



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO AO DANO DE DNA

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

RIO DE JANEIRO

MARÇO – 2016

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO AO DANO DE DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho.

RIO DE JANEIRO

MARÇO - 2016

N439a Nepomuceno, Thales da Costa.

Avaliação do papel de CDK9 no reparo ao dano de DNA / Thales da Costa Nepomuceno. - Rio de Janeiro, 2016.

85 p.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho.

1. Reparo do DNA. 2. Neoplasias. 3. Genes BRCA1. 4. BARD1. 5. Quinase 9 Dependente de Ciclina. I. Carvalho, Marcelo Alex de (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 572.86

THALES DA COSTA NEPOMUCENO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO AO DANO DE DNA

BANCA EXAMINADORA:

Franklin D. Rumjanek – IBqM/UFRJ

João P. B. Viola – Biologia Celular/INCA

Marcelo A. Soares – Genética/INCA

Francisco M. B. de Oliveira – IBCCF/UFRJ

Leonardo K. Teixeira – Biologia Celular/INCA

RIO DE JANEIRO

MARÇO – 2016

“To business that we love we rise betimes and go to 't with delight”

William Shakespeare (1564-1616)

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado é o resultado de um trabalho que seria impossível ser realizado individualmente.

Gostaria de agradecer principalmente a meus pais por toda dedicação, incentivo e suporte. Sem eles, eu não seria nada. Estendendo esse agradecimento a meu irmão e ao Gerson.

À minha namorada, Bárbara Peixoto, por todo incentivo, compreensão, amor e principalmente paciência. Obrigado pela dedicação, certamente não teria chegado aonde cheguei se não fosse você.

A meu orientador, Marcelo Alex, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança depositada em mim. Obrigado por me ensinar a "fazer ciência" sempre com a preocupação que vai além da qualidade de minha formação acadêmico-científica. Sendo para mim, um exemplo de dedicação e ética profissional.

Ao professor Guilherme Kurtz, por possibilitar e apoiar o desenvolvimento desse trabalho no laboratório de Farmacologia do INCA.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos e companheiro de bancada que passaram pelo laboratório, Renato Carvalho e João Sellos. Obrigado pelos ensinamentos e muitos momentos de descontração.

Especialmente ao aluno de iniciação científica Thiago Torres, espero que você tenha aprendido e se divertido tanto quanto eu.

Certamente o mestrado não teria sido o mesmo sem os amigos de laboratório, Vanessa Fernandes, Giulina De Gregoris, Mateus Fuchshuber, Renata Barbosa e Dionathan Stuber. Vocês tornam o dia-a-dia de laboratório muito mais agradável.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para minha formação.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO AO DANO DE DNA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thales da Costa Nepomuceno

RESUMO

*BRCA1 (BR*east *C*ancer *1*) foi o primeiro gene supressor de tumor relacionado à susceptibilidade ao câncer de mama; a proteína homônima desempenha importante papel resposta ao dano de DNA (RDD). *BRCA1* encerra dois domínios BRCT em tandem (tBRCT) em sua região C-terminal, que se comportam como uma única unidade estrutural com a capacidade de reconhecer e se ligar a fosfopeptídeos. As 12 proteínas que encerram domínios tBRCT, codificadas pelo genoma humano, encontram-se envolvidas com vias de RDD. Em 2012, nosso grupo descreveu uma rede de interação proteica que identificou putativos parceiros de interação de sete domínios tBRCTs de diferentes proteínas. A cinase CDK9 foi identificada como putativa parceira de interação com os tBRCTs de *BRCA1* e *BARD1* (principal parceiro de interação de *BRCA1*). CDK9 participa, como unidade catalítica, do complexo b de alongamento da transcrição (P-TEFb), além de apresentar um papel importante na resposta ao estresse replicativo. Nosso objetivo nesse trabalho foi caracterizar essas interações no contexto da RDD. A confirmação das interações observadas foi realizada através de ensaios de interação proteína-proteína (*GST-pulldown* e rotinas de co-imunoprecipitação em células humanas). O recrutamento de CDK9 para sítios de dano ao DNA, no contexto de RDD, foi analisado por microscopia confocal. Para a caracterização funcional das interações observadas, células humanas da linhagem MCF7 tiveram a expressão de CDK9 reduzida através do silenciamento gênico por RNA de interferência (shRNA). As células interferidas foram avaliadas quanto a capacidade de recrutamento de *BRCA1* e γ -H2AX para os sítios de dano ao DNA, novamente por microscopia confocal. Também foram avaliados os níveis de recombinação homóloga e não homóloga, bem como a sensibilidade à irradiação ionizante por citometria de fluxo e ensaios de formação de colônia, respectivamente. Fomos capazes de evidenciar que CDK9 interage constitutivamente com *BARD1* e *BRCA1* em linhagens de células humanas. Demonstramos que a organização nuclear de CDK9 é alterada mediante dano ao DNA por radiação ionizante. Paralelamente, nossos dados demonstram que células com níveis reduzidos de CDK9 não são capazes de reparar danos ao DNA por recombinação homóloga de maneira eficaz, enquanto o reparo por recombinação não homóloga não se mostrou alterado. Interessantemente, CDK9 se mostrou importante para o recrutamento de *BRCA1* para os sítios de dano ao DNA, bem como para a cinética de resolução dos focos de γ -H2AX induzidos por radiação ionizante. Esse cenário corrobora a hipótese de que CDK9 encontra-se diretamente envolvida com a RDD através da via de recombinação homóloga.

Palavras-chave: Câncer, Reparo ao dano de DNA, *BRCA1*, *BARD1*, CDK9



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CDK9 NO REPARO AO DANO DE DNA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thales da Costa Nepomuceno

ABSTRACT

BRCA1 (BReast CAncer 1) was the first tumor suppressor gene related to breast cancer susceptibility; the homonymous protein plays an important role in the DNA damage response (DDR). *BRCA1* encloses two tandem BRCT (tBRCT) domains in its C-terminal region, that act as a single structural unit being able to recognize and bind to phosphopeptides. The 12 tBRCT-containing proteins, encoded by the human genome, are linked to DDR pathways. In 2012, our group described the protein interaction network and identified putative interaction partners of seven different tBRCT-containing proteins. The kinase CDK9 was identified as a putative interaction partner of *BRCA1* and *BARD1* (major *BRCA1* interaction partner) tBRCTs. CDK9 is the catalytic unit of the positive transcription elongation complex b (P-TEFb), and plays an important role in the replication stress response. This work's goal is the characterization of these interactions in the DDR context. All interactions were confirmed using protein-protein interaction analysis (GST-pulldown and co-immunoprecipitation assays in human cells). The CDK9 recruitment to DNA damage sites in a DDR context was examined using confocal microscopy. To function characterize these interactions, the human cell line MCF7 was silenced using the interfering RNA methodology (shRNA). We also examined the recruitment of *BRCA1* and γ -H2AX to DNA damage sites in these cells using confocal microscopy. Homologous recombination and non homologous end-joining were evaluated to assess the DNA damage repair status, as well as the sensibility to ionizing radiation. Here we show that CDK9 interacts with *BARD1* and *BRCA1* constitutively produced in human cell lines. We also demonstrate that CDK9 nuclear localization is altered by ionizing radiation-mediated DNA damage. At the same time, our data shows that cells lacking CDK9 expression are not capable of repairing DNA damage through homologous recombination, while the non homologous end-joining repair is not altered. Interestingly, CDK9 is important for the proper recruitment of *BRCA1* to DNA damage sites, and for the resolution dynamics of ionizing radiation-mediated γ -H2AX foci. This scenario supports the idea that CDK9 is directly involved in the DDR via the homologous recombination pathway.

Key words: Cancer, DNA damage repair, *BRCA1*, *BARD1*, CDK9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação esquemática das características adquiridas durante o processo tumorigênico.....	02
Figura 1.2 Representação esquemática do papel da instabilidade genômica na tumorigênese de cânceres hereditários e esporádicos.....	04
Figura 1.3 Representação esquemática do mecanismo de direcionamento do reparo por recombinação homóloga ou não homóloga nas diferentes fases do ciclo celular.....	07
Figura 1.4 Representação esquemática dos mecanismos de reparo de quebra de dupla fita.....	09
Figura 1.5 Representação da estrutura proteica de BRCA1 (em escala).....	11
Figura 1.6 Representação da estrutura proteica de BARD1 (em escala) com BRCA1.....	14
Figura 1.7 Rede de interação proteica do domínio tBRCT.....	17
Figura 1.8 Representação esquemática do papel de CDK9 no processo de alongamento durante a transcrição gênica.....	19
Figura 1.9 Representação esquemática dos diferentes papéis de CDK9, proposto por Yu e colaboradores (2011).....	21
Figura 1.10 Representação esquemática da região gênica de <i>CDK9</i> e de seus produtos.....	22
Figura 4.1 Representação esquemática das construções plasmidial gerados e seus produtos proteicos.....	27
Figura 4.2. Representação esquemática dos vetores plasmidias cedidos e seus produtos proteicos.....	29
Figura 4.3 Representação esquemática dos ensaios de avaliação de mecanismos de reparo.....	40
Figura 5.1 Representação esquemática da identificação de CDK9 como putativa parceira de interação dos domínios tBRCT de BRCA1, BARD1 e PTIP.....	44
Figura 5.2 CDK9 interage contitativamente com BARD1.....	46
Figura 5.3 BARD1 é capaz de interagir com ambas isoformas de CDK9.....	48

Figura 5.4 CDK9 interage contitativamente com BRCA1.....	50
Figura 5.5 O domínio tBRCT de BRCA1 interage somente com a isoforma 42k de CDK9.....	51
Figura 5.6 CDK9 forma focos mediante dano ao DNA, que colocizam com BRCA1.....	53
Figura 5.7 Perfil de produção das isoformas de CDK9 em linhagens humanas e células transduzidas com partículas lentivirais.....	55
Figura 5.8 CDK9 modula o reparo por recombinação homóloga.....	57
Figura 5.9 CDK9 modula o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA.....	59
Figura 5.10 Perfil de produção de BRCA1 e BARD1 nas células com a expressão gênica de <i>CDK9</i> silenciada.....	60
Figura 5.11. Células silenciadas para CDK9 apresentam a cinética de resolução dos <i>foci</i> de γ H2AX alterado.....	62
Figura 5.12 A redução dos níveis de CDK9 geram um fenótipo de sensibilidade à radiação ionizante.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	25
Quadro 4.2. Lista dos anticorpos primários utilizados.....	35
Quadro 4.3. Lista dos anticorpos secundários utilizados.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

53BP1 – *p53 binding protein 1*

aa – aminoácido (s)

Ala – alanina (aminoácido)

Arg – arginine (aminoácido)

ATM- *Ataxia Telangiectasia Mutated*

BACH1 – *BTB and CNC homology 1*

BARD1 – *BRCA1-associated RING Domain Protein 1*

BRCA1- *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*

BRCA2 – *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*

BRCT – *BRCA1 C-terminal*

CDK – *cyclin-dependent kinase*

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CHEK2 – *Checkpoint Kinase 2*

CoIP – coimunoprecipitação

CtIP – *C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein*

D.O. – densidade óptica

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNA-PKcs – *DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit*

ECT2 - *Epithelial Cell Transforming sequence 2*

EDTA - ácido etilenodiamina tetraacético

EXO1 – *Exonuclease 1*

g – gravidade ($g = 9,8 \text{ cm/s}^2$)

Glu – glutamina (aminoácido)

GST – Glutathione S-Transferase

H2A – Histona H2A

H2AX – Variante X da histona H2A

HR – *homologous recombination*

IG – instabilidade genômica

IgG – imunoglobulina G

Ile – isoleucina (aminoácido)

KAT5 - *K(Lysine) Acetyltransferase 5*

kb - quilobases

kV - quilovolts

Leu – leucina (aminoácido)

M - molar

MDC1 – *Mediator of DNA-damage Checkpoint 1*

min – minuto (s)

mL - mililitro

mM - milimolar

MRE11 - *Meiotic Recombination 11 Homolog*

NBS1 - *Nijmegen Breakage Syndrome 1*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NHEJ – *non-homologous end joining*

nm - nanômetros

p/v – peso por volume

PALB2 - *Partner and Localizer of BRCA2*

PBS – tampão fosfato-salino

pH – potencial hidrogeniônico

Pro – prolina (aminoácido)

PTIP - *Pax Transactivation-Domain Interacting Protein*

Rb - retinoblastoma

RDD – resposta ao dano de DNA

RING – *Real Interesting New Gene* (domínio protéico)

