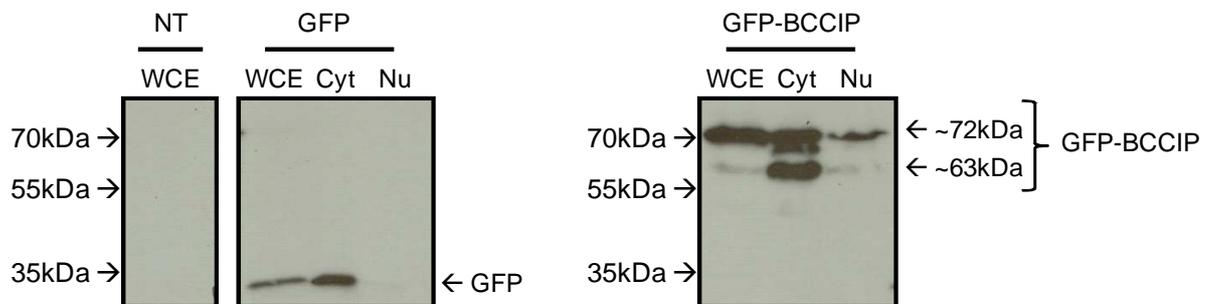


Figura 5.2.2. **Padrão de produção da proteína de fusão GFP-BCCIP em células humanas.** Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções pEGFP ou pEGFP-BCCIP. Após 24h da transfecção, foram preparados o extrato total, frações citoplasmáticas e nucleares e utilizados em rotinas de *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo específico anti-GFP. NT, extrato de células HEK293T não transfectadas; GFP, extrato de células transfectadas com pEGFP; pEGFP-BCCIP, extrato de células HEK293T transfectadas com pEGFP-BCCIP; WCE, extrato total; Cyt, extrato citoplasmático; Nu, extrato nuclear.

5.3 Avaliação da interação BARD1-BCCIP através de produção de proteína recombinante

A fim de confirmar a interação BARD1-BCCIP, realizamos ensaio de *pulldown* utilizando extrato total de células HEK293T transfectadas com pEGFP-BCCIP e a proteína de fusão GST-BARD1 isolada de extrato de bactérias *E.coli* cepa BL21 previamente transformadas com a construção pGEX-BARD1. A figura 5.3.1, painel A, mostra a presença das proteínas recombinantes GFP e GFP-BCCIP nos extratos utilizados no ensaio de *pulldown*. A figura 5.3.1, painel B, mostra a presença das proteínas recombinantes GST e GST-BARD1 nos extratos isolados de bactéria *E.coli* BL21. Posteriormente, foram realizadas rotinas de *pulldown* como descrito no item 4.8, seguido de *Western blotting* seguido de imunodeteção, revelada para GFP. Como pode ser observado na figura 5.3.1, painel C, GFP-BCCIP foi precipitada juntamente com GST-BARD1 e não com GST isoladamente, sugerindo que BCCIP pode estar presente num mesmo complexo que BARD1. É importante notar que somente a isoforma modificada de GFP-BCCIP foi detectada no ensaio de *pulldown*.

Posteriormente, a fim de mapear a região de BARD1 que interage com BCCIP, foram isolados de bactérias *E.coli* BL21 as proteínas quiméricas GST-BARD1 cadeia completa (FL), bem como fragmentos N-terminal e C-terminal de GST-BARD1 (figura 5.3.2, painel A) e utilizados em rotinas de *pulldown* juntamente com extrato de células HEK293FT transfectadas com a construção pFlag-BCCIP (figura 4.1.2, painel B). A figura 5.3.2, painel B mostra a produção satisfatória dos fragmentos de GST-BARD1. A figura 5.3.2, painel C mostra o padrão de produção de Flag-BCCIP nas células HEK293FT. Como demonstrado na figura 5.3.2, painel D, preferencialmente as proteínas de fusão GST-BARD1 cadeia completa (FL) e C-terminal (CT) foram precipitadas juntamente com Flag-BCCIP no ensaio de *pulldown*, em contraste com a quimera N-terminal de GST-BARD1 e GST. É importante destacar que justamente na região C-terminal de BARD1 está localizado o tBRCT, fragmento usado no ensaio de Y2H para identificar a putativa interação relatada em artigo recente do grupo (WOODS, MESQUITA *et al.*, 2012).

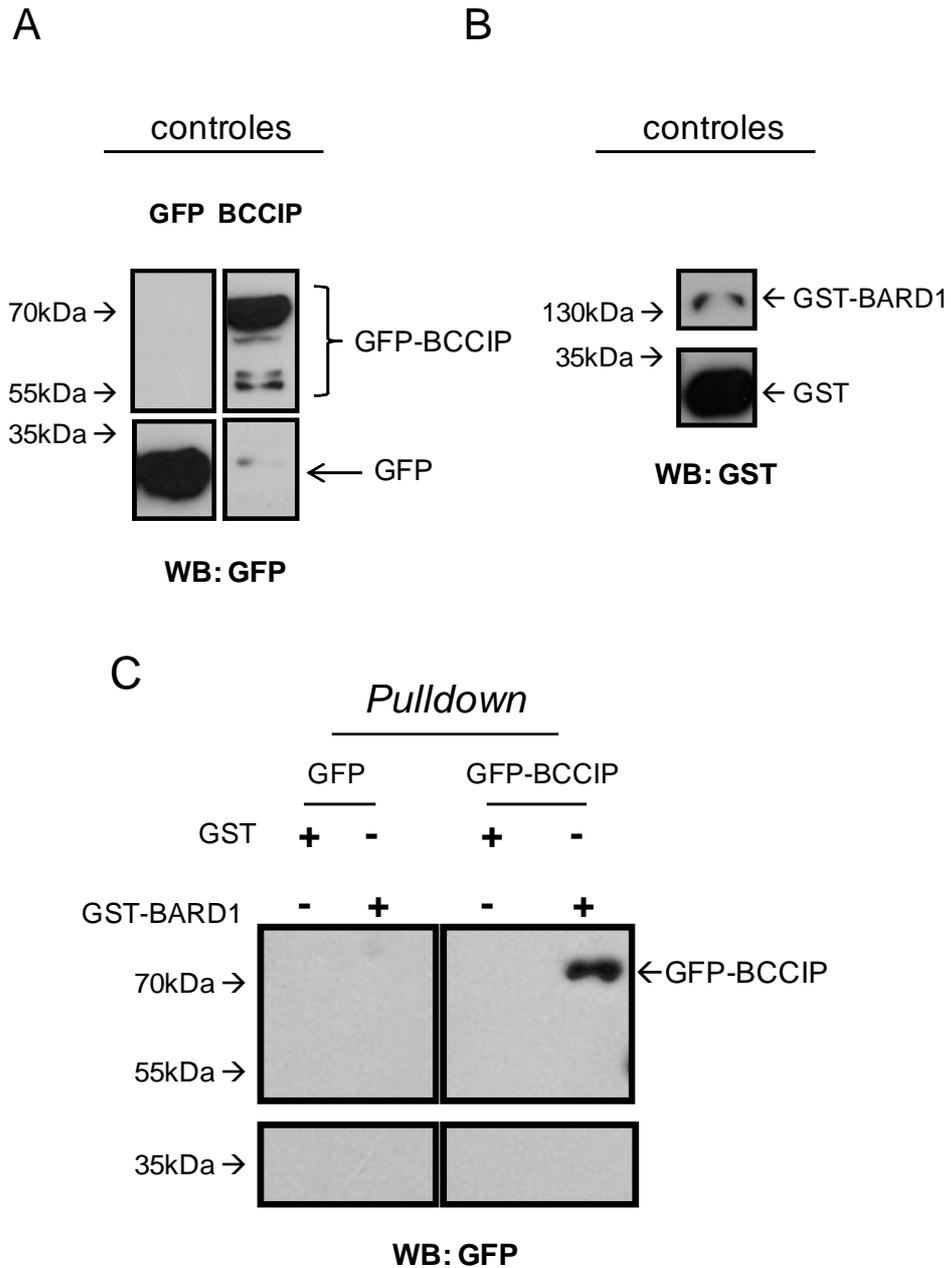


Figura 5.3.1: **Avaliação da interação entre GFP-BCCIP e GST-BARD1 por rotina de *Pulldown*.** O extrato total de células HEK293T transfectadas com pEGFP-BCCIP ou pEGFP foi utilizado no ensaio de *pull-down* juntamente GST-BARD1 isolado de extrato de bactérias *E.coli* cepa BL21. **A.** Western *blotting* seguido de imunodeteção mostra a produção de GFP e GFP-BCCIP no extrato total de células HEK293FT. **B.** Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada para GST utilizando extrato de bactérias BL21 produzindo GST ou GST-BARD1. **C.** A forma modificada de GFP-BCCIP foi precipitada juntamente com a proteína quimérica GST-BARD1 mas não com GST. Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo específico anti-GFP.

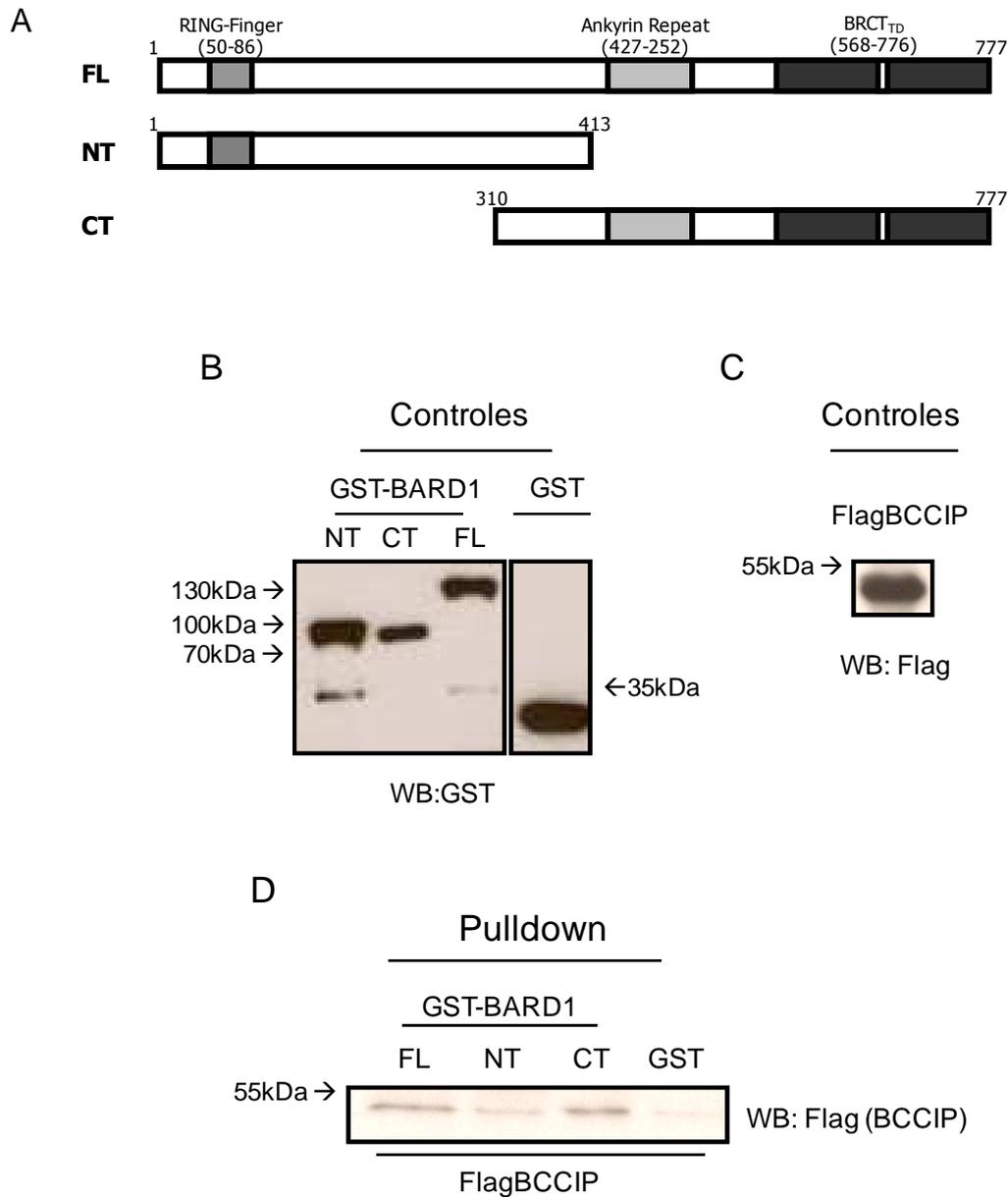


Figura 5.3.2: **Mapeamento da região de interação de BARD1 com BCCIP por ensaio de pull-down.** O extrato total de células HEK293FT expressando a proteína quimérica Flag-BCCIP foi utilizado em ensaio de *pull-down* juntamente com extrato de bactérias *E.coli* BL21 expressando GST-BARD1 cadeia completa (FL), N-terminal (NT) and C-terminal (CT) ou GST. **A.** Representação esquemática dos mutantes de GST-BARD1. **B.** *Western blotting* seguido de imunodeteção mostra o padrão de produção de BARD1 cadeia completa, e fragmentos N e C-terminais em bactérias *E.coli* BL21. **C.** *Western blotting* seguido de imunodeteção mostra o padrão de produção de Flag-BCCIP em células HEK293FT. **D.** *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada para Flag demonstrando que Flag-BCCIP foi precipitado juntamente com GST-BARD1 cadeia completa e GST-BARD1 C-terminal.

5.4 Avaliação da interação BARD1-BCCIP em células humanas

Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com a construção pEGFP-BCCIP, seu extrato proteico total obtido 24h depois foi utilizado em rotinas de co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-GFP. O extrato de células HEK293FT não transfectadas ou transfectadas somente com a construção pEGFP foram utilizados com controles negativos do ensaio de coimunoprecipitação. Os complexos proteicos foram analisados em rotinas de *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada para BARD1. A figura 5.4.1, painel A mostra representação esquemática das isoformas de BARD1 (FL) e β -BARD1, uma isoforma gerada por *splicing* alternativo, que difere da isoforma principal por não possuir o domínio RING. O padrão de produção de GFP-BCCIP nas células HEK293FT foi analisado por *Western blotting* seguido de imunodeteção (figura 5.4.1, painel B) bem como o perfil de produção de BARD1 e β -BARD1 (figura 5.4.1, painel C). Os extratos celulares foram então utilizados em rotinas de co-imunoprecipitação, sendo posteriormente analisados por *Western blotting* seguido de imunodeteção.