RNA – ácido ribonucleico

RNF8 – *Ring-finger Protein 8*

RPA – *Replication Protein A*

SDS – dodecil sulfato de sódio

TAP-MS – *Tandem Affinity Purification – Mass Spectrometry*

tBRCT – *tandem BRCT*

Thr – treonina (aminoácido)

TP53 – *Tumor Protein p53*

v/v – volume por volume

XRCC1/4 - *X-ray Repair Cross-Complementing protein 1/4*

μm - micrômetros

μmol – micromol

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

H₂O - água

HCl – ácido clorídrico

KCl- cloreto de potássio

KOH – hidróxido de potássio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

Na₂H₂PO₄ – di-hidrogenofosfato de sódio

Na₂PO₄ – fostato dissódico

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1. O câncer.....	01
1.2. O papel da instabilidade genômica na tumorigênese.....	03
1.3. Os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita de DNA.....	05
1.3.1. Recombinação homóloga.....	08
1.3.2. Recombinação não homóloga por junção de pontas.....	10
1.4. BRCA1.....	10
1.5. BARD1.....	13
1.6. Domínios BRCT em tandem no genoma humano.....	15
1.7. CDK9.....	18
2. Objetivo geral.....	23
3. Objetivos específicos.....	23
4. Materiais e métodos.....	24
4.1. Construções plasmidiais.....	24
4.2. Sequenciamento automático.....	28
4.3. Cultivo de bactérias.....	28
4.3.1. Cepas de bactérias utilizadas.....	28
4.3.2. Preparo de bactérias competentes.....	30
4.3.3. Transformação bacteriana.....	30
4.3.4. Extração de DNA plasmidial.....	30
4.3.5. Expressão condicional em bactérias.....	31
4.3.6. Extração de proteínas de bactérias.....	31
4.4. Cultura de células humanas.....	32

4.4.1. Transfecção de células humanas.....	32
4.5. Extração de proteínas de células humanas.....	33
4.5.1. Extração de proteínas totais.....	33
4.5.2. Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares.....	33
4.6. Ensaio de interação proteína-proteína.....	34
4.6.1. Coimunoprecipitação de proteínas.....	34
4.6.2. GST <i>pulldown</i>	34
4.7. <i>Immunoblotting</i>	36
4.8. Silenciamento da expressão gênica de <i>CDK9</i>	38
4.8.1. Geração de partículas lentivirais.....	38
4.8.2. Transdução viral.....	38
4.9. Ensaio de avaliação de mecanismos de raparo.....	39
4.10. Análise por microscopia confocal.....	41
4.11. Ensaio de viabilidade celular.....	42
4.12. Análise estatística.....	42
5. Resultados.....	43
5.1. Identificação de CDK9 como alvo de estudo.....	43
5.2. Confirmação da interação entre CDK9 e BARD1.....	45
5.3. Confirmação da interação entre CDK9 e BRCA1.....	49
5.4. Análise da localização subcelular de CDK9 após dano ao DNA.....	52
5.5. Análise do perfil proteico de CDK9 em células humanas.....	54
5.6. Análise do reparo de quebra de dupla fita de DNA nas células com a expressão gênica de <i>CDK9</i> silenciada.....	56
5.7. Análise do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano de DNA na ausência de CDK9.....	58

5.8. Análise da cinética de formação de focos de γ H2AX nas células silenciadas para <i>CDK9</i>	61
5.9. Avaliação da sensibilidade de células interferidas para <i>CDK9</i> à radiação ionizante.....	63
6. Discussão.....	65
7. Conclusões.....	73
8. Bibliografia.....	74

1. Introdução

1.1. O câncer

O câncer é um problema de saúde pública mundial, afetando cerca de 14 milhões de pessoas a cada ano em todo mundo, com aproximadamente 8,2 milhões de mortes, segundo dados da GLOBOCAN para o ano de 2012 (GLOBOCAN 2012: *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* – obtido através do sítio <http://www.globocan.iarc.fr/>). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, estima-se para o ano de 2016, a ocorrência de cerca de 596 mil novos casos, demonstrando o desafio para a saúde pública que está associado à doença (Estimativa 2016 de Incidência de Câncer no Brasil – obtido através do sítio <http://www.inca.gov.br/>).

Atualmente, entendemos os tumores sólidos como uma massa celular altamente heterogênea, compostas por células neoplásicas (diferentes entre si) e células normais (compostas principalmente por células da imunidade e do sistema vascular) (GERLINGER, M. *et al.*, 2012).

A complexidade da biologia tumoral está associada às diferentes características adquiridas pelas células no decorrer da evolução da doença. Segundo Hanahan e Weinberg (2000), a aquisição do fenótipo neoplásico baseia-se na alteração de diversas vias biológicas que culminam na perda de controle da proliferação. Essas alterações foram elencadas como características comuns ao câncer, dentre as quais encontram-se a capacidade de sustentar a proliferação mesmo em microambientes desfavoráveis, assim como suprimir estímulos anti-proliferativos. Além da capacidade de evadir dos mecanismos de morte celular (ativados com a intenção de conter a proliferação exacerbada), apresentarem capacidade proliferativa infinita, e de sustentarem o processo de angiogênese (HANAHAN, D. e WEINBERG, R., 2000).

Recentemente, os mesmos autores elencaram duas novas características (“desregulação metabólica” e a “capacidade de evadir do sistema imune”), assim como duas propriedades promotoras da tumorigênese: “promoção da inflamação” e “instabilidade genômica” (**Figura 1.1**) (HANAHAN, D. e WEINBERG, R., 2011).

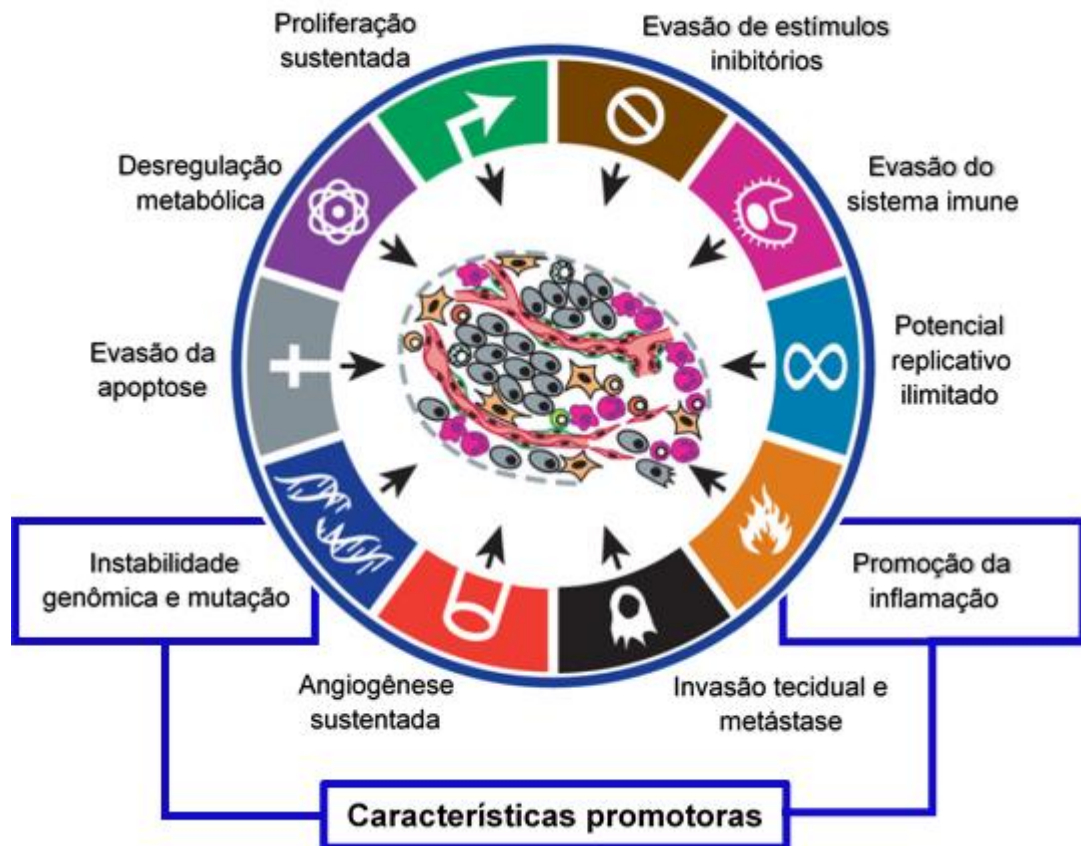


Figura 1.1 Representação esquemática das características adquiridas durante o processo tumorigênico. O esquema representa as diferentes marcas do câncer sugeridas por Hanahan e Weinberg (2011), ressaltando duas características promotoras da tumorigênese ("instabilidade genômica e mutação" e "promoção da inflamação"). Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

1.2 O papel da instabilidade genômica na tumorigênese

A instabilidade genômica (IG), definida como aumento da frequência de alterações genéticas em uma célula, está presente na grande maioria dos tumores, porém não se sabe ao certo em qual momento da tumorigênese ela se faz necessária. Por outro lado, sabe-se que a IG está intrinsecamente ligada à aquisição das diferentes características do câncer discutidas na sessão anterior, tendo em vista que o aumento da frequência de alterações genéticas está diretamente relacionado com o ganho de vantagens seletivas (NEGRINI, S. *et al.*, 2010).

Em casos de câncer hereditário, o desenvolvimento da IG está intimamente associado a mutações em genes envolvidos com vias de reparo ao dano de DNA, como por exemplo na síndrome de Lynch, onde as células apresentam mutações nos genes da família *MSH*, envolvidos com o reparo de pareamento errôneo (FISHEL, R. *et al.*, 1993; LEACH, F. *et al.*, 1993). Outro exemplo emblemático é a predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, atribuídos às mutações nos genes envolvidos com o reparo de quebra de dupla fita, *BRCA1* e *BRCA2* (KENNEDY, R. e D'ANDREA, A., 2006; RIPPERGER, T. *et al.*, 2009). Essas evidências em casos de câncer hereditário corroboram a hipótese do fenótipo mutador, onde a ocorrência de um evento mutacional acarretaria na perda de heterozigose do gene de reparo em questão que, conseqüentemente, seria responsável por estabelecer a IG, favorecendo o acúmulo de mutações e a tumorigênese (**Figura 1.2A**).

Porém, estudos recentes demonstraram que o genoma de diferentes tumores esporádicos (virgens de tratamento) apresentam baixa frequência de mutações em genes sabidamente envolvidos com a manutenção da estabilidade genômica (PARSONS, D. *et al.*, 2008). Por outro lado, o aumento de frequência de mutações nestes genes, observado em casos de glioblastomas, quando comparados casos pós e pré-tratamento, sugerem o surgimento tardio do fenótipo de IG, que se encontra associado de alguma forma com a resposta ao tratamento (PARSONS, D. *et al.*, 2008).

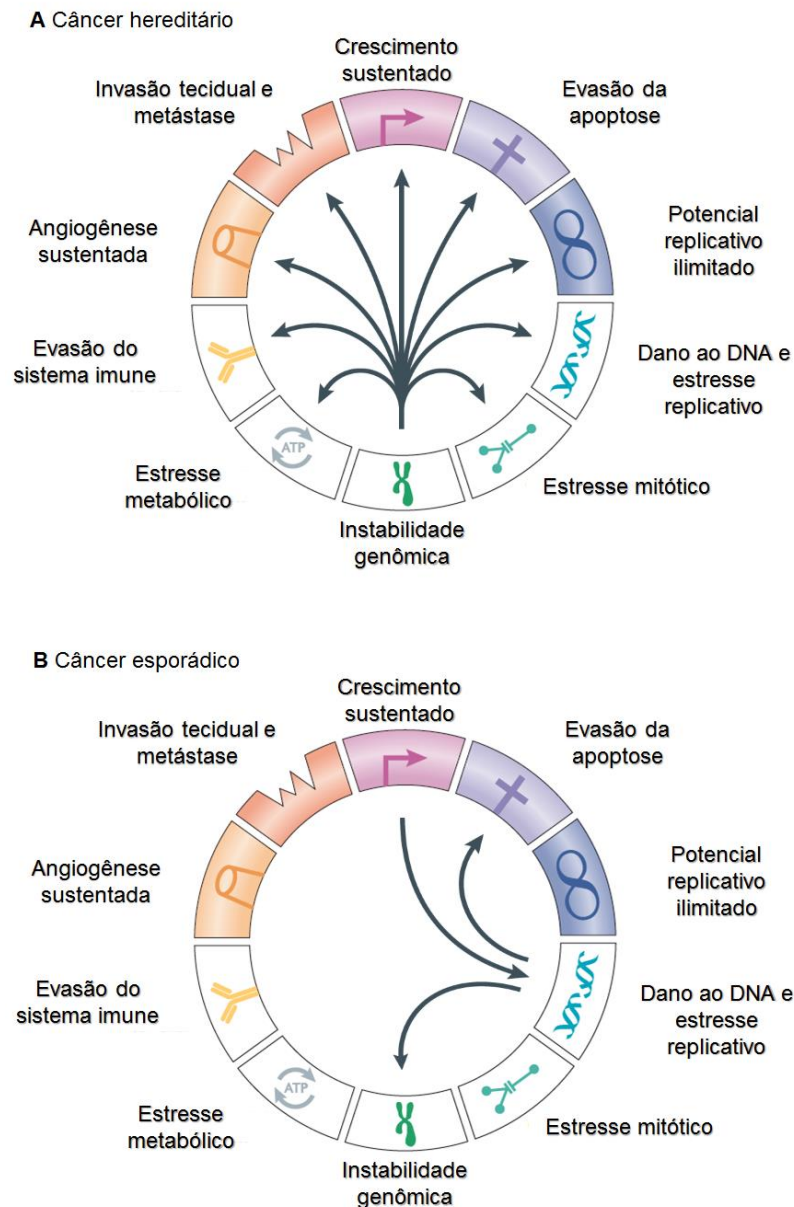


Figura 1.2 Representação esquemática do papel da instabilidade genômica na tumorigênese de cânceres hereditários e esporádicos. (A) Representação do papel inicial desempenhado pela instabilidade genômica em tumores de origem hereditária, por mutações em genes relacionados a vias de manutenção da integridade genômica. (B) Representação do papel da instabilidade genômica em tumores de origem esporádica, através de alterações geradas por estresse replicativo que culmina no desenvolvimento do fenótipo de instabilidade genômica. (Negrini, S., 2010)

Segundo Halazonetis e colaboradores (HALAZONETIS, *et al.*, 2008), o perfil de IG em cânceres de origem esporádica, poderia ser explicado pelo aumento do estresse replicativo causado pela ativação de oncogenes, que, em última análise levaria ao fenótipo de IG (**Figura 1.2B**).

1.3 Os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita de DNA

Dentro dessa problemática, o reparo de danos ao DNA é um processo altamente relevante no controle da estabilidade genômica e consequente supressão tumoral. O DNA de nossas células encontra-se constantemente sujeito a danos, que podem ter origem exógena, como agentes químicos e a radiação ionizante, ou endógena, oriundos de erros do processo de replicação ou reações químicas que ocorrem naturalmente no microambiente intracelular (deaminações, por exemplo). Em decorrência do processo evolutivo, foram selecionados mecanismos moleculares capazes de detectar e reparar esses erros (FRIEDBERG, E., 2003). Em eucariotos, os mecanismos de resposta ao dano de DNA (RDD) estão intimamente relacionados com o controle da progressão do ciclo celular, impedindo que células com DNA danificado se propaguem (KASTAN, M. e BARTEK, J., 2004).

Dentre os diferentes tipos de lesão que podem ocorrer no DNA, encontram-se as quebras de fita simples, formação de adutos, alquilação e oxidação de bases nitrogenadas além de quebras de fita dupla, sendo a última considerada a mais tóxica, por permitir a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Cada um destes tipos de dano requer processos distintos de reparo, porém apresentam alguns elementos redundantes entre as diferentes vias (LORD, C. e ASHWORTH, A., 2012).

De uma forma geral, os mecanismos de RDD são compostos por múltiplas etapas enzimáticas, onde deve ocorrer o reconhecimento da lesão, ressecção da região, ou nucleotídeo/base, danificada e posteriormente sua resolução. A resolução de quebras da dupla fita é efetuada majoritariamente por dois mecanismos: a recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR) ou a recombinação não homóloga por junção de pontas (*Non-Homologous End Joining* – NHEJ). O reparo de alta fidelidade por HR ocorre de forma dependente do ciclo celular, acontecendo preferencialmente nas fases S e G₂, uma vez que utiliza a sequência homóloga da cromátide irmã como molde para o reparo. Por outro lado, o reparo por NHEJ ocorre de forma ubíqua ao longo do ciclo celular (BRANZEI, D. e FOIANI, M., 2008).

O direcionamento do mecanismo de reparo utilizado para resolução da quebra de dupla fita, nas diferentes fases do ciclo celular em que tanto HR e NHEJ podem ocorrer, baseia-se na etapa de ressecção ou não da fita lesionada, favorecendo o reparo por HR ou NHEJ, respectivamente. De forma geral o reparo se inicia com o reconhecimento da lesão pelo complexo MRN, composto pelas proteínas **Mre11**, **RAD51** e **NBS1** (PAULL, T. *et al.*, 2000), que é responsável pela ativação da cinase ATM que, por sua vez, catalisa a fosforilação do variante X da histona H2A (H2AX) no resíduo de serina na posição 139. O acúmulo da forma fosforilada da histona H2AX (γ H2AX) nos sítios de dano ao DNA coordena o recrutamento de diferentes proteínas para essas regiões, como MDC1. Quando recrutada para os sítios de dano ao DNA, MDC1 interage com ATM e NBS1, em um processo que exerce um efeito regulador positivo na ativação de ATM e consequente fosforilação de H2AX, causando uma amplificação do sinal de reconhecimento da lesão (LOU, Z. *et al.*, 2006).

Além de ser responsável pela amplificação do sinal de reconhecimento do dano do DNA por quebra de dupla fita, MDC1 também é um alvo de fosforilação por ATM, e neste estado interage com a E3 ubiquitina ligase RNF8, que é responsável pela polimerização de cadeias de ubiquitina nas histonas H2A e H2AX. Quando ubiquitinadas, essas histonas são reconhecidas por outra E3 ubiquitina ligase, denominada RNF168 que, por sua vez, ubiquitina o resíduo de lisina na posição 15 da histona H2A, que em conjunto com a metilação no resíduo de lisina na posição 20 da histona H4, é responsável pelo recrutamento de 53BP1 para os sítios de dano. Na fase G1 do ciclo celular, juntamente com PTIP e RIF1, 53BP1 favorece o reparo por NHEJ, através da inibição do recrutamento de BRCA1 e, consequentemente, a ressecção efetiva da fita lesionada (PANIER, S e BOULTON, S., 2014) (**Figura 1.3**).

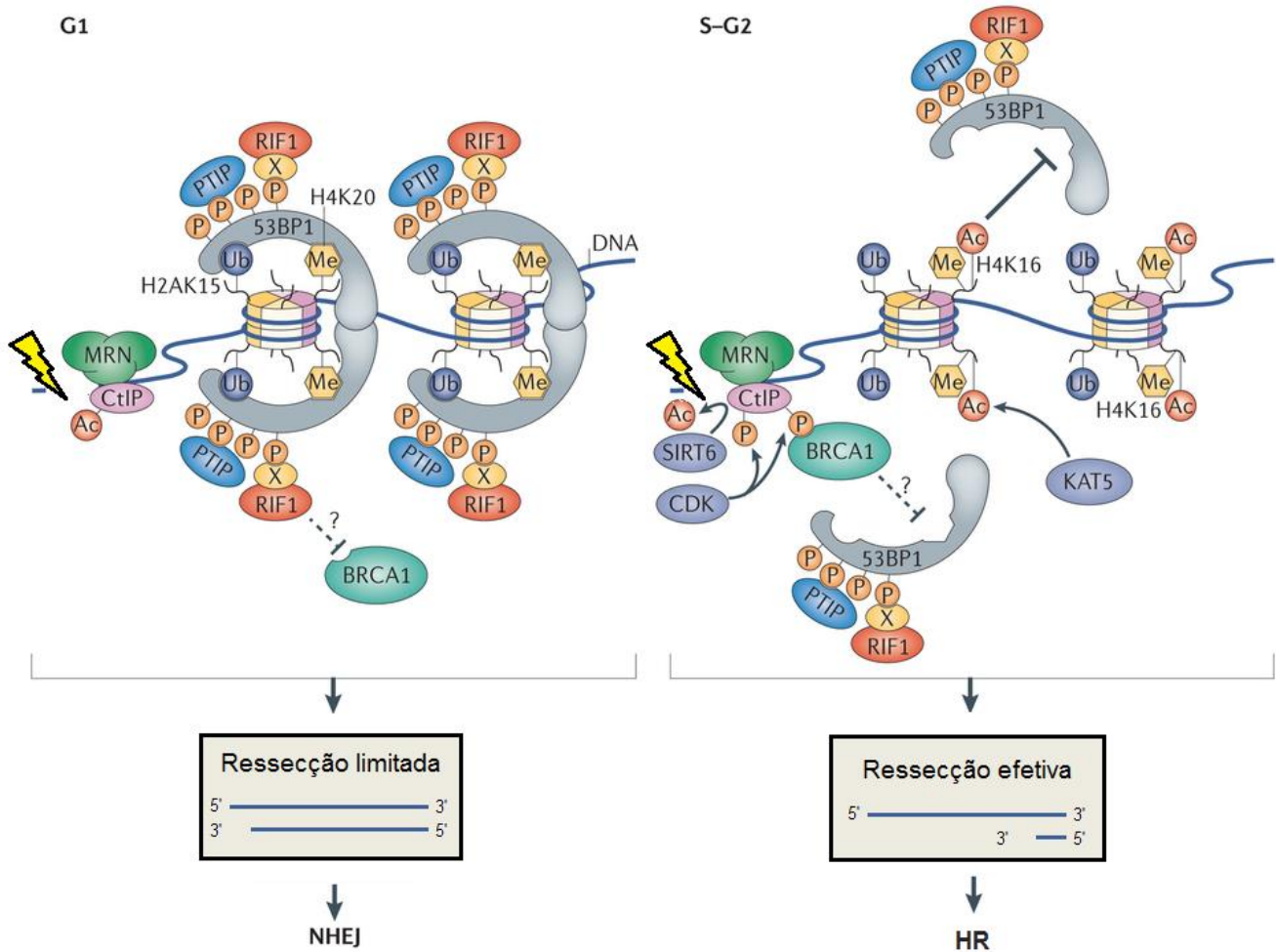


Figura 1.3 Representação esquemática do mecanismo de direcionamento do reparo por recombinação homóloga ou não homóloga nas diferentes fases do ciclo celular. Durante a fase G1 do ciclo celular, o recrutamento de 53BP1 é favorecido pela ubiquitinação no resíduo de lisina na posição 15 da histona H2A, que culmina na inibição do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano, além da inibição de CtIP por mecanismos de modificação pós-traducional (acetilação), acarretando na ressecção limitada das fitas lesionadas que, por sua vez, favorece o reparo por NHEJ. Por outro lado, durante as fases S e G2, o recrutamento de 53BP1 é inibido por diferentes mecanismos: como a acetilação no resíduo de lisina na posição 16 da histona H4, mediado pela proteína KAT5, e por BRCA1, ativado por fosforilação, assim como CtIP que, quando em conjunto com BRCA1, atuam favorecendo a ressecção efetiva das fitas lesionadas, estimulando o reparo por HR. Adaptado de Panier e Boulton, 2013.

Durante as fases S e G2 do ciclo celular, o processo de ressecção é favorecido pelo recrutamento do complexo BRCA1/CtIP através do complexo MRN. MRE11 e CtIP cooperam para que ocorra a retirada dos primeiros nucleotídeos (que variam de 50 a 500) no sentido 5'-3' da fita lesionada. Posteriormente, a exonuclease EXO1, procede com a retirada de até 5kb, permitindo assim o recrutamento da proteína RPA, que realiza o capeamento da simples fita gerada, inibindo a ação de nucleases e favorecendo o reparo por HR. Durante a fase G1, além do papel desempenhado por 53BP1, os níveis proteicos de BRCA1 encontram-se reduzidos, desfavorecendo a ressecção inicial e, conseqüentemente, favorecendo o reparo por NHEJ (CRUZ-GARCÍA, A. *et al.*, 2014) (**Figura 1.3**).

1.3.1 Recombinação homóloga

As etapas posteriores à ressecção das fitas, durante o reparo por HR, não estão completamente elucidadas. De forma geral, sabe-se que a proteína RAD51 desempenha um papel fundamental para que ocorra a busca e invasão da fita homóloga nas etapas finais da HR. Somente após o carregamento de RPA nas fitas simples, geradas pela etapa de ressecção, ocorre a troca dos filamentos de RPA por RAD51, através do complexo composto por BRCA1, PALB2 e BRCA2. RAD51 promove a formação da estrutura conhecida como *D-loop*, durante a síntese dependente da fita homóloga, etapa fundamental para que o reparo por HR ocorra de forma fiel (THOMPSON, L., 2012) (**Figura 1.4**).