Como mostra a figura 5.4.1, painel D, a proteína de fusão GFP-BCCIP está presente no mesmo complexo que a isoforma β -BARD1. Interessantemente, essa isoforma comunga do mesmo domínio tBRCT presente na região C-terminal da isoforma principal (diferindo de BARD1 apenas pela ausência do domínio RING na porção N-terminal) e confirma a importância desse motivo para a interação com BCCIP.

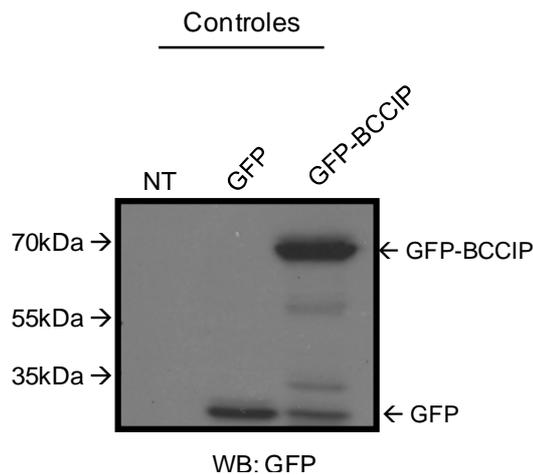
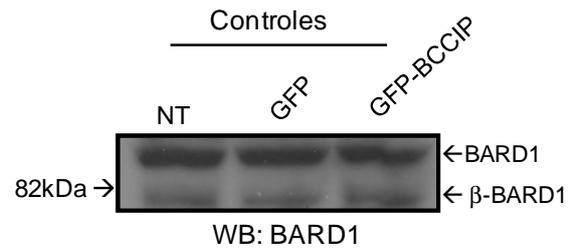
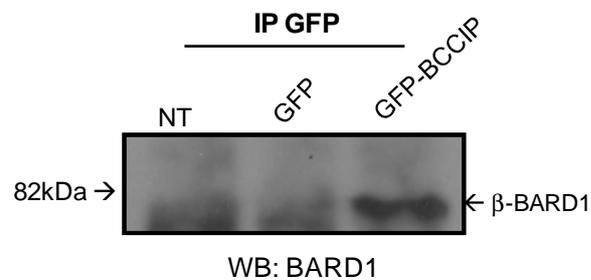
A**B****C****D**

Figura 5.4.1. **Avaliação da associação de BCCIP e BARD1 produzidos ectopicamente em células humanas.** Representação esquemática de BARD1 cadeia completa (FL) e β -BARD1 (A). Células HEK293FT foram transfectadas com plasmídeos contendo a sequência de GFP-BCCIP ou GFP. Após 24h foi obtido o extrato total das células e utilizado em rotina de imunoprecipitação com anticorpo anti-GFP seguido de *Western blotting* seguido de imunodeteção para anticorpo anti-GFP (B) e anti-BARD1 (C). O ensaio de co-IP mostra que β -BARD1 é precipitado juntamente com GFP-BCCIP, mas não com GFP (D). As setas indicam BARD1 constitutivo, sua isoforma β -BARD1, e as proteínas GFP-BCCIP e GFP. NT, não transfectado; WB, *immunoblotting*.

Uma vez confirmada a presença da proteína de fusão GFP-BCCIP num complexo juntamente com BARD1, nos questionamos se esse mesmo complexo poderia ser identificado em células humanas em condições fisiológicas. Com esse objetivo, utilizamos o extrato nuclear de células da linhagem de adenocarcinoma de ovário ES2 (escolhida devido a produção de níveis consideráveis de BCCIP) em rotinas de coimunoprecipitação utilizando anticorpo policlonal anti-BCCIP. O anticorpo anti-Flag foi utilizado como controle negativo. O padrão de produção de BCCIP (figura 5.4.2, painel A) e BARD1 (figura 5.4.2, painel B) foi analisado por Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpos anti-BCCIP e anti-BARD1 específicos. Como mostra a figura 5.4.2, painel A, a proteína BCCIP apresenta um peso molecular cerca de 9kDa maior que o previsto, assim como observado com as produções ectópicas das proteínas GFP-BCCIP (figura 5.3.1, painel A) e Flag-BCCIP (figura 5.3.2, painel C).

Após o ensaio de coimunoprecipitação, os complexos proteicos foram analisados em rotinas de Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada para BARD1 constitutiva. Como resultado, podemos observar que BCCIP está presente no mesmo complexo que BARD1 e sua isoforma β -BARD1 (figura 5.4.2, painel C).

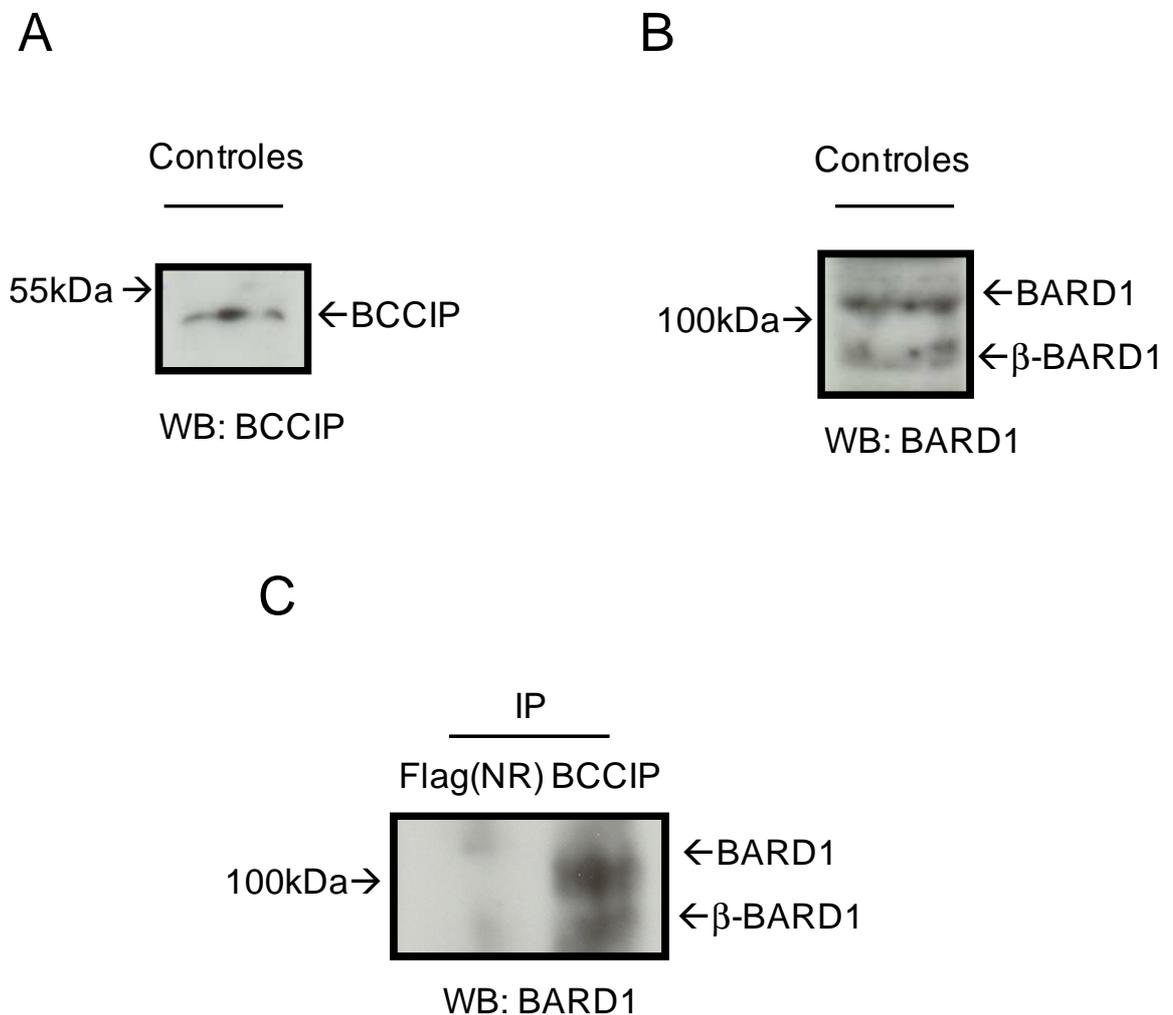


Figura 5.4.2 **Avaliação da associação de BCCIP e BARD1 produzidos constitutivamente em células humanas.** Extrato nuclear de células ES2 foi imunoprecipitado com anticorpos anti-BCCIP (policlonal) ou anti-Flag (anticorpo não relacionado), seguido de análise por Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo anti-BARD1. **A.** Padrão de produção constitutiva de BCCIP detectada por análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo específico anti-BCCIP. **B.** Padrão de produção constitutiva de BARD1 detectada por análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo específico anti-BARD1. **C.** Ensaio de co-imunoprecipitação analisado por Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo anti-BARD1.

5.5 Avaliação da modificação pós-traducional de BCCIP

As produções ectópica e constitutiva de BCCIP foram detectadas com um peso molecular de aproximadamente 9 kDa acima do previsto (figura 5.2, painel A) o que parece indicar que BCCIP pode ser alvo de modificações pós traducionais. Uma vez que o heterodímero formado por BRCA1 e BARD1 possui atividade de E3 ubiquitina ligase (BAER e LUDWIG, 2002) e BARD1 está presente no mesmo complexo que BCCIP modificado nos ensaios de *pulldown* e de co-imunoprecipitação, é plausível suspeitar que BCCIP possa ser alvo de monoubiquitinação.

A fim de investigar a possível ubiquitinação de BCCIP, células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções pEGFP-BCCIP e pHA-Ub (contendo a sequência codificante de ubiquitina) e seu extrato proteico total contendo a proteína de fusão GFP-BCCIP e HA-Ub (figura 5.5.1, painel A) foi utilizado em rotinas de co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-GFP. O extrato de células HEK293FT transfectadas somente com a construção pEGFP foi utilizado como controle negativo do ensaio de co-imunoprecipitação. Os complexos proteicos foram analisados em rotinas de *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo anti-HA e como resultado podemos observar a presença de uma banda de cerca de 72kDa (figura 5.5.1, painel B) exatamente no mesmo peso molecular do controle de GFP-BCCIP. Quando revelada com anticorpo anti-ubiquitina teve como resultado a identificação da banda de 72kDa (figura 5.5.1, painel C).

A ubiquitinação de BCCIP produzido constitutivamente foi avaliada em extratos totais de células da linhagem ES2 através da imunoprecipitação de ubiquitina e análise por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo monoclonal anti-BCCIP. O anticorpo anti-HA foi utilizado como controle negativo. O padrão de produção de proteínas ubiquitinadas foi analisado por *Western blotting* seguido de imunodeteção (figura 5.5.1, painel D) bem como a produção das isoformas alfa e beta de BCCIP (figura 5.5.1, painel E).

Após a rotina de imunoprecipitação para ubiquitina e análise por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP, foram observadas as presenças de bandas de cerca de 45kDa,

correspondentes ao mesmo peso molecular do controle das isoformas α e β de BCCIP monoubiquitinadas (figura 5.5.1, painel F).

Com o objetivo de avaliar se a mesma diferença de cerca de 9kDa pode ser observada na produção constitutiva de BCCIP. Foi analisado o padrão de produção de BCCIP por *Western blotting* seguido de imunodeteção num painel de linhagens celulares de mama (MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, T47D) (figura 5.5.2, painel A) e ovário (ES2, TOV21G, A2780, ACRP) (figura 5.5.2, painel B) utilizando anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP. O controle de carregamento utilizado no extrato total das linhagens citadas foi o anticorpo anti- β -actina. Os níveis de produção de BCCIP na linhagem de mama imortalizada MCF10A foram semelhantes os níveis detectados na linhagens tumorais (figura 5.5.2, painel A). Os níveis de BCCIP também foram semelhantes nas linhagens A2780 e sua linhagem derivada ACRP. Curiosamente, todas as linhagens analisadas apresentam as isoformas alfa e beta de BCCIP no peso molecular maior do que o previsto, que pode ser atribuído à monoubiquitinação.

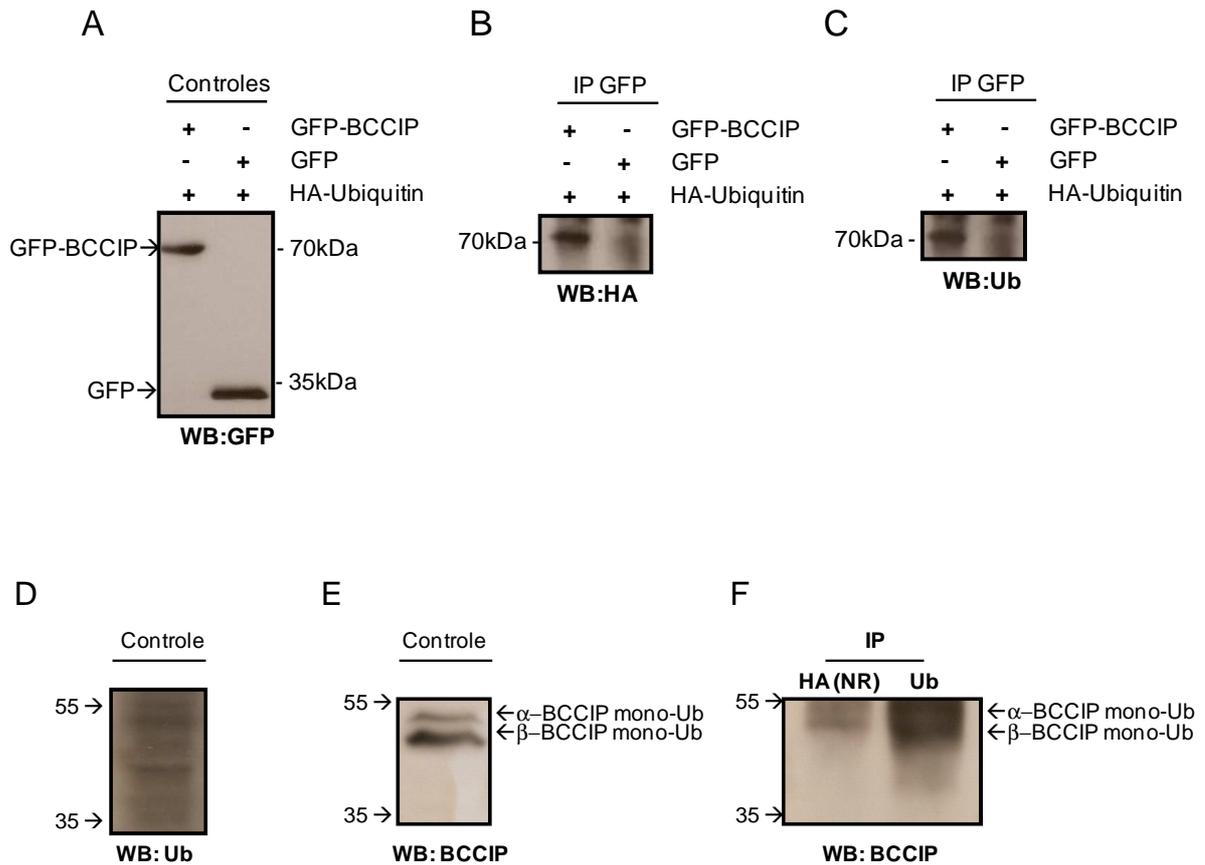


Figura 5.5.1: **Análise da modificação pós-traducional de BCCIP.** O extrato total de células de células HEK293FT cotransfectadas com pHA-Ub e pEGFP-BCCIP ou pHA-Ub e pEGFP foi utilizado no ensaio de imunoprecipitação de GFP-BCCIP. O ensaio de Western *blotting* seguido de imunodeteção foi realizado utilizando-se anticorpos específicos anti-GFP e anti-HA. **A.** Expressão de GFP e GFP-BCCIP em células HEK293FT. **B.** Ensaio de co-imunoprecipitação de GFP-BCCIP, seguido de *Western blotting* seguido de imunodeteção, revelada com anticorpo anti-HA, demonstrando que GFP-BCCIP pode ser ubiquitinado. **C.** Ensaio de co-imunoprecipitação de GFP-BCCIP, seguido de *Western blotting* seguido de imunodeteção, e revelado com anticorpo específico anti-ubiquitina. **D.** Padrão de produção de ubiquitina no extrato total de células ES2 analisado por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo anti-ubiquitina. **E.** Padrão de produção de BCCIP no extrato total de células ES2 analisado por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo monoclonal anti-BCCIP. **F.** *Western blotting* seguido de imunodeteção do produto de rotina de imunoprecipitação de ubiquitina, revelado com anticorpo anti-BCCIP. Anticorpo anti-HA usado como controle negativo. A forma modificada de BCCIP foi precipitada juntamente com Ub.

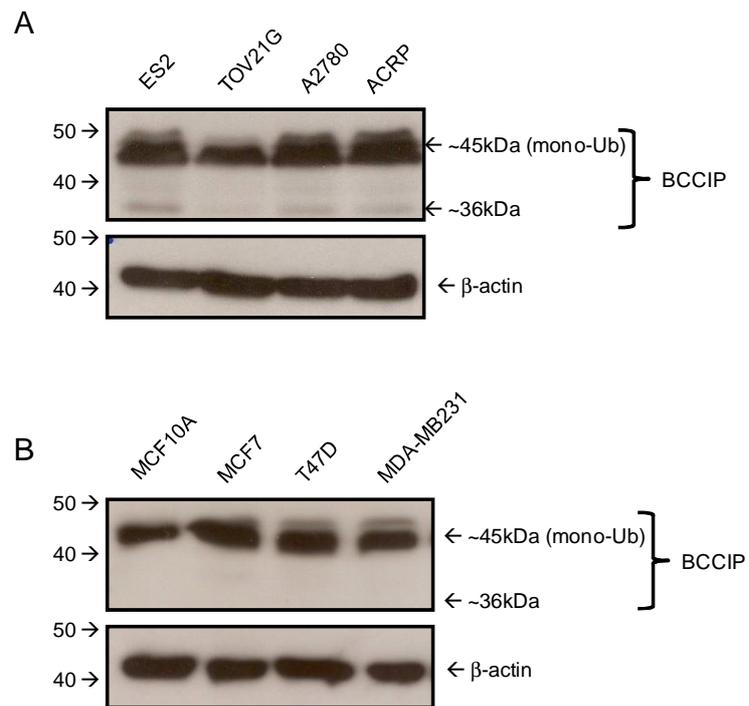


Figura 5.5.2: **Avaliação do padrão de produção de BCCIP em células humanas.** **A.** A produção constitutiva de BCCIP foi avaliada por *Western blotting* seguido de imunodeteção num painel de linhagens celulares de ovário (ES2, TOV21G, A2780, ACRP) revelado para anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP. **B.** A produção constitutiva de BCCIP foi avaliada por *Western blotting* seguido de imunodeteção num painel de linhagens celulares de mama (MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, T47D,) revelado com anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP. Como controle de carregamento foi utilizado o anticorpo específico anti-β-actina.

5.6 Avaliação da interação BRCA1-BCCIP em células humanas

Uma vez que nossos dados sugerem fortemente que BCCIP se encontra majoritariamente modificado por ubiquitinação em células humanas e demonstram que BCCIP e BARD1 participam do mesmo complexo, nos questionamos se BRCA1, que forma um heterodímero com BARD1 com atividade E3 ubiquitina ligase, poderia ser encontrado no mesmo complexo juntamente com BCCIP. Com esse objetivo, utilizamos o extrato nuclear de células da linhagem ES2 em rotinas de co-imunoprecipitação utilizando anticorpo específico anti-BRCA1. O anticorpo anti-LexA foi utilizado como controle negativo. O padrão de produção de BRCA1 (figura 5.6.1, painel A), BARD1 (figura 5.6.1, painel B) e BCCIP foi analisado por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpos anti-BRCA1, anti-BARD1 e anti-BCCIP específicos. Após o ensaio de co-imunoprecipitação, os complexos proteicos foram analisados em rotinas de *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada para BCCIP constitutivo.

Como resultado, podemos observar que BCCIP α foi precipitada juntamente com BRCA1, ao contrário da co-imunoprecipitação com anti-LexA (controle negativo) (figura 5.6.1, painel C). É interessante notar que somente a isoforma alfa de BCCIP participa de complexos com BRCA1 ao contrário de BCCIP β (figura 5.6.1, painel C).

Uma vez que BCCIP foi encontrado monoubiquitinado e participa de complexos proteicos juntamente com BRCA1, procuramos avaliar o *status* de BCCIP em linhagens celulares de mama que produzem BRCA1 disfuncional HCC1937 e SUM1315. Assim sendo, foi analisado o padrão de produção de BCCIP por *Western blotting* seguido de imunodeteção nas linhagens HCC1937 e SUM1315 utilizando anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP. O controle de carregamento utilizado foi o anticorpo anti- β -actina.

Verificamos que BCCIP foi detectado com peso molecular aproximado de 45 kDa, o que sugere que continua sendo ubiquitinado nas linhagens deficientes para BRCA1 (figura 5.6.1, painel D).

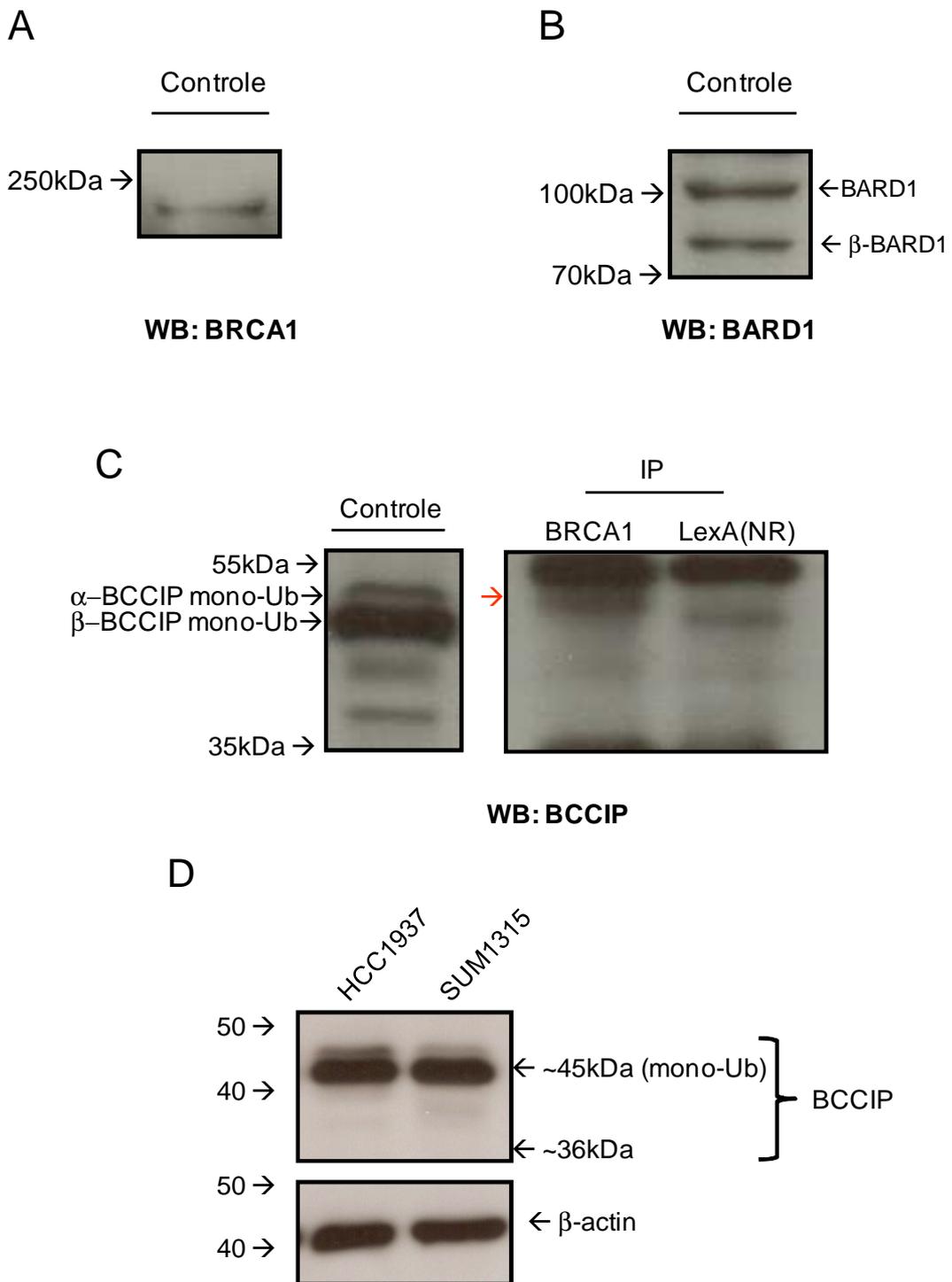


Figura 5.6.1. **Análise da associação de BCCIP com BRCA1 em células da linhagem ES2.** Extrato nuclear de células ES2 foi imunoprecipitado com anticorpos anti-BRCA1 ou anti-LexA (anticorpo não relacionado), seguido de análise por Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo monoclonal anti-BCCIP. **A.** Padrão de produção constitutiva de BRCA1 detectado por análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo específico anti-BRCA1. **B.** Padrão de produção constitutiva de BARD1 detectado por análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção utilizando anticorpo específico anti-BARD1. **C.** Ensaio de co-imunoprecipitação de BRCA1 analisado por Western *blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo monoclonal anti-BCCIP. **D.** Padrão de produção de BCCIP em células deficientes em BRCA1.

5.7 Avaliação do envolvimento de BCCIP em vias RDD e no controle do ciclo celular

Com o objetivo de melhor caracterizar o envolvimento de BCCIP em vias de reparo de dano ao DNA, células da linhagem ES2 foram transduzidas com partículas virais contendo construções para interferência da expressão gênica de *BCCIP* (shBCCIP) assim como sequencia não relacionada (*scramble* - shSCR).

Diferentes clones de shRNA de *BCCIP* foram testados através de transfecção transiente em células ES2. Cerca de 24h após a transfecção, as células foram processadas e foram obtidos os extratos totais de células ES2, sendo posteriormente analisados por *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo monoclonal específico anti-BCCIP e anticorpo específico anti-HSC70 (*Santa Cruz Biotechnology*) como controle de carregamento.

Como mostra a figura 5.7.1, painel A, os clones de shRNA 60, 61 e 62 foram capazes de silenciar a produção de BCCIP.

Para a geração de linhagens estavelmente silenciadas para BCCIP, células ES2 foram transduzidas com partículas virais contendo o clone de shRNA 62 e tratadas com puomicina (2µg/mL) como descrito anteriormente.

Posteriormente, o perfil proteico de BCCIP foi avaliado nas linhagens estavelmente interferidas ES2 shSCR e ES2 shBCCIP por rotinas de *Western blotting* seguido de imunodeteção (figura 5.7.1, painel B).

Os efeitos da supressão da expressão gênica de *BCCIP* nos mecanismos de reparo de dano ao DNA foram avaliados através da exposição das linhagens ES2 shSCR e ES2 shBCCIP à radiação ionizante (raios-X).

Células das linhagens ES2 shSCR e ES2 shBCCIP foram expostas ao dano por irradiação de 2Gy e avaliadas quanto à cinética de ativação de ATM por fosforilação.

A fosforilação de ATM foi analisada através de *Western blotting* seguido de imunodeteção com anticorpo específico para ATM fosforilada no resíduo de serina 1981.