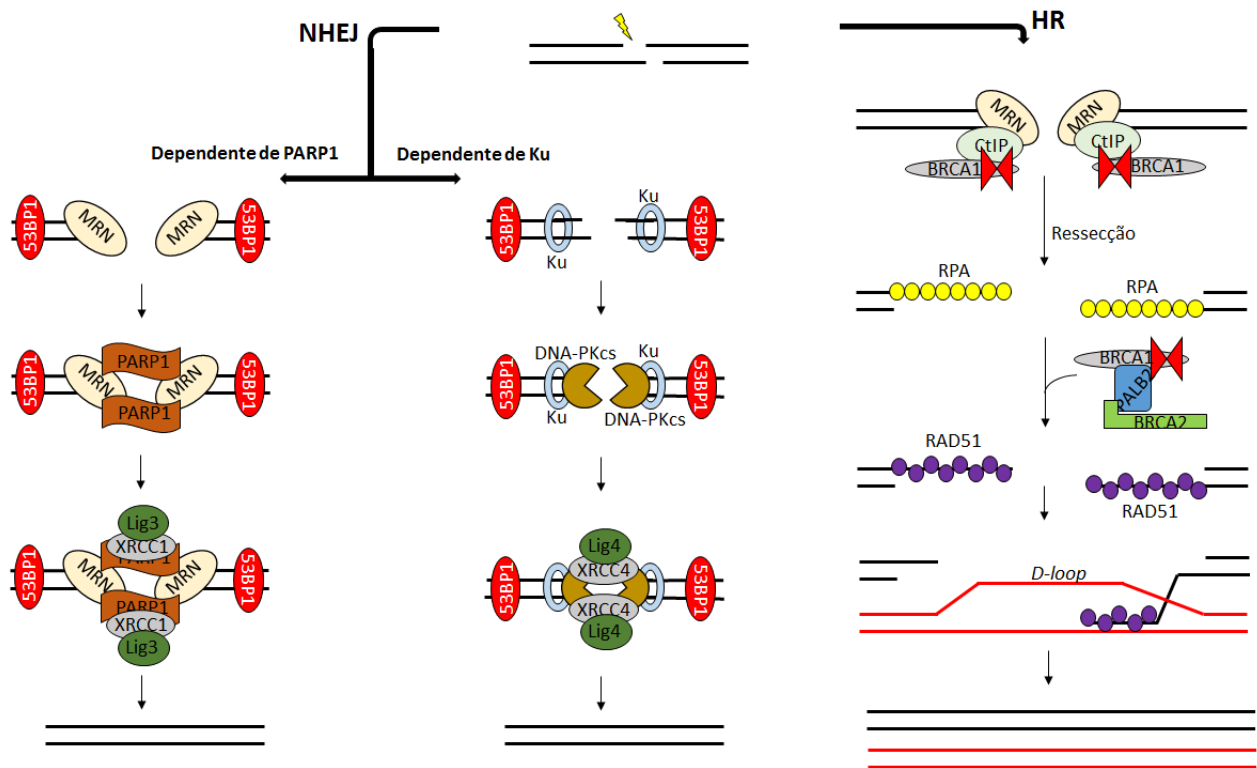


Figura 1.4 Representação esquemática dos mecanismos de reparo de quebra de dupla fita. O reparo efetivo da quebra de dupla fita pode ser realizado por duas vias majoritárias: HR e NHEJ. A recombinação não homóloga pode ocorrer de forma dependente de PARP1 ou do heterodímero Ku70/80. De forma geral, as fitas lesionadas são religadas mediante ação de DNA ligases (Lig3 e Lig4) e suas proteínas acessórias (XRCC1 e XRCC4, respectivamente), sem que ocorra processamento das fitas, ou com processamento limitado. O reparo por recombinação homóloga é favorecido para ressecção das fitas lesionadas que, após capeamento das fitas simples geradas pela ação de RPA, promove o recrutamento de RAD51 pela ação do complexo BRCA1/PALB2/BRCA2, permitindo que ocorra o reconhecimento e invasão da fita homóloga para que o reparo da fita lesionada aconteça.

1.3.2 Recombinação não homóloga por junção de pontas

O reparo por NHEJ, favorecido pela inibição da ressecção por 53BP1, pode ocorrer através de duas vias distintas, uma dependente do heterodímero Ku70/Ku80 e outra dependente de PARP1. De forma simplificada, o reparo dependente de Ku70/80 ocorre através do recrutamento de DNA-PKcs, que medeia o recrutamento das proteínas XRCC4 e Ligase 4 que, por sua vez, promovem a junção das pontas lesionadas. Por outro lado, o reparo dependente de PARP1, ocorre através do reconhecimento de regiões de micro-homologia, que são processadas e ligadas pelas proteínas XRCC1 e Ligase 3. De forma equivalente, ambos os processos culminam no reparo não fiel, tendo em vista que pode ocorrer perda ou ganho de regiões durante o processamento e ligação (THOMPSON, L., 2012) (**Figura 1.4**).

1.4 BRCA1

Dentro do contexto de reparo ao dano de DNA, BRCA1 atua como uma peça importante na manutenção da estabilidade genômica e supressão tumoral.

BRCA1 foi o primeiro gene relacionado com a susceptibilidade hereditária ao câncer de mama (MIKI, Y. *et al.*, 1994). Os alelos de *BRCA1* encontram-se mutados em cerca de 45% das famílias com casos hereditários de câncer de mama, e 80% das famílias com casos de câncer hereditário de mama e ovários (EASTON, D. *et al.*, 1993). Mulheres com predisposição hereditária associada a mutações em *BRCA1* têm um risco estimado 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) (MIKI, Y. *et al.*, 1994).

A análise da estrutura proteica de BRCA1 revela a existência de vários motivos estruturais conservados entre os diferentes ortólogos (SZABO, C., WORLEY, T. e MONTEIRO, A, 2004). A região N-terminal da proteína encerra um domínio RING-finger C3HC4 que apresenta atividade E3 ubiquitina ligase, além de mediar a interação de BRCA1 com a proteína BARD1 (*BRCA1-Associated RING Domain protein 1*) (SAURIN, A. *et al.*, 1996; LORICK, K *et al.*, 1999; RUFFNER, H. *et al.*, 2001) (**Figura 1.5**).

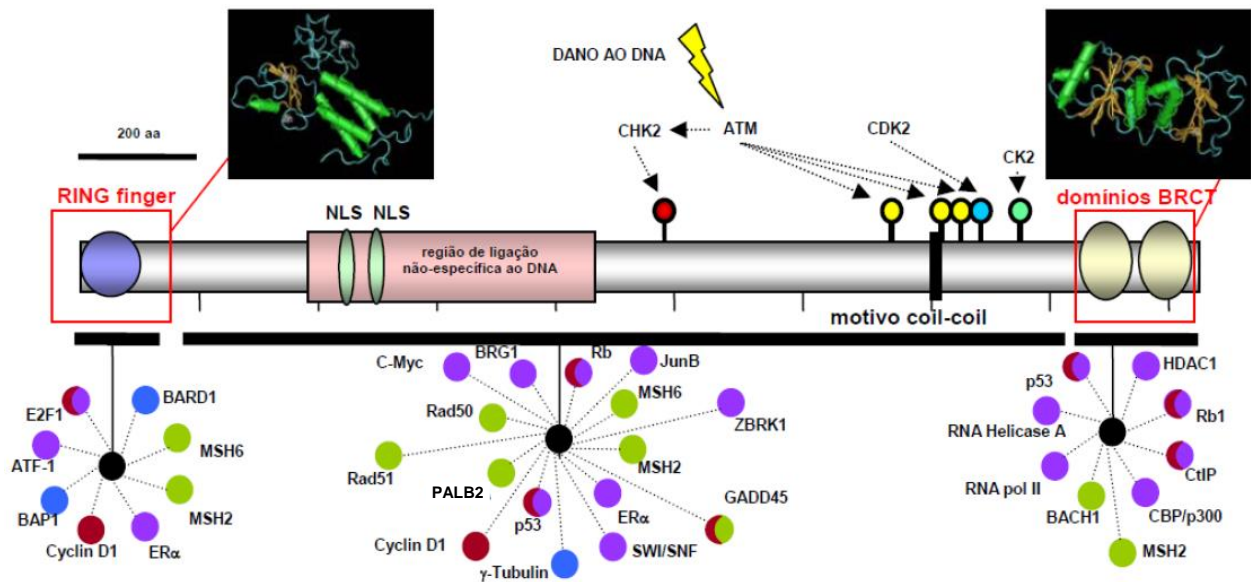


Figura 1.5 Representação da estrutura proteica de BRCA1 (em escala). As caixas vermelhas mostram as regiões cujas estruturas tridimensionais são conhecidas. Em destaque as estruturas dos domínios RING-*finger* e BRCT: as estruturas em folha- β estão representadas como fitas, enquanto as estruturas em α -hélice estão representadas como cilindros. NLS: sinais de localização nuclear. A região necessária para a ligação não específica ao DNA é representada como uma caixa rosa. Os sítios que são fosforilados na resposta ao dano de DNA são representados como círculos vermelhos (alvos para CHK2) e amarelos (alvos para ATM). Sítios fosforilados por CDK2 ou Casein Kinase 2 estão representados como círculos azuis e verdes, respectivamente. O painel inferior mostra elementos de interação com BRCA1, agrupados pelas respectivas regiões de interação (barras horizontais pretas). Os elementos estão representados como círculos de diferentes cores, conectados à um círculo preto, que representa a região de interação. Para facilitar a visualização do papel de BRCA1 em diferentes processos celulares os elementos de interação estão representados por cores diversas, cada cor associada a uma função específica: regulação da transcrição e remodelamento da cromatina (lilás), controle do ciclo celular (vermelho), resposta ao dano de DNA (verde) e outros (azul). Quando um elemento participa de duas funções distintas, este é representado com mais de uma cor. Adaptado de Dapic e Monteiro, 2006.

Cerca de 75% do *pool* celular de BRCA1 encontra-se complexado com BARD1, sugerindo uma função biológica relevante para o heterodímero (BRZOVIC, P. *et al.*, 2001). A interação BRCA1/BARD1 potencializa a atividade E3 ubiquitina ligase de BRCA1 (BAER, R. e LUDWIG, T., 2002; WU-BAER, F. *et al.*, 2003).

O heterodímero BRCA1-BARD1 medeia a formação de estruturas ubiquitinadas através do resíduo de lisina na posição 6 da ubiquitina, ao contrário da maioria dos processos de ubiquitinação, que se valem dos resíduos de lisina nas posições 48 ou 63 (RUFFNER, H. *et al.*, 2001; MORRIS, J. e SOLOMON, E., 2004; NISHIKAWA, H. *et al.*, 2004). As consequências dessa forma específica de ubiquitinação ainda são desconhecidas. Porém, Elia e colaboradores demonstraram recentemente que insultos ao DNA por radiação ionizante e ultravioleta são acompanhados por um aumento global de ubiquitinação mediada através do resíduo de lisina na posição 6 (ELIA, A. *et al.*, 2015).

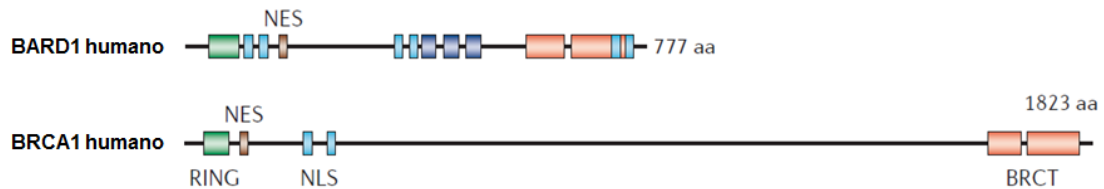
A porção central de BRCA1 consiste de uma região pouco conservada. Nela identificam-se dois motivos que correspondem a sinais de localização nuclear (NLS; aa 500-508 e 609-615). Pelo menos um desses sinais (aa 503-508) foi demonstrado como essencial para a apropriada localização nuclear da proteína (CHEN, C. *et al.*, 1996). A presença de diversos sítios de fosforilação localizados na região central de BRCA1, corrobora os dados que sustentam o envolvimento de BRCA1 nos mecanismos de RDD (OUCHI, T., 2006).