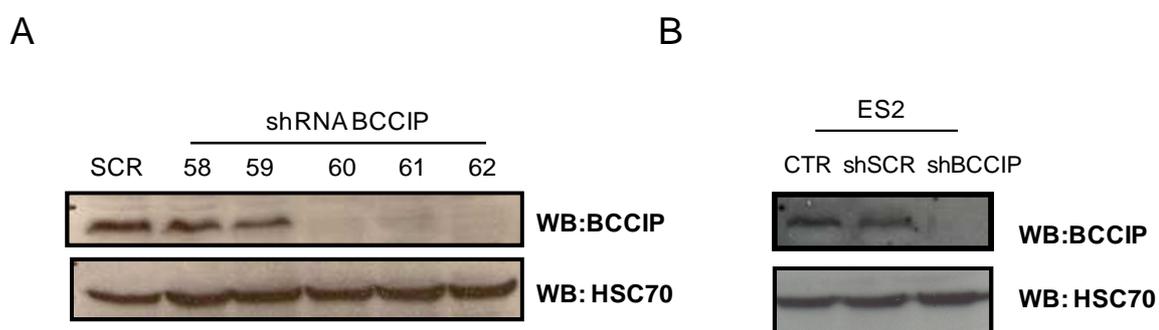


Figura 5.7.1. **Avaliação do perfil proteico de BCCIP em células ES2 com expressão gênica de BCCIP estavelmente silenciadas.** **A**, Células ES2 transfectadas com diferentes clones de shRNA de BCCIP. Cerca de 24h após a transfecção, as células foram processadas, foram obtidos os extratos totais de células ES2 e analisados por Western *blotting* seguido de imunodeteccção revelada com anticorpo policlonal anti-BCCIP e anticorpo anti-HSC70 como controle de carregamento. **B**, Células ES2 foram submetidas à transdução retroviral a fim de silenciar a expressão de BCCIP. Após 72h, foi obtido o extrato total das células e feito o Western *blotting* seguido de imunodeteccção utilizando-se anticorpo policlonal anti-BCCIP e anti-HSC-70 como controle de carregamento. CTR, células não transduzidas; shSCR, células transduzidas com shRNA *scramble*; shBCCIP, células transduzidas com shRNA BCCIP.

As células foram irradiadas, submetidas ao fracionamento subcelular e a fosforilação de ATM foi avaliada nos extratos nucleares ao longo de vários intervalos de tempo após o dano. Como apresentado na figura 5.7.2, painel A, a fosforilação de ATM pode ser observada por até 6hs nas células da linhagem ES2 shSCR ao passo que nas células ES2 shBCCIP (figura 5.7.2, painel B), a ativação de ATM permanece por até 8hs após a irradiação por 2 Gy.

A persistência na forma de ATM fosforilada nas células da linhagem ES2 depletadas de BCCIP, nos levou a nos questionarmos se estaria ocorrendo alguma mudança no padrão de ativação de um dos substratos de ATM, a variante X da histona H2A (H2AX).

Para esse fim, avaliamos a ativação de H2AX por fosforilação após a exposição das células ES2 shSCR e ES2 shBCCIP ao dano por irradiação de 10Gy ao longo de vários tempos após o dano. As células foram irradiadas, submetidas ao fracionamento subcelular (conforme descrito no item 4.6) e a fosforilação de H2AX foi avaliada por Western *blotting* seguido de imunodeteccção no extrato de proteínas ligadas à cromatina com anticorpo específico anti- γ -H2AX. Como controle de carregamento foi utilizado anticorpo anti-ORC2.

Como pode ser observado na figura 5.7.3, painéis A, B e C, a ativação de H2AX segue um padrão semelhante ao de ATM (figura 5.7.2, painéis A e B) pois a fosforilação de H2AX não só é mais duradoura como também é mais intensa nas células ES2 silenciadas para BCCIP do que nas células controle (shSCR).

O mesmo perfil de persistência pode ser observado na monoubiquitinação de H2AX analisada por Western *blotting* seguido de imunodeteccção, pois as células interferidas para BCCIP (shBCCIP) mantém o sinal de monoubiquitinação de H2AX por até 6h após o dano por irradiação (figura 5.7.4, painéis B e C), ao passo que nas células ES2 controle (shSCR) os níveis de H2AX monoubiquitinado começam a diminuir já a partir de 3h após a irradiação de 10Gy (figura 5.7.4, painéis A e C).

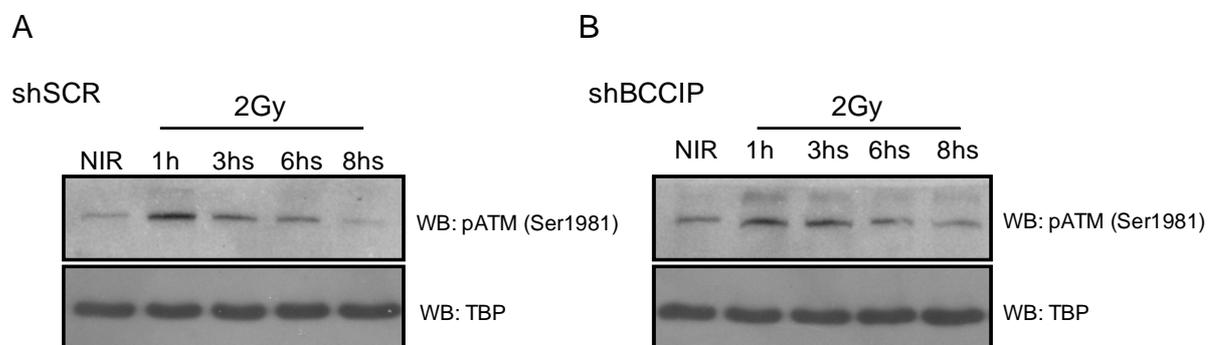


Figura 5.7.2. **Análise do perfil de ativação de ATM em células com expressão de *BCCIP* estavelmente silenciada.** **A**, ES2 shSCR (shRNA *scramble*) foram submetidas à radiação ionizante na dose de 2Gy e isolados extratos citoplasmáticos e nucleares em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. O extrato nuclear de proteínas foi utilizado em análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção revelado com anticorpo anti-ATM fosforilado (pATM). A produção de TBP foi usada com controle de carregamento de proteínas do extrato nuclear. **B**, ES2 shBCCIP (shRNA *BCCIP*) foram submetidas à radiação ionizante na dose de 2Gy e isolados extratos citoplasmáticos e nucleares em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. O extrato nuclear de proteínas foi utilizado em análise de Western *blotting* seguido de imunodeteção revelado com anticorpo anti-ATM fosforilado (pATM). A produção de TBP foi usada com controle de carregamento de proteínas do extrato nuclear. NIR, células não irradiadas.

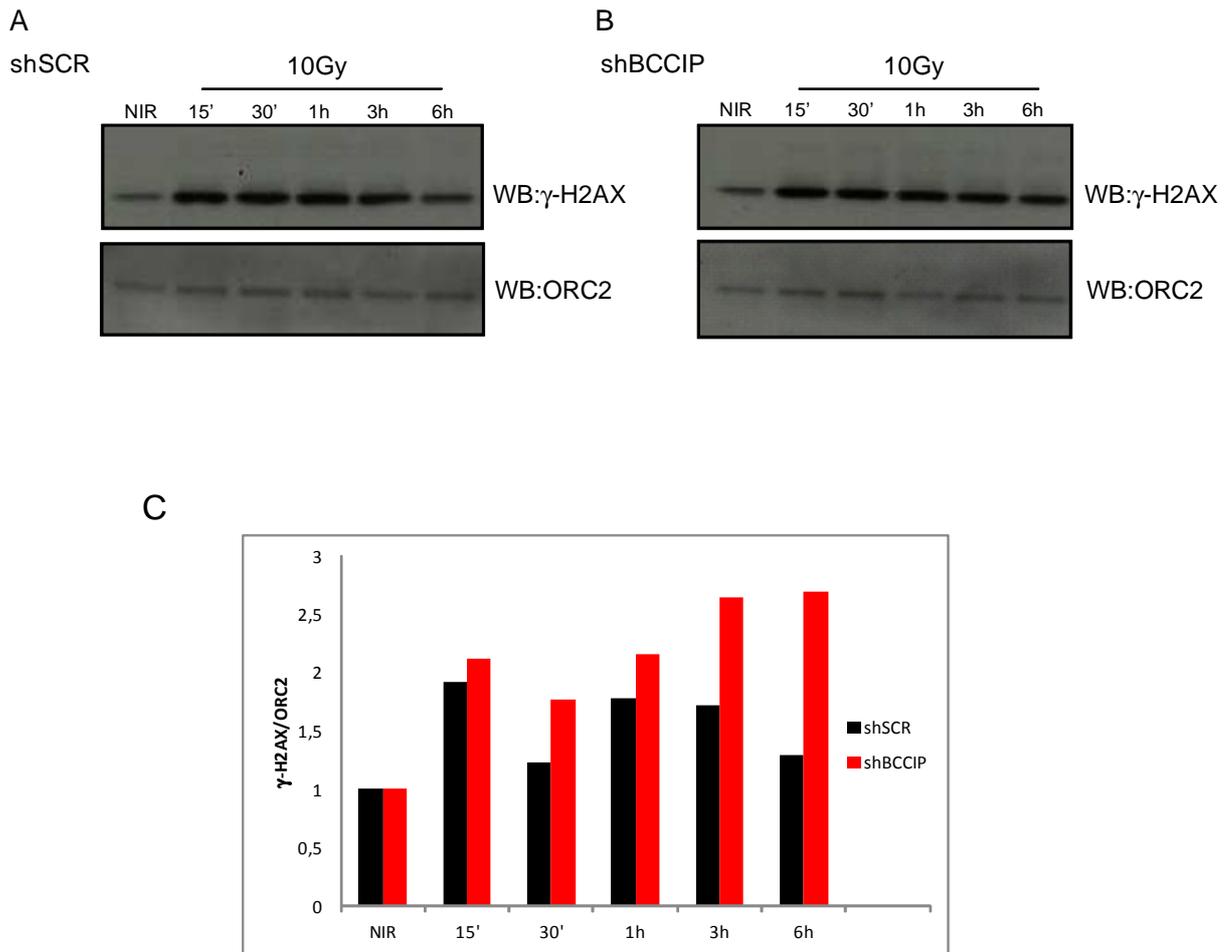


Figura 5.7.3. Fosforilação de H2AX é mais intensa e duradoura nas células ES2 estavelmente silenciadas para *BCCIP*. **A & B.** Células ES2 shSCR e shBCCIP foram submetidas à radiação ionizante na dose de 10Gy e isolados extratos citoplasmáticos, nucleares e de proteínas associadas à cromatina em diferentes tempos após a irradiação. O lisado de proteínas associadas à cromatina foi utilizado em análise de Western blotting seguido de imunodeteção revelada com anticorpo anti-γ-H2AX e anti-ORC2. NIR, não irradiado. **C.** Gráfico da densitometria das bandas do Western blotting seguido de imunodeteção demonstrado em A e B, γ-H2AX/ORC2.

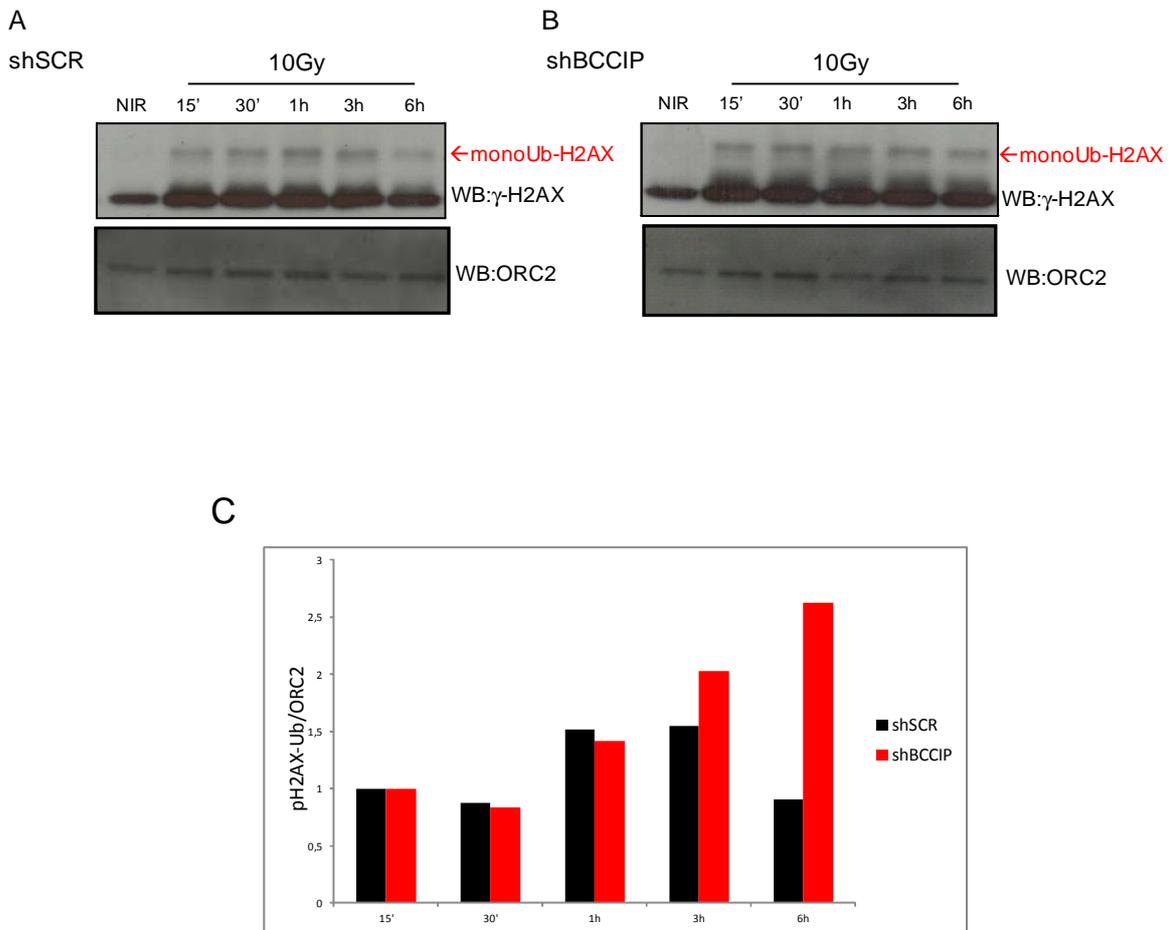


Figura 5.7.4: **A monoubiquitinação de H2AX é mais duradoura nas células ES2 silenciadas para BCCIP. A & B.** Células ES2 shSCR e shBCCIP foram submetidas à radiação ionizante na dose de 10Gy e isolados extratos citoplasmáticos, nucleares e de proteínas associadas à cromatina em diferentes tempos após a irradiação. O lisado de proteínas associadas à cromatina foi utilizado em análise de *Western blotting* seguido de imunodeteção revelada com anticorpo anti-γ-H2AX e anti-ORC2. NIR, não irradiado. **C.** Gráfico da densitometria das bandas do *Western blotting* seguido de imunodeteção demonstrado em A e B, Ub-H2AX/ORC2.

Tendo sido analisados os eventos iniciais do reparo de dano ao DNA, procuramos avaliar os perfis de ciclo celular das linhagens ES2 shSCR e ES2 shBCCIP através do uso de iodeto de propídeo (PI) e citometria de fluxo após o dano por irradiação com as doses de 2 e 10Gy, acompanhando ao longo de diversos intervalos de tempo após o dano.

Como descrito nas figuras 5.7.5 (irradiação de 2Gy) e 5.7.6 (irradiação de 10Gy), as células ES2 deficientes em BCCIP apresentam um retardo na cinética da progressão do ciclo após a irradiação quando comparadas à cinética das células ES2 shSCR. A alteração da cinética da progressão do ciclo das células interferidas para BCCIP em contraste com as células controle fica mais evidente no gráfico das figuras 5.7.7, painéis A (2Gy) e B (10Gy).

2Gy

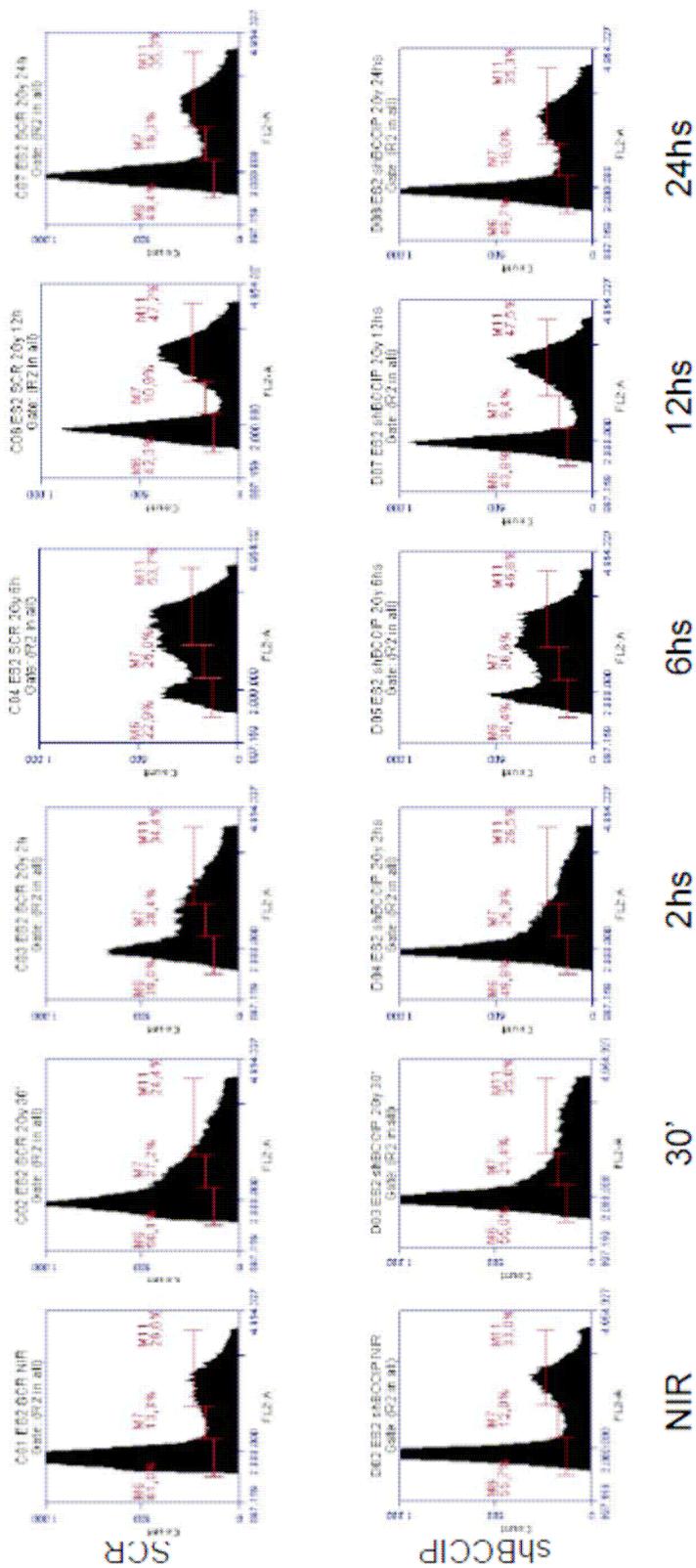


Figura 5.7.5: Avaliação do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação de 2Gy. Células ES2 transduzidas com shRNA BCCIP (shBCCIP) e shRNA scramble (SCR) foram submetidas à radiação ionizante e fixadas em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. Posteriormente, as células foram marcadas com iodoeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo quanto ao conteúdo de DNA.

10Gy

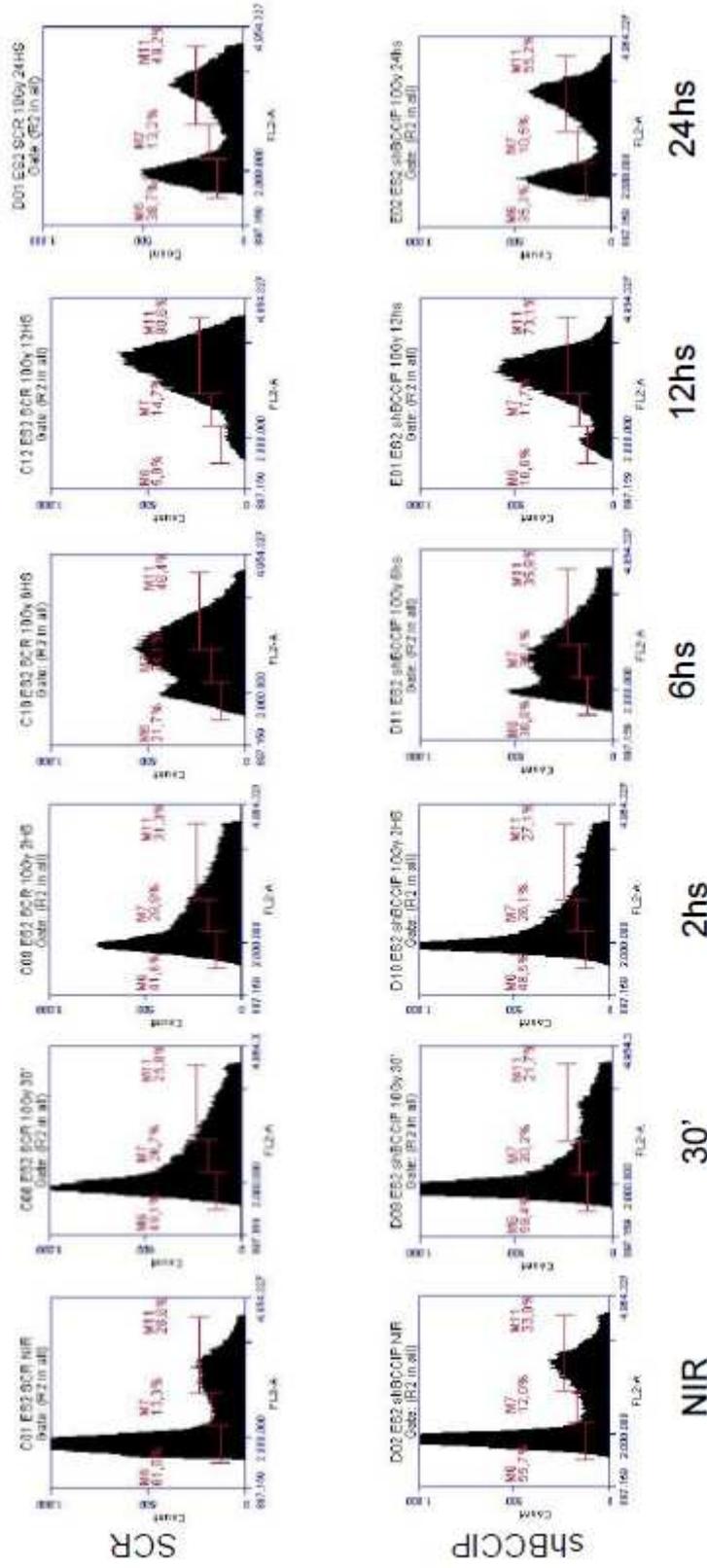
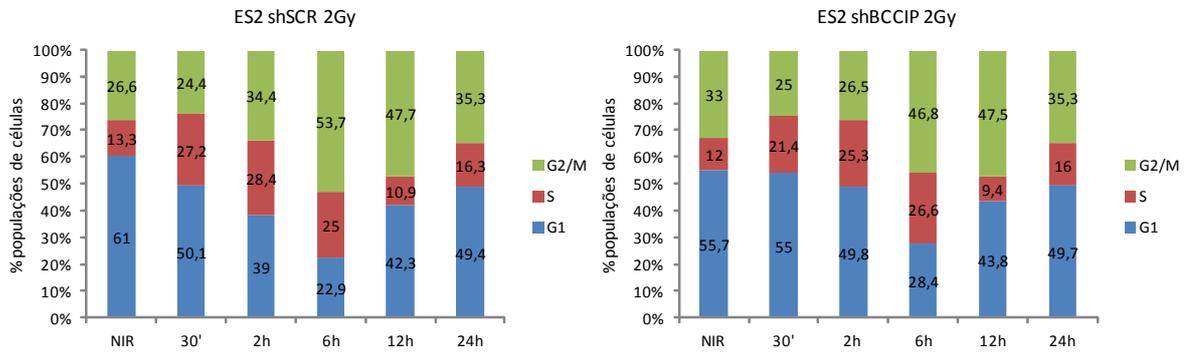


Figura 5.7.6: Avaliação do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação de 10Gy. Células ES2 transduzidas com shRNA BCCIP (shBCCIP) e shRNA scramble (SCR) foram submetidas à radiação ionizante e fixadas em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. Posteriormente, as células foram marcadas com iodoeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo quanto ao conteúdo de DNA.

A



B

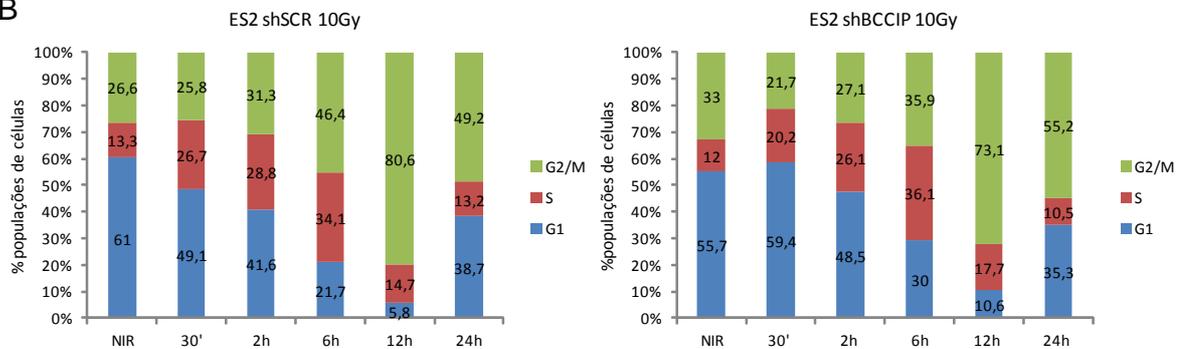


Figura 5.7.7. Gráfico do perfil do ciclo celular em células ES2 após o dano por irradiação nas doses de 2 e 10Gy. Células ES2 transduzidas com shRNA BCCIP (shBCCIP) e shRNA *scramble* (SCR) foram submetidas à radiação ionizante e fixadas em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. Posteriormente, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo quanto ao conteúdo de DNA.

5.8 Determinação da rede de interações proteicas de BCCIP

A fim de melhor compreender o papel de BCCIP em processos celulares, foi realizada uma triagem de interações proteicas utilizando-se rotinas de purificação de proteínas por afinidade sucessiva. Células da linhagem HEK293FT foram transfectadas com construções as construções pNTAP-BCCIP (figura 4.1.3, painel A) e pNTAP-GAL4DBD (figura 4.1.3, painel B), contendo as sequências codificantes das proteínas de fusão CBP-SBP- BCCIP e CBP-SBP-GAL4 DBD respectivamente. Os lisados celulares totais das células transfectadas foram submetidas a etapas de purificação sucessivas e os complexos proteicos obtidos identificados por espectrometria de massas. Foram consideradas somente as proteínas presentes nos extratos provenientes das células transfectadas com pNTAP-BCCIP que não foram encontradas nos extratos de células transfectadas com pNTAP-GAL4 DBD. Dessa análise foram identificadas 5 novas proteínas putativas de interação com BCCIP (tabela 5.8), dentre as quais proteínas importantes para o controle do ciclo celular e controle da transcrição gênica como MCM3 e MLL2.

Tabela 5.8: Proteínas candidatas de interação com BCCIP identificadas por rotinas de TAP e espectrometria de massas.

Gene	Proteína	OMIM
SLC25A4	transportador mitocondrial de adenina	103220
AUP1	proteína ligadora de E2 ubiquitina conjugase	602434
MCM3	proteína P1 associada à DNA polimerase alfa	602693
MLL2	histona metiltransferase	602113
MYLK2	quinase 2 da cadeia leve de miosina	606566

6 Discussão

Recentemente, nosso grupo descreveu uma rede de interações proteicas a partir de sete proteínas contendo domínios tBRCT (BRCA1, BARD1, TP53BP1, ECT2, MDC1, DNA ligase IV e PAXIP1) através de varredura de interações utilizando diferentes abordagens moleculares: ensaio de Y2H e TAP-MS, além de curadoria da literatura (WOODS, MESQUITA *et al.*, 2012). Em um dos ensaios de Y2H, cuja isca utilizada foi o domínio tBRCT de BARD1, foram identificadas 50 putativas proteínas de interação.

A proteína BCCIP, além de compor o conjunto de putativas proteínas de interação com domínio tBRCT de BARD1 identificadas, está envolvida em vias de resposta de dano ao DNA, controle do ciclo celular e controle de transcrição, ou seja, funções também desempenhadas por BARD1 (ROSEN, 2013). Nesse cenário, selecionamos BCCIP com objeto principal de nosso estudo.