A região carboxi-terminal de BRCA1 é bastante acídica e contém dois domínios BRCTs (**BRCA1 C-Terminal**) em tandem, característicos de uma superfamília de proteínas envolvida no RDD e no controle de pontos de checagem do ciclo celular (KOONIN, E. *et al.*, 1996; BORK, P. *et al.*, 1997; CALLEBAUT, I e MORNON, J., 1997). Esses domínios são regiões de interação proteína-proteína que medeiam a associação com um universo de outras proteínas envolvidas com a replicação do DNA, com as vias de RDD, com a transcrição, no controle do ciclo celular e em processos de ubiquitinação. Quando em tandem (tBRCT), esses domínios são capazes de reconhecer e ligar-se a fosfopeptídeos (BOTUYAN, M. *et al.*, 2004; WILLIAMS, R. *et al.*, 2004; CLAPPERTON, J. *et al.*, 2004; SHIOZAKI, E. *et al.*, 2004; RODRIGUEZ, M. *et al.*, 2003; MANKE, I. *et al.*, 2003). A região C-terminal de BRCA1 é essencial para o exercício de sua função supressora de tumor, tendo em vista que a deleção de apenas 11 aminoácidos na extremidade final da proteína é suficiente para conferir predisposição ao câncer (MONTEIRO, A., AUGUST, A. e HANAFUSA, H., 1997).

1.5 BARD1

BARD1 foi identificada como parceira de interação da porção N-terminal (composta pelos 304 primeiros resíduos de aminoácidos) de BRCA1 em um ensaio de dois híbridos em levedura (WU, L. *et al.*, 1996). BARD1 atua de forma direta e indireta em processos de resposta ao dano de DNA, através do reparo propriamente dito, do controle do ciclo celular e da apoptose (TEMBE, V. e HENDERSON, B., 2007; BRODIE, K. *et al.*, 2012). Estruturalmente, BARD1 apresenta grande semelhança com BRCA1, encerrando um domínio RING-*finger* e uma sequência de exportação nuclear na porção N-terminal, além de sua região C-terminal encerrar dois domínios BRCT em tandem (**Figura 1.6A**). Diferentemente de BRCA1, BARD1 apresenta um cassete composto por três repetições de motivos de anquirina próximo à porção N-terminal dos domínios BRCT (**Figura 1.6A**) (IRMINGER-FINGER, I. e JEFFORD, C., 2006). Apesar de encerrar um domínio RING-*finger*, BARD1 não apresenta atividade E3 ligase por si só, porém, atua como potencializador de BRCA1, onde é necessário que ocorra a associação com BRCA1 para que o heterodímero resultante se auto-ubiquitine, aumentando sua atividade E3 ubiquitina ligase em até 20 vezes (IRMINGER-FINGER, I. e JEFFORD, C., 2006).

A



B

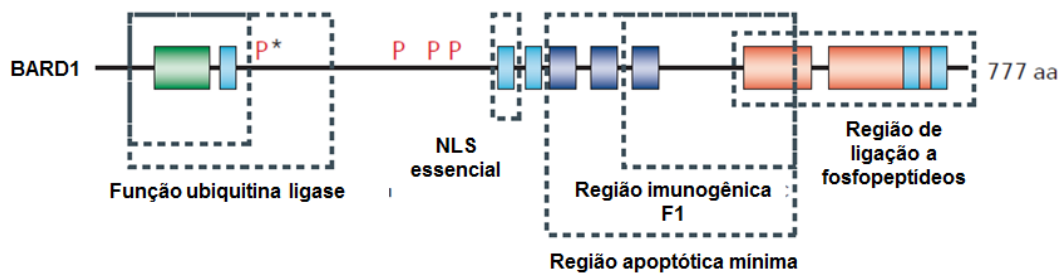


Figura 1.6 Representação da estrutura proteica de BARD1 (em escala) com BRCA1.

(A) Domínios estruturais de BARD1 e BRCA1: domínio RING-*finger* (RING, caixas em verde), sequência de exportação nuclear (NES, *nuclear export sequence*, caixas em marrom), sinal de localização nuclear (NLS, *nuclear localization signal*, caixas em azul claro), repetições de anquirina (*ANK repeats*, caixas em azul escuro) domínios tBRCT (caixas em vermelho). (B) Domínios funcionais de BARD1. Adaptado de Irminger-Finger e Jefford (2006).

Embora grande parte do conteúdo celular de BARD1 esteja associada a BRCA1, essa proteína é capaz de desempenhar outras funções, independentes de BRCA1. Uma destas funções é a modulação da atividade transcricional de NF- κ B através da interação com Bcl-3, mediada pelos domínios anquirina presentes em ambas as proteínas (DECHEND, R. *et al.*, 1999) (**Figura 1.6B**). BARD1 também modula a progressão do ciclo celular, haja visto que células com a expressão de *BARD1* experimentalmente reduzida, exibem um retardo na fase S do ciclo celular, acompanhada de IG e perda de inibição, por contato, da proliferação (IRMINGER-FINGER, I. e LEUNG, W., 2002). Por outro lado, a super-expressão de *BARD1*, assim como sua localização citoplasmática, é um fator indutor de apoptose (JEFFORD, C. *et al.*, 2004).

Diferentemente de BRCA1, pouco se sabe a respeito dos parceiros de interação de BARD1. Um maior entendimento das interações de BARD1 com outras proteínas é necessário para elucidar o seu papel em vias relacionadas à tumorigênese, assim como o papel de BRCA1 nestas mesmas vias, possibilitando então o desenvolvimento de novas estratégias de combate ao câncer (WOODS, N *et al.*, 2012; CARVALHO, R *et al.*, 2014).

1.6 Domínios BRCT em tandem no genoma humano.

O domínio BRCT foi originalmente identificado em BRCA1, porém são encontrados em diversas proteínas, tanto procarióticas quanto eucarióticas. A maioria dessas proteínas está envolvida de alguma forma com mecanismos de RDD (BORK, P. *et al.*, 1997). O domínio BRCT já foi descrito como um motivo que medeia interação de uma série de proteínas, como XRCC1 e DNA ligase III e o próprio BRCA1 e CtlIP (YU, X. *et al.*, 2003). Recentemente, Mesquita e colaboradores identificaram um conjunto de 23 proteínas codificadas pelo genoma humano que encerram um ou mais domínios BRCT. (MESQUITA, R. *et al.*, 2010).

Os domínios BRCT, quando em tandem, comportam-se como uma única unidade estrutural – sugerindo que esse tipo estrutura forme uma classe particular de domínios BRCTs (JOO, W. *et al.*, 2002). No genoma humano encontram-se identificadas 12 proteínas que apresentam domínios tBRCT onde todas encontram-se relacionadas com a RDD (GRAWUNDER, U. *et al.*, 1998; RAPPOLD, I. *et al.*, 2001; GOLDBERG, M. *et al.*, 2003; WESTERMARK, U. *et al.*, 2003; JOWSEY, P. *et al.*, 2004; MESQUITA, R. *et al.*, 2010;).

O nosso grupo, em associação com o grupo do Dr. A.N. Monteiro (H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, EUA), desenvolveu um estudo sistemático para caracterização funcional por interação proteica de domínios tBRCT, onde, foram selecionadas sete proteínas que encerram o motivo tBRCT (BRCA1, BARD1, PTIP (PAXIP1), 53BP1, ECT2, MDC1 e Ligase 4) (WOODS, N *et al.*, 2012) (**Figura 1.7A**). A primeira abordagem preconizou a utilização desses sete diferentes domínios tBRCT como alvos para um ensaio de varredura por interação proteica de dois híbridos em levedura contra uma biblioteca de expressão humana. Em um segundo momento, foram conduzidas paralelamente duas outras abordagens, (1) um ensaio de varredura por purificação de proteínas por afinidade sequencial (*Tandem Affinity Purification*, TAP) - utilizando os mesmos domínios tBRCT usados anteriormente e, (2) a curadoria da literatura, focada nos relatos de interação mediadas pelos domínios tBRCT. Nesse trabalho, ao todo, foram identificadas 1013 interações (**Figura 1.7B**).

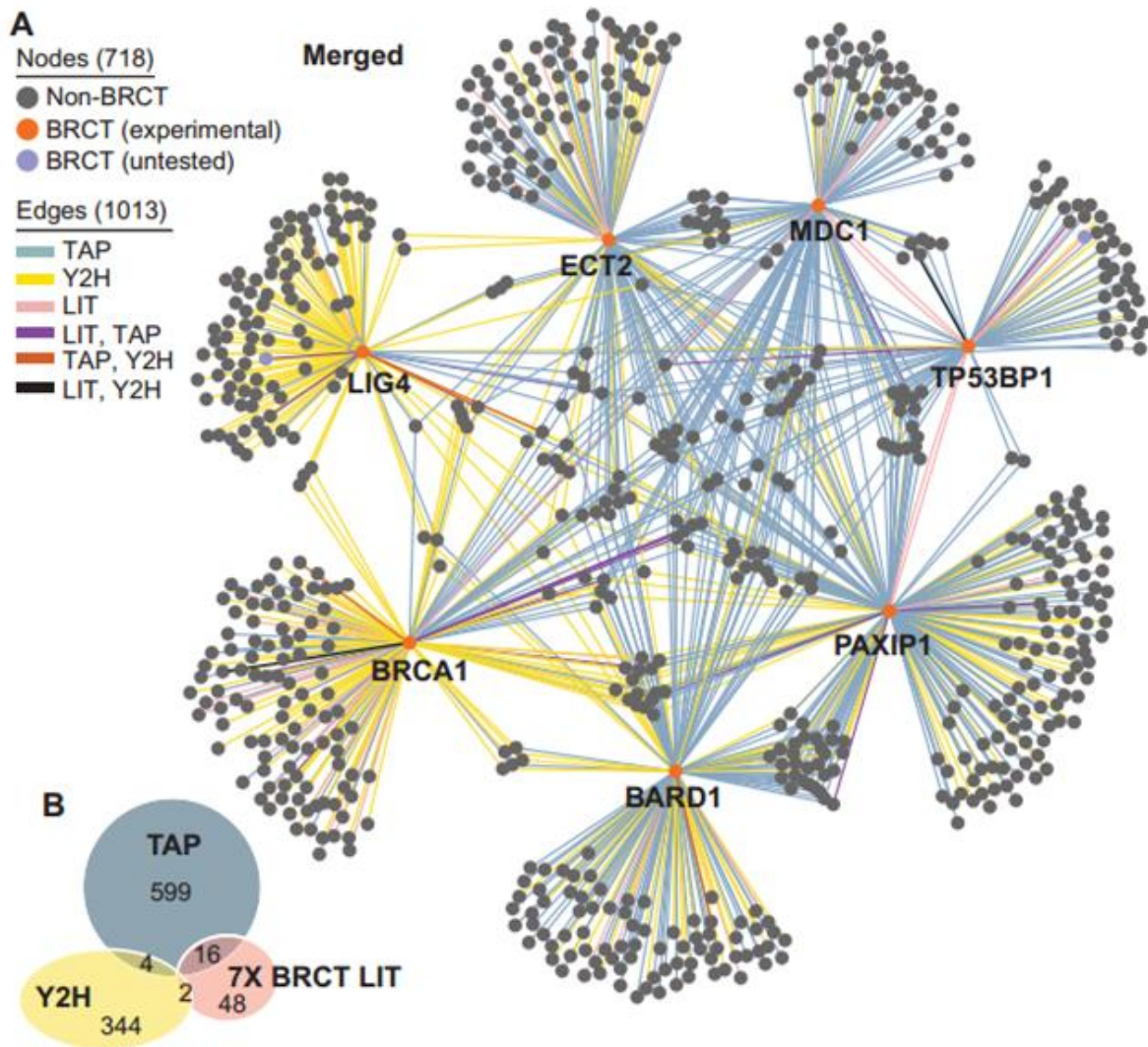


Figura 1.7 Rede de interação proteica do domínio tBRCT. (A) Integração das redes tBRCT: curadoria da literatura (7X-LIT), varredura pelo ensaio de dois-híbridos em levedura (Y2H) e purificação de proteínas por afinidade sequencial (TAP-MS). **(B)** Diagrama de Venn, mostrando a sobreposição de interações identificada por cada um dos métodos que deram origem a rede final de interação (adaptado de Woods e colaboradores, 2012).

CDK9 foi uma das proteínas identificadas como parceiras de interação de BRCA1, BARD1 e PTIP (inicialmente identificada como parceira de interação com o tBRCT de BRCA1 por ensaios de dois híbridos em levedura e dos tBRCTs de BARD1 e PTIP por ensaios de TAP- MS) (WOODS, N. *et al.*, 2012).

1.7 CDK9

CDK9 (**Cyclin-Dependent Kinase 9**) foi descrita inicialmente como PITALRE (devido à um motivo de sete resíduos de aminoácidos em sua sequência primária; Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu) e identificada pela semelhança com proteínas da família das CDC2 (**Cell Division Cycle 2**), descritas inicialmente em leveduras. Graña e colaboradores demonstraram à época, que esta proteína é capaz de fosforilar Rb *in vitro*, sugerindo um papel no controle do ciclo celular (GRAÑA, X., *et al.*, 1994). Somente a partir de 1998, em razão dos trabalhos de Garriga e Peng, que identificaram a ciclina T1 como parceira de interação e moduladora da atividade de PITALRE, a mesma passou a ser reconhecida como CDK9 (GARRIGA, J., *et al.*, 1998; PENG, J., *et al.*, 1998).