A proteína BCCIP, cujo cDNA identificado no ensaio de Y2H codifica os resíduos de aminoácidos 240-322 de sua isoforma alfa (figura 1.6), foi descrita inicialmente como um parceiro de interação de BRCA2 (LIU, YUAN *et al.*, 2001) e p21 (ONO, KITAURA *et al.*, 2000). BCCIP participa da via de reparo de dano ao DNA através de sua associação com BRCA2 e RAD51 (LU, GUO *et al.*, 2005). As isoformas alfa e beta de BCCIP participam do controle do ciclo celular através de suas interações com p21, potencializando a inibição que p21 exerce sobre CDK2, atuando assim na regulação do ponto de checagem G1/S do ciclo celular (ONO, KITAURA *et al.*, 2000; MENG, LIU, *et al.*, 2004). Também foi descrito que BCCIP regula positivamente a expressão de p21 através de p53 (MENG, LU *et al.*, 2004).

A literatura mostra que a expressão de *BCCIP* foi observada diminuída em amostras de câncer de ovário, câncer de células renais, câncer de colo retal, câncer de laringe e glioblastomas (ROVERSI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; REWARI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013), sustentando seu papel como um gene supressor de tumor.

A região da isoforma alfa de BCCIP identificada no Y2H (figura 5.1) foi descrita como essencial para o reparo de dano ao DNA através de um ensaio de recombinação homóloga no qual foram utilizados fragmentos de diferentes regiões de BCCIP (LU, YUE *et al.*, 2007).

Considerando as limitações de um ensaio Y2H, e mais especificamente o ensaio utilizado no estudo de Woods *et al.* (com a utilização apenas do tBRCT de BARD1 para identificar a interação de BCCIP/BARD1 e a possibilidade de que as proteínas em questão apresentem características de conformação tridimensional diferentes de quando produzidas de modo completo), escolhemos caracterizar funcionalmente a interação entre BARD1 e BCCIP no contexto de células humanas. Para esse fim, fizemos uso, inicialmente, de um modelo de produção de proteínas de fusão com dois diferentes epítomos de marcação (EGFP e FLAG), minimizando assim possíveis artefatos.

O padrão de produção de GFP-BCCIP foi avaliado em extratos totais, citoplasmáticos e nucleares de células humanas. Curiosamente, a proteína de fusão foi encontrada com peso molecular maior que o esperado, sugerindo uma possível modificação pós-traducional. A proteína quimérica GFP-BCCIP foi encontrada tanto em extrato citoplasmático quanto no extrato nuclear das células HEK293FT (figura 5.2), confirmando a literatura que afirma que BCCIP é uma proteína de localização citoplasmática e nuclear (PHILLIPS-MASON, MOURTON *et al.*, 2008). É interessante notar que, no extrato nuclear, a proteína quimérica se apresenta preferencialmente sob a forma modificada (maior peso molecular). Essa possível modificação pós-traducional será abordada mais adiante.

A participação de BCCIP em complexos com BARD1 foi confirmada em ensaio de *pull-down* utilizando proteínas quiméricas de BCCIP com dois diferentes epítomos de marcação (figura 5.3.1, painel C e figura 5.3.2, painel D).

Dado que a proteína de fusão GST-BARD1 foi produzida em extratos de bactéria e mesmo assim foi capaz de interagir com BCCIP, pode-se inferir que não seja necessária uma modificação pós-traducional para que BARD1 participe do mesmo complexo proteico que BCCIP, mas não se pode excluir a possibilidade de que alguma modificação pós-traducional de BARD1 esteja modulando a sua participação no complexo com BCCIP. Curiosamente, a forma de BCCIP que foi precipitada juntamente com GST-BARD1 apresentou maior peso molecular do que o esperado (forma modificada, figura 5.3.1, painel C), como já mencionado anteriormente.

A região de BARD1 importante para a interação com BCCIP foi mapeada através de ensaio de *pull-down* utilizando a produção de fragmentos de N-terminal (1-413 aa) e C-terminal (310-777 aa) de BARD1 fusionados ao epítopo GST. O ensaio mostra que BCCIP interage preferencialmente com a região C-terminal de BARD1, apesar de se ligar com menor avidéz ao fragmento N-terminal (figura 5.3.2, painel D).

A participação de BCCIP em complexos proteicos com BARD1 também foi confirmada em ensaio de co-imunoprecipitação de proteínas produzidas ectópica e constitutivamente em células humanas.

Interessantemente, a co-imunoprecipitação de GFP-BCCIP/BARD1 demonstrou que uma isoforma de BARD1 (que não contém o domínio RING, porção N-terminal), denominada β -BARD1 (figura 5.4.1, painel A), foi precipitada juntamente com GFP-BCCIP em células HEK293FT (figura 5.4.1, painel D).

A participação de BCCIP em complexo proteico com BARD1 e β -BARD1 foi confirmada através de ensaio de co-imunoprecipitação das proteínas produzidas constitutivamente no extrato nuclear de células da linhagem de câncer de ovário ES2 (figura 5.4.2, painel D). Nesse caso, as isoformas BARD1 e β -BARD1 foram precipitadas juntamente com BCCIP. Pode-se notar que, também nesse ensaio, BCCIP se apresenta na sua forma modificada (maior peso molecular).

A isoforma β -BARD1 já foi descrita como importante para a proliferação de células de uma linhagem de câncer de ovário murino (LI *et al.*, 2007). RYSER *et al.* descrevem β -BARD1 participando de um complexo proteico com BRCA2 e Aurora B no controle da mitose, antes da citocinese (RYSER, DIZIN *et al.*, 2009). É importante destacar que BCCIP foi originalmente descrito por interagir com BRCA2 (LIU, YUAN *et al.*, 2001). Além disso, células de neuroblastoma humano, quando silenciadas para produção de β -BARD1, foram inibidas quanto à proliferação e crescimento independente de ancoragem, por outro lado, foram induzidas à apoptose, sugerindo que a isoforma β de BARD1 possui características de um oncogene, diferentemente da isoforma BARD1 (BOSSE *et al.*, 2012). Curiosamente, BCCIP também foi associado à proliferação de células de neuroblastoma, apesar de ter sido descrito como supressor da iniciação tumoral (HUANG, DAI *et al.*, 2013).

Uma vez que as isoformas BARD1 e β -BARD1 localizam-se em regiões diferentes durante a mitose (RYSER, DIZIN *et al.*, 2009) e BCCIP foi descrito como importante para a citocinese (MENG, FAN, *et al.*, 2007) parece razoável supor que BCCIP participe de complexos com BARD1 e β -BARD1 exercendo diferentes funções, auxiliando BARD1 e contrapondo a ação de β -BARD1.

O padrão de produção de BCCIP tanto de origem ectópica (com dois epítomos de marcação diferentes, EGFP e FLAG) (figuras 5.2 e 5.3.2, painel C) quanto de origem constitutiva (figura 5.4.2, painel A) apresentou uma variação do peso molecular esperado de cerca de 9 kDa, o que nos fez questionar a possibilidade de uma modificação pós-traducional por ubiquitinação.

A monoubiquitinação de BCCIP foi confirmada primeiramente através de rotinas de imunoprecipitação em modelo de produção de proteínas quiméricas GFP-BCCIP e HA-ubiquitina em células HEK293FT (figura 5.5.1, painel C). Posteriormente, a monoubiquitinação foi confirmada por imunoprecipitação utilizando-se o extrato total de proteínas produzidas constitutivamente em células de câncer de ovário ES2 (figura 5.5.1, painel F).

Ao longo do nosso trabalho foram utilizados dois anticorpos distintos anti-BCCIP, inicialmente um anticorpo policloclonal (descontinuado pelo fabricante) e posteriormente um monoclonal (ambos Santa Cruz, Tabela 4.7).

Com a utilização do anticorpo monoclonal, foi possível a identificação das isoformas BCCIP- α e BCCIP- β como mostra a figura 5.5.1, painel D. Essas isoformas possuem os primeiros 258 resíduos de aminoácidos idênticos, diferindo na região C-terminal. Curiosamente, as duas isoformas foram encontradas monoubiquitinadas (figura 5.5.1, painel F), sugerindo que a ubiquitinação possa ocorrer na região em comum entre as duas isoformas. Este é o primeiro relato descritivo da ubiquitinação de BCCIP.

Uma vez que as duas isoformas de BCCIP foram encontradas monoubiquitinadas em células ES2, fomos avaliar o perfil de produção de BCCIP num painel de linhagens de mama e ovário.

A mesma variação no peso molecular de BCCIP foi observada no painel de linhagens avaliado (figura 5.5.2) sugerindo que a monoubiquitinação de BCCIP ocorre como um evento constitutivo em células humanas.

No nosso modelo de estudo, BCCIP foi encontrado modificado (ubiquitinado) e, considerando-se que BARD1 é o principal parceiro de interação de BRCA1, formando um heterodímero com função ubiquitina E3 ligase, avaliamos a possibilidade de BRCA1 participar do mesmo complexo que BCCIP. Desse modo, identificamos que BRCA1 participa de complexo proteico juntamente com BCCIP- α (mas não BCCIP- β) (figura 5.6.1, painel C).

O heterodímero BRCA1-BARD1, enquanto uma E3 ligase, liga monômeros de ubiquitina através de resíduos de lisina 6 (K6). Ao contrário da ubiquitinação canônica que é feita através de resíduos de lisina 48 (K48), a ubiquitinação do tipo K6 não é reconhecida pelo sistema proteossomal e parece estar associada à formação de complexos proteicos e a sinalização celular (OHTA, SATO *et al.*, 2011).

Sabendo da presença de BRCA1 no complexo proteico com BCCIP, fomos avaliar o perfil de produção de BCCIP em linhagens de câncer de mama deficientes em BRCA1 (HCC1937 e SUM1315) a fim de investigar se BRCA1 estaria envolvido na ubiquitinação de BCCIP.

Mesmo nas linhagens deficientes para BRCA1, tanto BCCIP- α quanto BCCIP- β apresentaram pesos moleculares maiores do que os preditos, mostrando que BCCIP continua sendo ubiquitinado mesmo na ausência de BRCA1 funcional.

Apesar de a literatura, em geral, considerar as linhagens HCC1937 e SUM1315 como deficientes para BRCA1 (TOMLINSON *et al.*, 1998; SCULLY *et al.*, 1999; ELSTRODT *et al.*, 2006), as inferências a respeito do comportamento dessas linhagens devem ser feita com algumas ressalvas. A linhagem HCC1937 possui uma inserção de um nucleotídeo na posição 5382 de seu cDNA codificante, o que gera um códon de parada prematura que desestabiliza o domínio tBRCT e está associado à perda de função supressora de tumor de BRCA1 (SCULLY, GANESAN *et al.*, 1999). No entanto a linhagem HCC1937 produz uma forma de BRCA1 truncada que possui o domínio RING íntegro (ELSTRODT, HOLLESTELLE *et al.*, 2006) e, em tese, mantém conservada a função ubiquitina E3 ligase. Já a linhagem SUM1315,

contém uma deleção de dois nucleotídeos na posição 185 de seu cDNA codificante, no entanto seu domínio RING continua sendo produzido (ELSTRODT, HOLLESTELLE *et al.*, 2006) e, hipoteticamente, mantém sua função E3 ligase.

Por certo, BCCIP pode ser alvo de um complexo de ubiquitinação sem a participação do heterodímero BRCA1-BARD1, mas ainda seria prematuro excluir essa possibilidade.

A utilização de modelo de proteína quimérica contendo o domínio RING de BRCA1 seria uma alternativa interessante para avaliar BCCIP como alvo da função ubiquitina E3 ligase de BRCA1, como realizado no estudo da ubiquitinação da proteína claspina por BRCA1 (SATO, SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2012).

A isoforma beta de BCCIP comunga de 19 dos 83 resíduos de aminoácidos de BCCIP- α identificados no ensaio de Y2H (figura 5.1). Além disso, a isoforma beta compartilha com a isoforma alfa da maioria de suas proteínas de interação (MENG, LIU *et al.*, 2004; LU, GUO *et al.*, 2005; MENG, YUE, *et al.*, 2007). A região mínima responsável pela interação entre BCCIP e BRCA1 não foi mapeada, mas seria razoável especular que a região comum, composta pelos 19 resíduos de aminoácidos (240-258 aa), esteja envolvida na interação.

A sequência de reconhecimento de motivos fosforilados pelo tBRCT de BRCA1 é composta pelos resíduos p-SPxF (serina fosforilada, prolina, aminoácido qualquer, fenilalanina) (BORK, HOFMANN *et al.*, 1997; SCULLY, XIE *et al.*, 2004; WANG, 2012). Interessantemente, no segmento que encerra os resíduos de aminoácidos 240-258, presentes nas duas isoformas de BCCIP, há uma sequência EEFF (ácido glutâmico, ácido glutâmico, fenilalanina, fenilalanina) que poderia, hipoteticamente, mimetizar um motivo constitutivamente fosforilado (tendo em vista a carga negativa do ácido glutâmico) e ser reconhecido pelo tBRCT de BRCA1. Essa mesma região contém um motivo conservado entre diferentes ortólogos (figura 6).

<i>A.thaliana</i>	NP_566018.1	266	VFLKPEDELFLLELSSWSFTFPMSQLVT-SQEMKNYQLMGL-----VMAV	309
<i>O.sativa</i>	NP_001051933.1	297	IYPKLEDEIFRELSSWSFTFPIRSEQSA-QQEMKNYKEMGL-----VMAV	340
<i>E.gossypii</i>	NP_985102.1	219	DYFHEEDRHMEK-----YAKICFQ-GPTRK-----GVVPL-YMVL-	251
<i>S.cerevisiae</i>	NP_010648.3	232	DYFHEEDRFFEK-----YAKIHFE-SEAKK-----GVISS-YMIL-	264
<i>K.lactis</i>	XP_454920.1	221	DYFHEEDRFLEK-----LAKVHVD-SEARK-----GLITS-YMVL-	253
<i>S.pombe</i>	NP587696.1	259	MFFHPEDEQFREVAIDYDYPFANQDFN-PDANRVFQDAGIKPQGELLLM	307
<i>M.oryzae</i>	XP363783.1	220	FYFHPPEDEVLQKHALAYGGYPYTKSDESVDASKRAFQEMGVKTQGHMILI	269
<i>N.crassa</i>	XP961976.1	225	QYFHPPEDEMRKHAVGAGTYTFTKEGDS-ADSKRAFQELGVKSQGFMMILI	273
<i>D.rerio</i>	NP001013493.2	234	LFVNDEEEFFYEQATVKFSYCVQDEADSCATGKWSYDDEPMKPFRTVMVI	283
<i>G.gallus</i>	XP423888.1	237	MFANAEEEFFYEENALLKFSYSVQEEEDTCLGGRWSFDDVPMKPLRTVMV	286
<i>M.musculus</i>	NP079668.2	249	MFANAEEEFFYEKAILKFSYSVQGESDTRLGGRWSFDDVPMPLRTVMVI	298
<i>C.lupus</i>	XP535056.2	248	MFANAEEEFFYEKAILKFSYSVQEEEDTCLGGRWSFDDVPMKPLRTVMLI	297
<i>B.taurus</i>	NP001039587.1	239	MFANAEEEFFYEKAILKFNYSVQEEEDTCLGGRWSFDDVPMKPLRTVMLI	288
<i>M.mulatta</i>	XP001087888.2	247	MFANAEEEFFYEKAILKFNYSVQEEEDTCLGGKWSFDDVPMPLRTVMLI	296
<i>H.sapiens</i>	NP510868.1	247	MFANAEEEFFYEKAILKFNYSVQEEEDTCLGGKWSFDDVPMPLRTVMLI	296
<i>P.troglodytes</i>	XP003312867.1	247	MFANAEEEFFYEKAILKFNYSVQEEEDTCLGGKWSFDDVPMPLRTVMLI	296
<i>A.gambiae</i>	XP311766.3	230	IYSNDEEEYFIKIDSCASFYSVQKETTALAGQWQKDEELQPFKRVLLI	279
<i>D.melanogaster</i>	NP650317.3	229	VYTNAEDELSDRAKFSFEYSMASETDSGMSGDWLEGDAVMTPYRKLVL	278

Figura 6. **Alinhamento de ortólogos de BCCIP.** A sequência do cDNA codificante de diferentes ortólogos de BCCIP foi comparada entre diversas espécies e foi identificado um possível motivo de reconhecimento por tBRCT de BRCA1. O putativo motivo de reconhecimento por BRCA1 está destacado em amarelo.

Tendo descrito que BCCIP participa de complexos proteicos associados à BRCA1 e BARD1, procuramos compreender melhor o papel de BCCIP na via de RDD em face dos novos achados moleculares.

Para esse fim, foram desenvolvidas populações derivadas da linhagem de câncer de ovário ES2 com a expressão gênica de *BCCIP* interferida por shRNA (figura 5.6.1). Originalmente, a linhagem ES2 apresenta uma expressão consistente de *BCCIP*, como mostra a figura 5.5.2.

Primeiramente, foram avaliados eventos iniciais na via de reparo de dano ao DNA: ativação de ATM, com a fosforilação do resíduo de serina 1981 e a fosforilação e ubiquitinação de H2AX (substrato da quinase ATM) (SRIVASTAVA *et al.*, 2009).

Ao avaliar ATM, um dos principais reguladores do RDD (ROSEN, 2013), percebemos que a ausência de BCCIP fez com que as células ES2 interferidas para BCCIP apresentassem um perfil de fosforilação de ATM (pós-irradiação) diferente das células shSCR (controle). Enquanto células controle apresentavam um pico de ativação de ATM em 1h seguido da diminuição do sinal, as células shBCCIP se mantinham fosforiladas por até 8h (Figura 5.7.2, painel A). A manutenção da sinalização de dano sugere alguma inadequação no sistema de reparo.

Quando avaliamos o perfil de fosforilação da histona H2AX (pós-irradiação), observa-se um quadro semelhante ao perfil de fosforilação de ATM. O sinal de fosforilação nas células shBCCIP não só persiste, como se mostra mais intenso do que nas células controle (shSCR) (figura 5.7.3, painel A).

Observando a monoubiquitinação de H2AX, percebemos o mesmo perfil de persistência da sinalização de dano ao DNA. A partir de 3 horas os níveis de H2AX monoubiquitinado são maiores nas células interferidas (shBCCIP) e se mantém mesmo 6 horas após a irradiação (figura 5.7.3, painel C).

Na ausência de BCCIP, a sinalização de dano não só permanece por mais tempo como parece estar amplificada (figura 5.7.3, painéis A e C).

Modificações pós-traducionais do tipo ubiquitinação tem sido demonstradas como essenciais aos mecanismos de reparo de dano ao DNA. A ubiquitinação de

histonas H2A e H2AX, efetuada pelas E3 ubiquitina ligases RNF8 e RNF168, é necessária para o recrutamento de RAP80 aos sítios de dano e posterior recrutamento de BRCA1 (HUEN *et al.*, 2007; KIM, CHEN, *et al.*, 2007; WANG e ELLEDGE, 2007).

A manutenção dos eventos de sinalização de dano é forte indicativo da inadequação do reparo, sugerindo a participação de BCCIP nas etapas iniciais de via de RDD.

A avaliação de parâmetros mais tardios na via de RDD, como a progressão do ciclo celular, mostrou que as células interferidas para *BCCIP* apresentam um retardo na cinética da progressão do ciclo após a irradiação (figura 5.7.4) quando comparadas à cinética das células ES2 controle.

Apesar de já ter sido descrito o papel de BCCIP na regulação do ponto de checagem G1/S (ONO, KITaura *et al.*, 2000; MENG, LIU *et al.*, 2004), as alterações no ciclo celular observadas parecem afetar não somente o ponto G1/S, mas também outros pontos de checagem (figura 5.7.4).

Já foi demonstrado que BRCA1 e BARD1 são necessários para a fosforilação de p53 por ATM, modificação essencial para que p53 acumule, ative p21 e efetue o arresto em G1/S (FABBRO, SAVAGE *et al.*, 2004). No entanto, existem outros pontos de checagem responsivos ao dano ao DNA onde há participação de BRCA1, como o intra S e G2/M, todos dependentes do perfil de fosforilação de BRCA1 determinado por ATM (ROSEN, 2013).

Poderíamos especular que, na ausência de BCCIP, há um comprometimento do reparo e isso se reflete no controle do ciclo celular. A participação efetiva de BCCIP em complexos com BRCA1 e BARD1 poderia, ou não, ter um papel efetivo nesse cenário.

A fim de melhor compreender o envolvimento de BCCIP em mecanismos de dano ao DNA, foi conduzida uma varredura de interações proteicas através de TAP-MS. Nesta varredura foram identificados cinco novos possíveis parceiros de interação de BCCIP, dois deles associados respectivamente ao controle do ciclo celular e ao controle da proliferação: MCM3 e MLL2.

MCM3 é uma proteína de 808 resíduos de aminoácidos, que pertence ao complexo de proteínas MCM2-7, exercendo uma função de DNA helicase. O complexo MCM atua tanto no início quanto no alongamento da replicação do DNA (LABIB *et al.*, 2000). O complexo MCM também é importante para o ponto de checagem G1/S e S. MCM3 é um substrato de ATM, sendo fosforilado no resíduo de serina 535 após o dano por irradiação (CORTEZ *et al.*, 2004). Recentemente, foi descrito que MCM8 e MCM9 são responsáveis pelo recrutamento de RAD51 aos sítios de dano ao DNA (PARK *et al.*, 2013). BCCIP participa de complexo com RAD51 e BRCA2 (LU, YUE *et al.*, 2007). Em hipótese, a interação BCCIP-MCM3 poderia ser importante para o recrutamento de RAD51 aos sítios de dano ao DNA.

MLL2, também denominada de MLL4, é uma proteína grande, encerrando de 5537 resíduos de aminoácidos, que atua num complexo proteico com a histona H3 metilase e participa do controle da expressão gênica, regulando a proliferação celular. No câncer de mama MLL2 foi associada ao controle da proliferação e à invasividade tumoral (RABELLO DDO *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014). Curiosamente, essa proteína também interage com PTIP (CHO *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007), uma das proteínas do estudo original de WOODS *et al.*, que contém um tBRCT e que participa da RDD.

Em conjunto, nossos dados colocam BCCIP num novo cenário no RDD, associado à BRCA1 e BARD1 e confirma dados da literatura e participando em outros pontos de checagem além do G1/S. BCCIP pode ser ubiquitinado, entretanto ainda não está definido qual a ubiquitina E3 ligase responsável por essa modificação pós traducional. Células interferidas para a expressão de *BCCIP* têm alterados eventos iniciais da RDD, como ativação de ATM, fosforilação e ubiquitinação de H2AX. A ausência de BCCIP altera a cinética de alterações no ciclo celular em resposta ao dano por irradiação.

7. Conclusões:

Nesse trabalho foi confirmada a interação de BCCIP com BARD1 e, adicionalmente, foi demonstrada a participação de BRCA1 num complexo juntamente com BCCIP.

Foi demonstrado que as isoformas alfa e beta de BCCIP são ubiquitinadas e que somente a forma ubiquitinada de BCCIP- α interage com BRCA1 e BARD1.

Tanto BCCIP α como BCCIP β foram encontrados monoubiquitinados num painel de linhagens de câncer de mama e ovário, sugerindo que o evento de monoubiquitinação é constitutivo em células humanas.

Os efeitos da depleção de BCCIP em vias de reparo de dano ao DNA após o uso de radiação ionizante mostraram alterações nos eventos iniciais da resposta ao dano de DNA: em especial na fosforilação de ATM e H2AX, como também na monoubiquitinação de H2AX.

Além disso, as células deficientes em BCCIP apresentaram um retardo na cinética do ciclo celular responsivo ao dano de DNA, sustentando seu papel crítico na resposta ao dano de DNA, com reflexos no controle do ciclo celular.

Foram descritas cinco novas putativas proteínas de interação com BCCIP, dentre elas MCM3, envolvida no controle do ciclo celular e MLL2, envolvida com controle da proliferação celular.

8 Referências

BAE, I. et al. BRCA1 regulates gene expression for orderly mitotic progression. **Cell Cycle**, v. 4, n. 11, p. 1641-66, Nov 2005.

BAER, R.; LUDWIG, T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 1, p. 86-91, Feb 2002.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, n. 6922, p. 499-506, Jan 30 2003.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. **J Bacteriol**, v. 62, n. 3, p. 293-300, Sep 1951.

BORK, P. et al. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. **FASEB J**, v. 11, n. 1, p. 68-76, Jan 1997.

BOSSE, K. R. et al. Common Variation at BARD1 Results in the Expression of an Oncogenic Isoform That Influences Neuroblastoma Susceptibility and Oncogenicity. **Cancer Res**, v. 72, n. 8, p. 2068-2078, Apr 15 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRZOVIC, P. S. et al. Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5646-51, May 13 2003.

BUISSON, R.; MASSON, J. Y. PALB2 self-interaction controls homologous recombination. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 20, p. 10312-23, Nov 1 2012.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem**, v. 112, n. 2, p. 195-203, Apr 1981.

CAESTECKER, K. W.; VAN DE WALLE, G. R. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 5, p. 575-87, Mar 10 2013.

CALLEBAUT, I.; MORNON, J. P. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. **FEBS Lett**, v. 400, n. 1, p. 25-30, Jan 2 1997.

CANTOR, S. B. et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 149-60, Apr 6 2001.

- CHEN, A. et al. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 24, p. 22085-92, Jun 14 2002.
- CHEN, C. F. et al. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. **J Biol Chem**, v. 271, n. 51, p. 32863-8, Dec 20 1996.
- CHEN, S. et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 6, p. 863-71, Feb 20 2006.
- CHIBA, N.; PARVIN, J. D. The BRCA1 and BARD1 association with the RNA polymerase II holoenzyme. **Cancer Res**, v. 62, n. 15, p. 4222-8, Aug 1 2002.
- CHO, Y. W. et al. PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. **J Biol Chem**, v. 282, n. 28, p. 20395-406, Jul 13 2007.
- CHRISTENSEN, D. E.; BRZOVIC, P. S.; KLEVIT, R. E. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 10, p. 941-8, Oct 2007.
- CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, Oct 22 2010.
- CORTEZ, D.; GLICK, G.; ELLEDGE, S. J. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 27, p. 10078-83, Jul 6 2004.
- DAPIC, V.; CARVALHO, M. A.; MONTEIRO, A. N. Breast cancer susceptibility and the DNA damage response. **Cancer Control**, v. 12, n. 2, p. 127-36, Apr 2005.
- DECHEND, R. et al. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. **Oncogene**, v. 18, n. 22, p. 3316-23, Jun 3 1999.
- DEMING, P. B. et al. The human decatenation checkpoint. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12044-9, Oct 9 2001.
- EASTON, D. F. et al. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet**, v. 52, n. 4, p. 678-701, Apr 1993.
- ELSTRODT, F. et al. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. **Cancer Res**, v. 66, n. 1, p. 41-5, Jan 1 2006.

ENGBRECHT, J.; HEILIG, J. S.; BRENT, R. Preparation of bacterial plasmid DNA. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 10, p. Unit 10 3, May 2001.

ESTELLER, M. et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 7, p. 564-9, Apr 5 2000.

FABBRO, M. et al. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. **J Biol Chem**, v. 277, n. 24, p. 21315-24, Jun 14 2002.

FABBRO, M. et al. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. **J Biol Chem**, v. 279, n. 30, p. 31251-8, Jul 23 2004.

FAN, J. et al. BCCIP is required for the nuclear localization of the p21 protein. **Cell Cycle**, v. 8, n. 18, p. 3019-24, Sep 15 2009.

FONG, P. C. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. **N Engl J Med**, v. 361, n. 2, p. 123-34, Jul 9 2009.

FRIEDBERG, E. C. et al. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. **DNA Repair (Amst)**, v. 5, n. 8, p. 986-96, Aug 13 2006.

FUTREAL, P. A. et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 120-2, Oct 7 1994.

GOLDBERG, M. et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 952-6, Feb 27 2003.

GOODARZI, A. A. et al. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. **EMBO J**, v. 23, n. 22, p. 4451-61, Nov 10 2004.

GRAWUNDER, U.; ZIMMER, D.; LEIBER, M. R. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. **Curr Biol**, v. 8, n. 15, p. 873-6, Jul 16 1998.

GUDMUNDSDOTTIR, K.; ASHWORTH, A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5864-74, Sep 25 2006.

HALL, J. M. et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1684-9, Dec 21 1990.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA repair mechanisms. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 17-22; discussion 22-3, Feb 28 2001a.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-74, May 17 2001b.

HOUVRAS, Y. et al. BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 36230-7, Nov 17 2000.

HSU, L. C.; WHITE, R. L. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 12983-8, Oct 27 1998.