O heterodímero CDK9/ciclina T (ciclina T1 e T2) forma a subunidade catalítica do complexo denominado “fator de alongamento transcricional positivo b” (P-TEFb, **Positive Transcriptional Elongation Factor b**), que estimula o alongamento transcricional através da fosforilação do resíduo de serina número dois do heptapeptídeo (YSPTSPS) que se apresenta em 52 repetições na cauda C-terminal (CTD, **C-Terminal Domain**) de RPB1, a maior subunidade da holoenzima RNA polimerase II (BRES, V., *et al.*, 2008; ROMANO, G. e GIORDANO, A., 2008) (Descrito detalhadamente na **Figura 1.8A - D**).

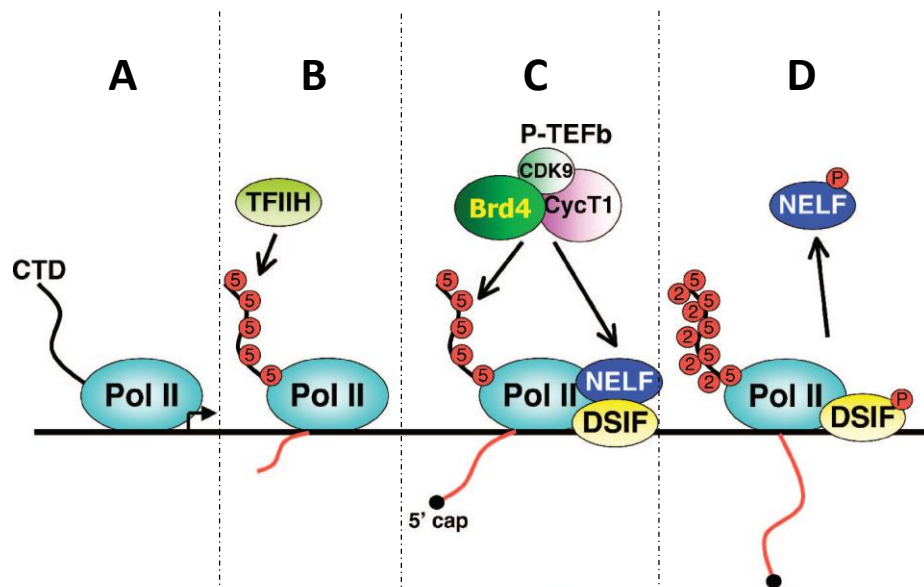


Figura 1.8 Representação esquemática do papel de CDK9 no processo de alongamento durante a transcrição gênica. (A) após o recrutamento da maquinaria basal da transcrição (aqui representado pela holoenzima RNA polimerase II – Pol II) para região promotora, a cauda C-terminal (CTD) é fosforilada no resíduo de serina na posição cinco do heptapeptídeo YSPTSPS, pelo complexo TFIID (B). (C e D) Após a fosforilação por TFIID a maquinaria da cauda CTD precisa ser fosforilada pelo complexo P-TEFb, que tem CDK9 como unidade catalítica, no resíduo de serina 2, para que a maquinaria da transcrição passe a apresentar uma maior processividade. Paralelamente CDK9 também fosforila os complexos inibitórios e estimuladores NELF e DSIF, respectivamente (adaptado de Zhou, Q e Yik, J., 2006).

Durante o controle do processo de transcrição, CDK9 também fosforila, componentes inibitórios como NELF e DSIF (PING, Y. e RANA, T., 2000; ZHOU, Q e YIK, J., 2006) e a histona H1, que atua como regulador da compactação do DNA e consequente expressão gênica (O'BRIEN, S *et al.*, 2010; O'BRIEN, S *et al.*, 2012). Além de alvos relacionados ao processo de transcrição em si, CDK9 é capaz de fosforilar p53 no resíduo de serina na posição 392, gerando um aumento na estabilidade e atividade da proteína, que por sua vez promove a expressão de *CDK9*. Além disso, SIRT2 (desacetilase da família das sirtuínas) modula a atividade de CDK9 através da desacetilação do resíduo de lisina na posição 28, em resposta ao estresse replicativo (CLAUDIO, P. *et al.*, 2006; ZHANG, H. *et al.*, 2013).

Além das ciclinas do tipo T, CDK9 interage com a ciclina K, sugerindo uma resposta mais flexível a diferentes estímulos, assim como outras CDKs envolvidas no controle do ciclo celular (LIN, X. *et al.*, 2002). O heterodímero CDK9/ciclina K participa da resposta a estresses replicativos, juntamente com ATR e ATRIP, modulando o carregamento de RPA mediante estresse pela ação de hidroxiuréia (YU, D. *et al.*, 2010). Esses dados corroboram um papel de CDK9 na RDD (**Figura 1.9**)

Em 2003, Shore e colaboradores identificaram uma nova isoforma de CDK9, produzida através de uma região promotora a montante do promotor originalmente identificado (**Figura 1.10A**). A tradução dos transcritos de CDK9 produzem duas proteínas denominadas 42k e 55k. CDK9 55k se diferencia de CDK9 42k, pela adição de 117 resíduos aminoácidos na porção N-terminal da proteína traduzida (**Figura 1.10B**) (SHORE, S. *et al.*, 2003; SHORE, S. *et al.*, 2005). Dados de Liu e colaboradores demonstraram que a isoforma 55k é capaz de interagir com a ciclina T1 e fosforilar, *in vitro*, os mesmos peptídeos que a isoforma 42k, como é o caso da cauda CTD da RNA polimerase II. CDK9 55k, diferente de 42k, interage com Ku70, proteína responsável pelo recrutamento da DNA-PKcs para os sítios de quebra de dupla fita, durante o reparo por recombinação não homóloga por junção de pontas (LIU, H. *et al.*, 2010).

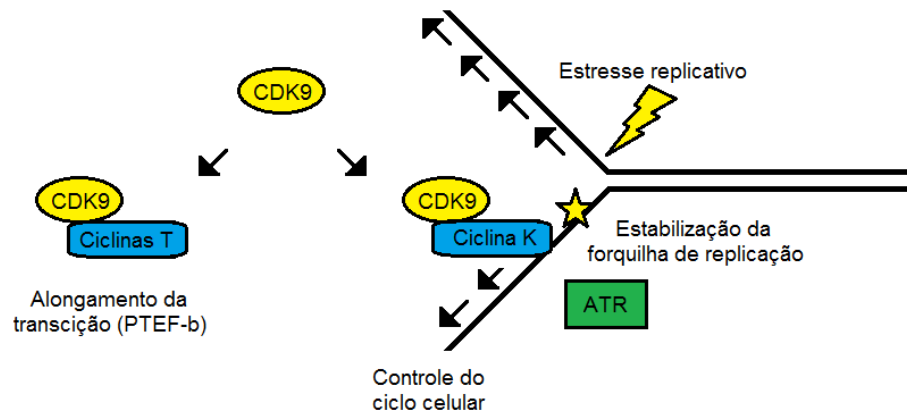


Figura 1.9 Representação esquemática dos diferentes papéis de CDK9, proposto por Yu e colaboradores (2011). CDK9 forma complexos com diferentes ciclinas, sendo responsável pela etapa de alongamento da transcrição quando interagindo com as ciclinas T, no complexo PTEF-b. Quando em complexo com a ciclina K, CDK9 participa da estabilização da forquilha de replicação atuando no controle do ciclo celular, juntamente com ATR (adaptado de Yu, D. e colaboradores, 2011).

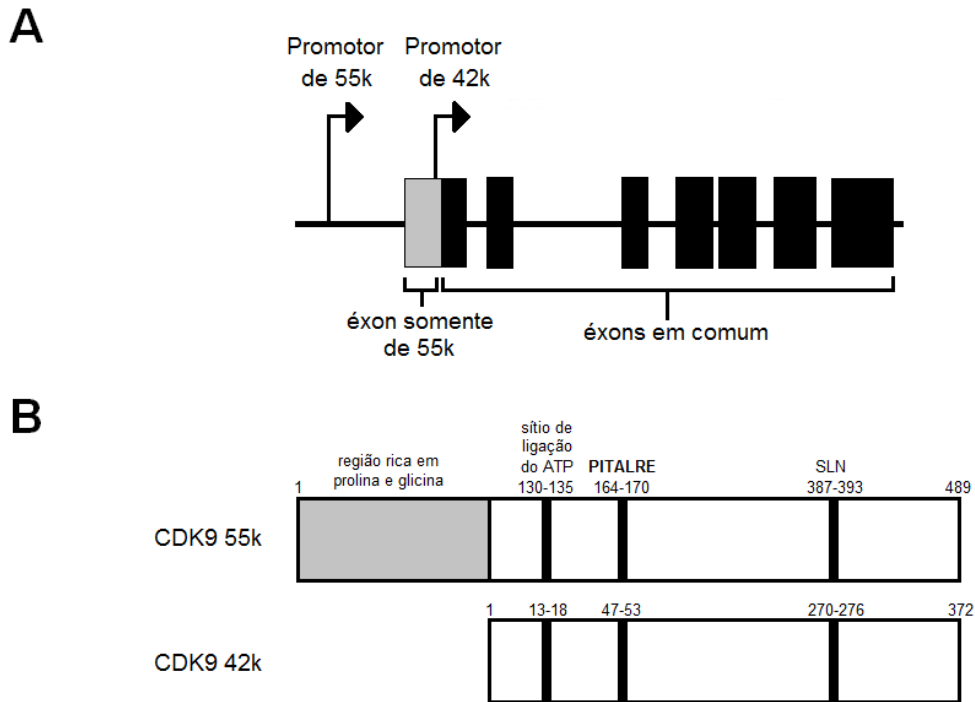


Figura 1.10 Representação esquemática da região gênica de *CDK9* e de seus produtos. (A) representação esquemática da região gênica de *CDK9*, com destaque para as regiões promotoras da transcrição das isoformas 55k e 42k. Em preto, os éxons comuns às duas isoformas. Em cinza, o éxon codificado somente na isoforma 55k. (B) Representação dos produtos proteicos provenientes da transcrição através dos diferentes promotores representados em A. Destaque para região em cinza, representando a porção exclusiva da isoforma 55k, composta por uma região rica em resíduos de prolina e glicina. Destaque para os sítios de ligação do ATP, da assinatura de resíduos de aminoácidos (PITALRE) e os sinais de localização nuclear (SLN).

2. Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente as interações de CDK9, com BRCA1 e BARD1, no contexto de reparo ao dano de DNA.

3. Objetivos específicos

Confirmar as interações CDK9/BRCA1 e CDK9/BARD1, previamente identificadas por Woods e colaboradores (2012), em um contexto de proteínas constitutivamente produzidas em células humanas.

Caracterizar a capacidade das isoformas de CDK9 (42k e 55k) de interagirem com BARD1 e com o domínio tBRCT de BRCA1.

Avaliar a capacidade de formação de focos de CDK9 em resposta a danos ao DNA e sua co-localização com focos de BRCA1.

Avaliar o papel de CDK9, juntamente com BRCA1, em processos relacionados ao reparo a danos no DNA.

4. Materiais e métodos

4.1. Construções plasmidiais.

A sequência codificante referente a isoforma 42k de CDK9 (*Pubmed Accession Number*: NM_001261.3), em cadeia completa, foi amplificada por rotinas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) (MULLIS, K *et al.*, 1986) utilizando o conjunto de reagentes *Pfx50 DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), empregando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade Pfx50, segundo recomendações do fabricante e usando oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados (Senso CDK9 42k *EcoRI* e antisenso CDK9 42k *BamHI* - **Quadro 4.1**). Como molde de DNA, foi utilizada a construção pCDNA3-CDK9 42k HA (cDNA de CDK9 em cadeia completa clonado no vetor de expressão para células de mamífero pCDNA3 no mesmo quadro de leitura do epítipo HA) (FUJINAGA, K. *et al.*, 1998), adquirida através do repositório de plasmídeos, Addgene (Massachusetts, EUA). O programa de termociclagem utilizado foi definido com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de contendo um passo de desnaturação de 1 min a 94°C, um passo de anelamento de 1 min a 55°C e um passo de extensão de 1,5 min a 72°C e por fim uma etapa de extensão de 7 min a 72°C. A reação foi conduzida em termociclador modelo Verity (Life Technologies, Carlsbad, EUA). O produto amplificado (inserto) foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% p/v em tampão TBE (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) (todos os reagentes da Sigma Co., St, Louis, EUA). O inserto, bem como o vetor de expressão em células de mamíferos pCMV FLAG foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, EUA) por 16 horas à 37°C, seguindo recomendações do fabricante. Os produtos das reações de digestão enzimática foram analisados através de eletroforese preparativa em gel de agarose como descrito anteriormente. Os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel purification kit* (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA), segundo instruções do fabricante. A purificação foi confirmada em nova eletroforese em gel de agarose.