HUANG, Y. Y. et al. BCCIP suppresses tumor initiation but is required for tumor progression. **Cancer Res**, v. 73, n. 23, p. 7122-33, Dec 1 2013.

HUANG, Y. Y. et al. Requirement of mouse BCCIP for neural development and progenitor proliferation. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30638, 2012.

HUEN, M. S. et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 901-14, Nov 30 2007.

HUEN, M. S.; SY, S. M.; CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 138-48, Feb 2010.

IRMINGER-FINGER, I.; LEUNG, W. C. BRCA1-dependent and independent functions of BARD1. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 6, p. 582-7, Jun 2002.

IRMINGER-FINGER, I. et al. Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis. **Mol Cell**, v. 8, n. 6, p. 1255-66, Dec 2001.

IWAI, K.; TOKUNAGA, F. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. **EMBO Rep**, v. 10, n. 7, p. 706-13, Jul 2009.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, Oct 22 2009.

JEFFORD, C. E. et al. Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity. **Oncogene**, v. 23, n. 20, p. 3509-20, Apr 29 2004.

JOWSEY, P. A.; DOHERTY, A. J.; ROUSE, J. Human PTIP facilitates ATM-mediated activation of p53 and promotes cellular resistance to ionizing radiation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55562-9, Dec 31 2004.

KALB, R. et al. BRCA1 Is a Histone-H2A-Specific Ubiquitin Ligase. **Cell Rep**, v. 8, n. 4, p. 999-1005, Aug 21 2014.

KEAN, S. Breast cancer. The 'other' breast cancer genes. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1457-9, Mar 28 2014.

KIM, H.; CHEN, J.; YU, X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1202-5, May 25 2007.

KIM, H.; HUANG, J.; CHEN, J. CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 8, p. 710-5, Aug 2007.

KIM, J. H. et al. UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 74, n. 6, p. 1705-17, Mar 15 2014.

KLEIMAN, F. E. et al. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. **Genes Dev**, v. 19, n. 10, p. 1227-37, May 15 2005.

KREJCI, L. et al. Homologous recombination and its regulation. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 13, p. 5795-818, Jul 2012.

LABIB, K.; TERCERO, J. A.; DIFFLEY, J. F. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1643-7, Jun 2 2000.

LAVIN, M. F.; KOZLOV, S. ATM activation and DNA damage response. **Cell Cycle**, v. 6, n. 8, p. 931-42, Apr 15 2007.

LEE, M. S. et al. Structure of the BRCT repeat domain of MDC1 and its specificity for the free COOH-terminal end of the gamma-H2AX histone tail. **J Biol Chem**, v. 280, n. 37, p. 32053-6, Sep 16 2005.

LEUNG, C. C.; GLOVER, J. N. BRCT domains: easy as one, two, three. **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2461-70, Aug 1 2011.

LI, L. et al. Oncogenic BARD1 isoforms expressed in gynecological cancers. **Cancer Res**, v. 67, n. 24, p. 11876-85, Dec 15 2007.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 65, p. 127-33, 2000.

LIU, J. et al. Alterations of BCCIP, a BRCA2 interacting protein, in astrocytomas. **BMC Cancer**, v. 9, p. 268, 2009.

LIU, J. et al. Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIPalpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2. **Oncogene**, v. 20, n. 3, p. 336-45, Jan 18 2001.

LIU, X. et al. Differential BCCIP gene expression in primary human ovarian cancer, renal cell carcinoma and colorectal cancer tissues. **Int J Oncol**, v. 43, n. 6, p. 1925-34, Dec 2013.

LIU, Z.; WU, J.; YU, X. CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 8, p. 716-20, Aug 2007.

LONGHESE, M. P. et al. DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 9, p. 1127-38, Sep 2 2009.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287-94, Jan 19 2012.

LOU, Z. et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. **Mol Cell**, v. 21, n. 2, p. 187-200, Jan 20 2006.

LU, H. et al. The BRCA2-interacting protein BCCIP functions in RAD51 and BRCA2 focus formation and homologous recombinational repair. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 1949-57, Mar 2005.

LU, H. et al. Essential roles of BCCIP in mouse embryonic development and structural stability of chromosomes. **PLoS Genet**, v. 7, n. 9, p. e1002291, Sep 2011.

LU, H. et al. BCCIP regulates homologous recombination by distinct domains and suppresses spontaneous DNA damage. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 21, p. 7160-70, 2007.

MANDAL, P. K.; BLANPAIN, C.; ROSSI, D. J. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 198-202, Mar 2011.

MANKE, I. A. et al. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 636-9, Oct 24 2003.

MARTIN, R. W. et al. RAD51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common feature of BRCA1-deficient breast tumors. **Cancer Res**, v. 67, n. 20, p. 9658-65, Oct 15 2007.

MENG, X.; FAN, J.; SHEN, Z. Roles of BCCIP in chromosome stability and cytokinesis. **Oncogene**, v. 26, n. 43, p. 6253-60, Sep 20 2007.

MENG, X.; LIU, J.; SHEN, Z. Inhibition of G1 to S cell cycle progression by BCCIP beta. **Cell Cycle**, v. 3, n. 3, p. 343-8, Mar 2004.

MENG, X.; LU, H.; SHEN, Z. BCCIP functions through p53 to regulate the expression of p21Waf1/Cip1. **Cell Cycle**, v. 3, n. 11, p. 1457-62, Nov 2004.

MENG, X. et al. Abrogation of the transactivation activity of p53 by BCCIP down-regulation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 3, p. 1570-6, Jan 19 2007.

MESQUITA, R. D. et al. Tandem BRCT Domains: DNA's Praetorian Guard. **Genes Cancer**, v. 1, n. 11, p. 1140-6, Nov 2010.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, Oct 7 1994.

MILLER, E. M.; NICKOLOFF, J. A. Escherichia coli electrotransformation. **Methods Mol Biol**, v. 47, p. 105-13, 1995.

MIRKOVIC, N. et al. Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition. **Cancer Res**, v. 64, n. 11, p. 3790-7, Jun 1 2004.

MONTEIRO, A. N.; AUGUST, A.; HANAFUSA, H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13595-9, Nov 26 1996.

MONTEIRO, A. N.; AUGUST, A.; HANAFUSA, H. Common BRCA1 variants and transcriptional activation. **Am J Hum Genet**, v. 61, n. 3, p. 761-2, Sep 1997.

MORRIS, J. R. et al. Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 4, p. 599-606, Feb 15 2006.

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO J**, v. 1, n. 7, p. 841-5, 1982.

NISHIKAWA, H. et al. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 3916-24, Feb 6 2004.

OHTA, T.; SATO, K.; WU, W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. **FEBS Lett**, v. 585, n. 18, p. 2836-44, Sep 16 2011.

- ONO, T. et al. TOK-1, a novel p21Cip1-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. **J Biol Chem**, v. 275, n. 40, p. 31145-54, Oct 6 2000.
- OUCHI, T. BRCA1 phosphorylation: biological consequences. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 5, p. 470-5, May 2006.
- OUCHI, T. et al. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 5, p. 2302-6, Mar 3 1998.
- PARK, J. et al. The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 8, p. 1632-44, Apr 2013.
- PATEL, S. R. et al. The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex. **Dev Cell**, v. 13, n. 4, p. 580-92, Oct 2007.
- PAULL, T. T.; LEE, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. **Cell Cycle**, v. 4, n. 6, p. 737-40, Jun 2005.
- PERRETT, C. A.; LIN, D. Y.; ZHOU, D. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. **Front Microbiol**, v. 2, p. 143, 2011.
- PHILLIPS-MASON, P. J. et al. BCCIP associates with the receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu. **J Cell Biochem**, v. 105, n. 4, p. 1059-72, Nov 1 2008.
- PICKART, C. M. Back to the future with ubiquitin. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 181-90, Jan 23 2004.
- RABELLO DDO, A. et al. Altered expression of MLL methyltransferase family genes in breast cancer. **Int J Oncol**, v. 43, n. 2, p. 653-60, Aug 2013.
- RANSBURGH, D. J. et al. Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. **Cancer Res**, v. 70, n. 3, p. 988-95, Feb 1 2010.
- RAPPOLD, I. et al. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. **J Cell Biol**, v. 153, n. 3, p. 613-20, Apr 30 2001.
- REID, L. J. et al. E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 52, p. 20876-81, Dec 30 2008.
- REWARI, A. et al. BCCIP as a prognostic marker for radiotherapy of laryngeal cancer. **Radiother Oncol**, v. 90, n. 2, p. 183-8, Feb 2009.

RICE, J. C.; MASSEY-BROWN, K. S.; FUTSCHER, B. W. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. **Oncogene**, v. 17, n. 14, p. 1807-12, Oct 8 1998.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of BARD1 contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with BRCA1. **Oncogene**, v. 23, n. 10, p. 1809-20, Mar 11 2004.

ROSEN, E. M. BRCA1 in the DNA damage response and at telomeres. **Front Genet**, v. 4, p. 85, 2013.

ROVERSI, G. et al. Identification of novel genomic markers related to progression to glioblastoma through genomic profiling of 25 primary glioma cell lines. **Oncogene**, v. 25, n. 10, p. 1571-83, Mar 9 2006.

ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68-78, Jan 2012.

RYSER, S. et al. Distinct roles of BARD1 isoforms in mitosis: full-length BARD1 mediates Aurora B degradation, cancer-associated BARD1beta scaffolds Aurora B and BRCA2. **Cancer Res**, v. 69, n. 3, p. 1125-34, Feb 1 2009.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-91, Jan 29 1988.

SATO, K. et al. Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v. 279, n. 30, p. 30919-22, Jul 23 2004.

SATO, K. et al. A DNA-damage selective role for BRCA1 E3 ligase in caspase ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. **Curr Biol**, v. 22, n. 18, p. 1659-66, Sep 25 2012.

SCULLY, R. et al. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. **Mol Cell**, v. 4, n. 6, p. 1093-9, Dec 1999.

SCULLY, R.; XIE, A.; NAGARAJU, G. Molecular functions of BRCA1 in the DNA damage response. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 6, p. 521-7, Jun 2004.

SPYCHER, C. et al. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. **J Cell Biol**, v. 181, n. 2, p. 227-40, Apr 21 2008.

SRIVASTAVA, N. et al. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. **Mutat Res**, v. 681, n. 2-3, p. 180-8, Mar-Jun 2009.

STAFF, S.; ISOLA, J.; TANNER, M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 16, p. 4978-83, Aug 15 2003.

STARITA, L. M. et al. BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 19, p. 8457-66, Oct 2004.

STEWART, G. S. et al. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 961-6, Feb 27 2003.

STOLZ, A.; ERTYCH, N.; BASTIANS, H. Loss of the tumour-suppressor genes CHK2 and BRCA1 results in chromosomal instability. **Biochem Soc Trans**, v. 38, n. 6, p. 1704-8, Dec 2010.

STOLZ, A. et al. The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 5, p. 492-9, May 2010.

STRUEWING, J. P. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med**, v. 336, n. 20, p. 1401-8, May 15 1997.

SY, S. M.; HUEN, M. S.; CHEN, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 17, p. 7155-60, Apr 28 2009.

SZABO, C. I.; WORLEY, T.; MONTEIRO, A. N. Understanding germ-line mutations in BRCA1. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 6, p. 515-20, Jun 2004.

TAYLOR, J. et al. An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. **Int J Cancer**, v. 79, n. 4, p. 334-42, Aug 21 1998.

TICHY, E. D.; STAMBROOK, P. J. DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 9, p. 1929-36, Jun 10 2008.

TISCHKOWITZ, M. et al. Pathogenicity of the BRCA1 missense variant M1775K is determined by the disruption of the BRCT phosphopeptide-binding pocket: a multi-modal approach. **Eur J Hum Genet**, v. 16, n. 7, p. 820-32, Jul 2008.

TOMLINSON, G. E. et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. **Cancer Res**, v. 58, n. 15, p. 3237-42, Aug 1 1998.

TSAI, A. G.; LIEBER, M. R. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. **BMC Genomics**, v. 11 Suppl 1, p. S1, 2010.

VIDARSSON, H. et al. BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity. **FEBS Lett**, v. 532, n. 1-2, p. 247-52, Dec 4 2002.

WANG, B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. **Cell Biosci**, v. 2, n. 1, p. 6, 2012.

WANG, B.; ELLEDGE, S. J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 52, p. 20759-63, Dec 26 2007.

WANG, B. et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1194-8, May 25 2007.

WANG, R. H.; YU, H.; DENG, C. X. A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17108-13, Dec 7 2004.

WESTERMARK, U. K. et al. BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 21, p. 7926-36, Nov 2003.

WILLIAMS, R. S.; GREEN, R.; GLOVER, J. N. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 10, p. 838-42, Oct 2001.

WILLIAMS, R. S. et al. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 6, p. 519-25, Jun 2004.

WILSON, C. A. et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. **Nat Genet**, v. 21, n. 2, p. 236-40, Feb 1999.

WOODS, N. T. et al. Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions. **Sci Signal**, v. 5, n. 242, p. rs6, 2012.

WOOSTER, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088-90, Sep 30 1994.

WU-BAER, F. et al. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 34743-6, Sep 12 2003.

WU, L. C. et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nat Genet**, v. 14, n. 4, p. 430-40, Dec 1996.

XU, B.; KIM, S.; KASTAN, M. B. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 3445-50, May 2001.

XU, B. et al. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. **Cancer Res**, v. 62, n. 16, p. 4588-91, Aug 15 2002.

YAN, J.; JETTEN, A. M. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. **Cancer Lett**, v. 271, n. 2, p. 179-90, Nov 28 2008.

YARDEN, R. I. et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. **Nat Genet**, v. 30, n. 3, p. 285-9, Mar 2002.

YU, X.; BAER, R. Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. **J Biol Chem**, v. 275, n. 24, p. 18541-9, Jun 16 2000.

YU, X.; CHEN, J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 21, p. 9478-86, Nov 2004.

YU, X. et al. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 639-42, Oct 24 2003.

YU, X. et al. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. **J Biol Chem**, v. 273, n. 39, p. 25388-92, Sep 25 1998.

ZHANG, F. et al. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 7, p. 1110-8, Jul 2009.

ZHANG, F. et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. **Curr Biol**, v. 19, n. 6, p. 524-9, Mar 24 2009.

ZHANG, X. et al. Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. **EMBO J**, v. 17, n. 21, p. 6404-11, Nov 2 1998.