Quadro 4.1 Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Nome	Sequência (5' – 3')
Senso CDK9 42k <i>EcoRI</i>	AAGAATTCAATGGCAAAGCAGTACGACTCGGTG
Antisenso CDK9 42k <i>BamHI</i>	AAGGATCCTCAGAAGACGCGCTCAAACCTCC
Senso BARD1 <i>SalI</i>	AAGTCGACAATGCCGGATAATCGGCAGC
Antisenso BARD1 <i>NotI</i>	AAGCGGCCGCTCAGCTGTCAAGAGGAAGCAAC

Os produtos purificados foram submetidos à reação de ligação utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Promega, Wiscousin, EUA) a temperatura ambiente por 16 horas, segundo recomendações do fabricante.

Desta forma, o inserto foi direcionalmente clonado no vetor pCMV FLAG (Sigma Co., St, Louis, EUA) mantendo o quadro de leitura do epítipo FLAG, gerando a construção pCMV FLAG-CDK9 42k. (**Figura 4.1A**).

A sequência codificante de BARD1 (*Pubmed Accession Number*: NM_000465), em cadeia completa foram amplificada por rotinas de PCR como descrito na anteriormente, valendo-se de oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados (Senso BARD1 *SaI* e antisenso BARD1 *NotI* - **Quadro 4.1**). Como molde de DNA, foi utilizada a construção pYFP BARD1 (cDNA de BARD1 em cadeia completa clonado no vetor de expressão para células de mamífero pEYFP), gentilmente cedida pelo Dr. Beric Henderson (University of Sydney, Austrália).

Desta forma, o inserto foi direcionalmente clonado, como descrito anteriormente, nos sítios de restrição das enzimas *SaI* e *NotI* do vetor pGEX6p1 (GE Healthcare) mantendo o quadro de leitura da proteína glutationa-S transferase (GST), gerando a construção pGEX6p1-BARD1 (**Figura 4.1B**).

Ambas construções geradas foram confirmadas por sequenciamento automático como descrito na **seção 4.2**.

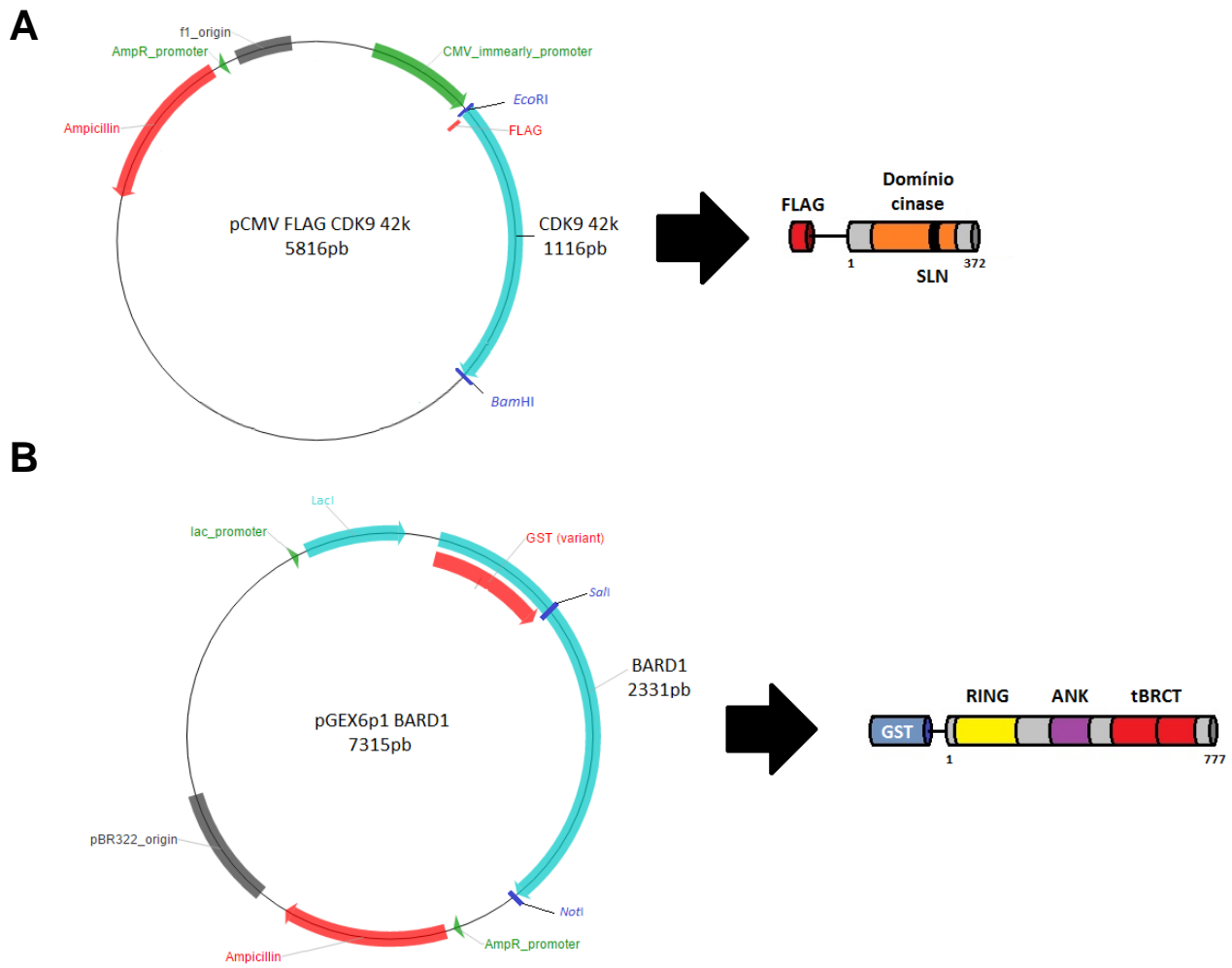


Figura 4.1 Representação esquemática das construções plasmidial gerados e seus produtos proteicos. (A) Vetor plasmidial para expressão em células animais pCMV FLAG, com destaque para as regiões reguladoras e os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* utilizados nas rotinas de clonagem para geração da construção pCMV-FLAG-CDK9 42k, e seu produto proteico (FLAG-CDK9 42k). (B) Vetor plasmidial para expressão em células procarióticas pGEX6p1, com destaque para as regiões reguladoras e os sítios das enzimas de restrição *SalI* e *NotI* utilizados nas rotinas de clonagem para geração da construção pGEX6p1-BARD1, e seu produto proteico (GST-BARD1).

A construção pEBG-BRCA1 C-terminal (cDNA de BRCA1 que codifica a região que compreende os resíduos de aminoácidos 1314 ao 1863 clonado no vetor de expressão para células de mamífero pEBG), foi gentilmente cedido pelo Dr. Alvaro Monteiro (H. Lee Moffitt Cancer center, Florida, EUA) (**Figura 4.2A**).

A construção pCMV FLAG-CDK9 55k (cDNA da isoforma 55k de CDK9 cadeia completa clonado no vetor de expressão para células de mamífero pCMV FLAG) (LIU, H. *et al.*, 2010), foi gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Rice (Baylor College of Medicine, Texas, EUA) (**Figura 4.2B**)

A construção pCDNA3-CDK9 42k HA (cDNA da isoforma 42k de CDK9 cadeia completa clonado no vetor de expressão para células de mamífero pCDNA3 seguindo o mesmo quadro de leitura que o epitopo HA), adquirida através do repositório de plasmídeos, Addgene (Massachusetts, EUA). (plasmídeo número 14640) (**Figura 4.2C**)

4.2. Sequenciamento automático

As construções geradas foram confirmadas através de rotinas de sequenciamento automático utilizando-se o *kit BigDye Terminator* (Life Technologies, Carlsbad, EUA), segundo instruções do fabricante, valendo-se de todos os oligonucleotídeos utilizados nas rotinas de clonagem (**Quadro 4.1**). A análise dos produtos da rotina de sequenciamento foi conduzida em colaboração com a Divisão de Genética do Centro de Pesquisa do INCA.

4.3. Cultivo de bactérias

4.3.1. Cepas de bactérias utilizadas

Duas cepas de *Escherichia coli* foram utilizadas nas rotinas de transformação. A cepa DH5 α (genótipo: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 ϕ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) foi utilizada nas rotinas de clonagem de todas as construções citadas na **seção 3.1**. A cepa BL21 (DH3) (genótipo: *F- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])*) foi utilizada nas rotinas de expressão condicional a serem descritas na **seção 4.3.5**.

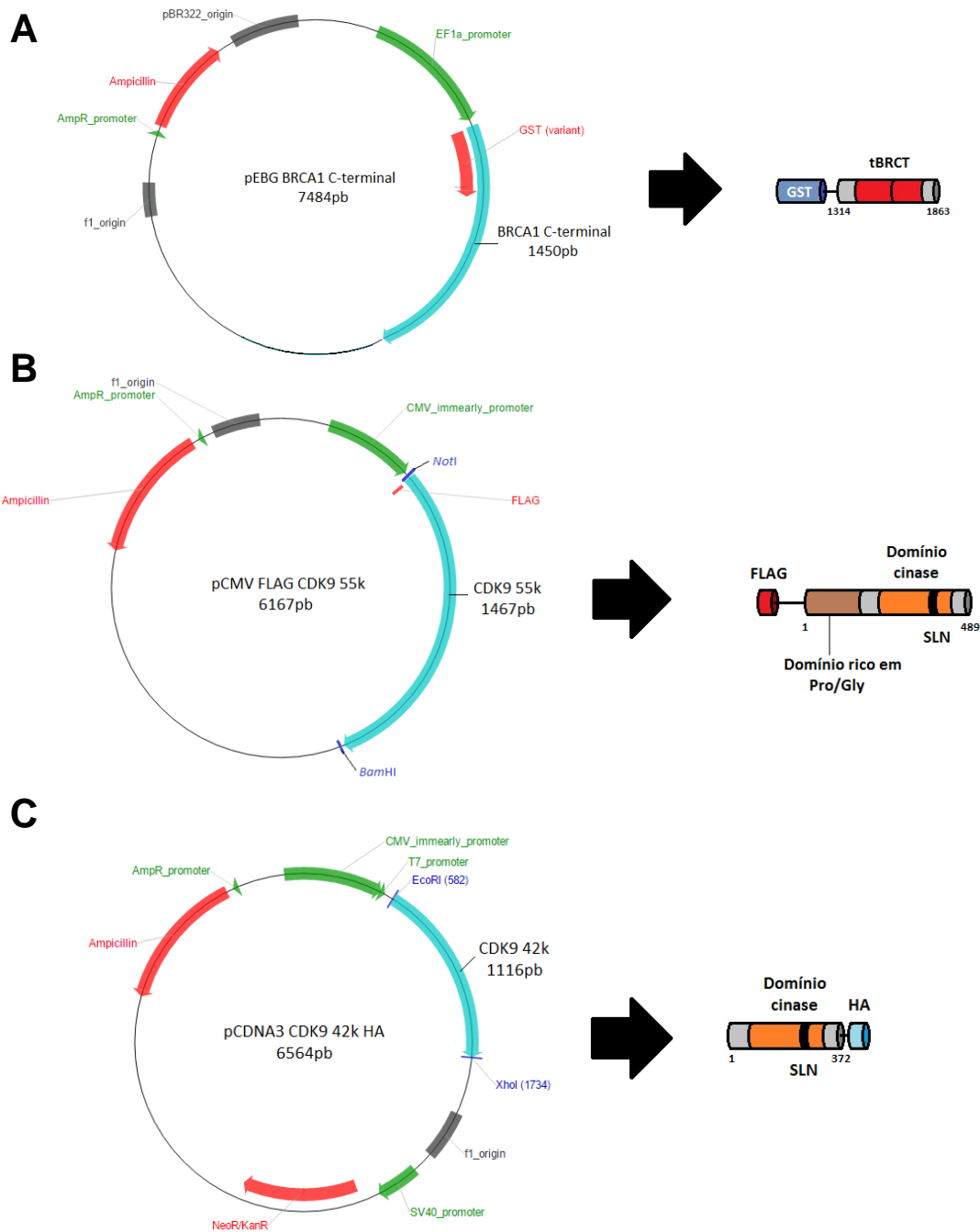


Figura 4.2. Representação esquemática dos vetores plasmidiais cedidos e seus produtos proteicos. Vetores plasmidiais para expressão em células animais, com destaque para as regiões reguladoras. (A) pEBG-BRCA1 C-terminal, (B) pCMV FLAG-CDK9 55k e (C) pCDNA3-CDK9 42k HA e seus respectivos produtos proteicos (GST-BRCA1 C-terminal, FLAG-CDK9 55k e CDK9-HA).

4.3.2. Preparo de bactérias competentes

O preparo de bactérias eletrocompetentes foi adaptado do procedimento descrito por Wirth e colaboradores (1989). Resumidamente, as bactérias foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani Broth; peptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, cloreto de sódio 0,5% p/v) à 37°C por 16h. Em seguida uma alíquota foi diluída 500x em meio LB e o crescimento foi acompanhado até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento, avaliada pela densidade ótica (D.O.) que deveria encontrar-se entre 0,4 e 0,5 unidades de absorvância à 600nm. As células passaram, então, por sucessivas etapas de centrifugação (2500 x g por 10 min à 4°C) e ressuspensas em solução de glicerol 10% v/v gelada, com redução do volume em 10% do volume inicial da cultura. Na última etapa de centrifugação as células foram ressuspensas em solução glicerol 10% v/v e estocadas à -80°C.

4.3.3. Transformação bacteriana

As bactérias competentes foram incubadas com o DNA plasmidial e em seguida, foram submetidas a um pulso de 1,8 kV no eletroporador modelo Micropulser™ (Bio-Rad laboratories) em cubetas de 0,1 cm. As bactérias foram, então, recuperadas em 800uL de meio LB e a cultura foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio semi-sólido LB, ágar 4% p/v (Sigma co.) com a pressão seletiva variando com o cassete de resistência do plasmídeo utilizado (ampicilina 50ug/mL ou canamicina 30ug/mL).

4.3.4. Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi conduzida segundo adaptação do método de lise alcalina como descrito previamente (ENGEBRECHT, J. *et al.*, 2001). Resumidamente, as colônias bacterianas obtidas da transformação foram inoculadas em meio LB com antibiótico (ampicilina 50ug/mL ou canamicina 30ug/mL) sob agitação à 37°C por 18 horas. Em seguida as células foram centrifugadas a 14000 RPM por 1 minuto em microcentrífuga (modelo *Minispin eppendorf*) e ressuspensas em tampão GTE (glicose 50 mM, tris-Cl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM - todas Sigma co.). As células foram lisadas, cuidadosamente, em solução de hidróxio de sódio/SDS (NaOH 0,2 M, SDS 1% p/v – todos Sigma co.) e neutralizadas em tampão de acetato de potássio (ácido acético glacial 29,5 mM, KOH em lentilhas até que a solução atingisse pH 4,8 em 100 mL). A suspensão

foi, então, centrifugada a 14000 RPM por 10 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado igual volume de clorofórmio, o material foi submetido a vigorosa agitação e centrifugado a 14000 RPM por 2 minutos. Posteriormente, a fase aquosa foi recuperada e a esta foi adicionado igual volume de isopropanol, o material foi incubado por 20 minutos a -20°C e em seguida centrifugado a 14000 RPM por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água deionizada (sistema MilliQ, Millipore) autoclavada.

Alternativamente, quando para uso em rotinas de transfecção de células humanas os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando o *kit QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN, Gemantown, EUA), segundo orientações do fabricante.

4.3.5. Expressão condicional em bactérias

Para a produção proteica condicional da proteína de fusão (**Figura 2B**), em bactérias (*E. coli* da cepa BL21), as culturas transformadas foram inicialmente inoculadas em meio LB por 18 horas a 37°C. Em seguida uma alíquota foi diluída 500x em LB e o crescimento foi acompanhado até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento, avaliada pela D.O. que deveria encontrar-se entre 0,4 e 0,6 unidades de absorvância 600 nm. As células então foram submetidas ao tratamento com 0,5 mM de IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside – Sigma co.) e mantidas sob agitação à 30°C por 4 horas para produção das proteínas recombinantes. Posteriormente as células foram recolhidas e as proteínas totais extraídas.

4.3.6. Extração de proteínas de bactérias

As células tratadas para expressão condicional foram recolhidas em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,5, lisozima à 1 mg/mL, DNase à 1 ug/mL e Triton X100 à 0,1% - todas Sigma co.) e mantidas à 37°C por 1 hora e posteriormente sonicadas (sonicador modelo *Autotune Series High Intensity Ultrasonic processor - 100/130 watt*) em ciclos curtos de 15 segundos. Em seguida o material sonicado foi centrifugado (modelo *Centrifuge 5418 eppendorf*) à 13000 RPM por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante recuperado foi submetido a rotinas de *immunoblotting* para avaliação das proteínas fusionadas ao GST.

4.4. Culturas de células humanas

As células humanas das linhagens HEK29FT (Invitrogen, Calrsbad, EUA), HeLa (#CCL2, ATCC, Virginia, EUA), MCF7 (HTB-22, ATCC, Virginia, EUA), MDA MB-231 (HTB-26, ATCC, Virginia, EUA), T47D (HTB-133, ATCC, Virginia, EUA) e HCC1937 (CRL-2336, ATCC, Virginia, EUA – gentilmente cedida pelo Dr. Alvaro Monteiro; H. Lee Moffitt Cancer center, Florida, EUA) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma Co., St, Louis, EUA) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Calsbad, EUA) e antibióticos penicilina (100000 U/L - Invitrogen) e estreptomicina (100 mg/L - Invitrogen) a 37°C em atmosfera com 5% v/v de CO₂. As células humanas da linhagem MCF10A (CRL-10317, ATCC, Virginia, EUA) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (na proporção de 1:1), suplementado com 5% v/v de SFB, 20 ng/mL de EGF (*Epdermal growth factor* – Sigma Co.), 5 µg/mL de insulina (Sigma Co.), 1,25 µg/mL de Hidrocortisona (Sigma Co.) e 0,1µg/mL de Toxina Colérica (Sigma Co.). As células da linhagem SUM1315 (gentilmente cedida pelo Dr. Alvaro Monteiro; H. Lee Moffitt Cancer center, Florida, EUA) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (na proporção de 1:1) suplementado com 5% v/v de SFB, 10ng/mL de EGF e 5µg/mL de insulina. Os subcultivos foram realizados quando as células apresentavam 80-90% de confluência da área cultivada. A manutenção das células consiste na dissociação enzimática com solução de tripsina 0,25% p/v e EDTA 0,01% p/v (ambos Sigma Co.) a 37°C por cerca de 2 minutos. As células recuperadas em meio suplementado com SFB foram centrifugados à 1600 RPM por 5 minutos em centrífuga clínica (modelo Excelsa Baby 206R, Fanem.), em seguida as células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultivo e 1/5 do volume plaqueado em novos frascos de cultivo.

4.4.1. Transfecção de células humanas

A transfecção de células humanas (linhagens HEK293FT e MCF7) com as construções plasmidiais foram conduzidas utilizando o reagente polietilenimina 1 µg/µL (PEI) (Polysciences Inc, Pannsylvania, EUA). Cerca de 500.000 células foram plaqueadas em placas de cultivo de 9,5cm² de área e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de CO₂ por 24 horas. Em seguida, a mistura de transfecção, composta pelas construções plasmidiais, PEI (na proporção de 3 µL do reagente para cada 1 µg de DNA) e 10 volumes de meio de cultura sem soro, foi incubada por 30 minutos a temperatura

ambiente. Posteriormente as células foram tratadas com a mistura de transfecção, e mantidas em cultura por 3 horas. Após essa incubação, o meio de cultivo foi substituído e as células mantidas em cultura por 24 horas para protocolos de extração proteica (**seção 4.6**) e 72 horas para ensaios de avaliação de mecanismos de reparo (**seção 4.11**).

4.5. Extração de proteínas de células humanas

4.5.1. Extratos de proteínas totais

Para obtenção de extratos de proteínas totais, células humanas em cultura foram lavadas com PBS pH 7,4 (suplementado com NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) e dissociadas mecanicamente. As células foram recolhidas e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente em microcentrífuga e ressuspensas em tampão de lise *Mild-RIPA* (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM e NP40 1% v/v) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Sigma Co.). Os produtos lisados foram incubados por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados a 14000 RPM por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80°C.

A concentração de proteínas totais foi determinada através de ensaio colorimétrico descrito por Bradford (1976).

4.5.2. Extratos de proteínas citoplasmáticas e nucleares

Para obtenção de extratos de proteínas citoplasmáticas e nucleares, células humanas em cultura foram lavadas com PBS e centrifugadas conforme descrito na **seção 3.6.1**. As células foram ressuspensas em tampão de extração da fração citoplasmática (HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e NP40 0,2% v/v) suplementado com coquetel de inibidores de protease. Os lisados foram incubados por 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados a 14000 RPM por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C (extrato citoplasmático). O produto de sedimentação foi resuspenso em tampão de extração nuclear (Tris 20 mM pH7,4, glicerol 20% v/v, KCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 0,625 mM) suplementado com solução de inibidores de protease. Os lisados foram incubados por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados a 14000 RPM por 10 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C (Extrato Nuclear).

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

4.6. Ensaio de interação proteína-proteína

4.6.1. Coimunoprecipitação de proteínas

Rotinas de coimunoprecipitação foram conduzidas utilizando-se os extratos nucleares obtidos conforme descrito na **seção 4.6.2**. Resumidamente, os extratos proteicos foram incubados com resina de agarose *Protein A/G PLUS Agarose* (Santa Cruz Biotech) e os devidos anticorpos primários (**Quadro 4.2**), conforme orientação do fabricante, em tampão *Mild-RIPA* por 16 horas a 4°C sob agitação. A resina, contendo os complexos protéicos, foi lavada com *Mild-RIPA* por 10 minutos a 4°C, seguido de centrifugação a 1000 xg por 5 minutos. A etapa de lavagem foi repetida por 3 vezes e, por fim, a resina lavada for ressuspensa em tampão de amostra. As amostras foram desnaturadas através de aquecimento a 95°C por 5 minutos e submetidas a rotinas de *immunoblotting*, conforme descrito na **seção 4.9**.

4.6.2. GST pulldown

Para o ensaio de GST *pulldown*, foi utilizada a resina *Glutathione Sepharose 4B* (*GE Healthcare Lifesciences*, EUA) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, a resina foi lavada com o tampão de ligação (PBS pH 7,4, Dithiothreitol 2,5mM). Em seguida foi adicionado cerca de 1mg de extrato de proteínas (**seções 4.3.6 e 4.6.1**) em *Mild-RIPA* suplementado com solução de 2,5 mM de DTT e coquetel de inibidores de protease (Sigma Co., St, Louis, EUA) foram adicionados à resina e incubados à 4°C por 16 horas. Posteriormente, o material foi lavado três vezes com tampão de lavagem (NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, EDTA 1mM, NP40 1% v/v e dithiothreitol 2,5mM) suplementado com coquetel de inibidores de protease e o material ligado à resina foi analisado por *immunoblotting* valendo-se de anticorpos anti-GST e anti-FLAG e/ou anti-HA.

Quadro 4.2. Lista dos anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Fabricante	Código
anti-BRCA1	Calbiochem	SD118
anti-BRCA1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-642
anti-BARD1	Bethyl Laboratories	BL518
anti-CDK9	Bethyl Laboratories	A303-493A
anti-HÁ	Santa Cruz Biotechnologies	sc-805
anti-FLAG M2	Sigma Aldrich	F-1804
anti-GST	Santa Cruz Biotechnologies	sc-138
Anti- γ H2AX	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-101696
Anti- β -actina	Santa Cruz Biotechnologies	sc-47778

4.7. Immunoblotting

Os extratos proteicos quantificados foram diluídos em tampão de amostra (Tris-Cl 125mM pH 6,8, glicerol 30% v/v, SDS 4% p/v, β -mercaptoetanol 10% v/v, azul de bromofenol 0,004% p/v) e incubadas a 95°C por 5 minutos.

As amostras foram, então, analisadas por rotinas de SDS-PAGE em concentrações variáveis da matriz de poliacrilamida (de 6 a 10% p/v). Após a resolução, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), usando o sistema Trans-Blot Semidry (BIO-RAD Laboratories, California, EUA), segundo recomendações do fabricante. Concluída a transferência as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% p/v em TBS-Tween (*Tris-Buffered Saline*: Tris base 50 mM, NaCl 150 mM; suplementado com 0,1% v/v de Tween), por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (**Quadro 4.2**) diluídos em TBS-Tween suplementados com leite desnatado 0,5% p/v, conforme orientação do fabricante por 16 horas a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com TBS-Tween. A membrana foi, em seguida, incubada com o anticorpo secundário (**Quadro 4.3**) anti-IgG de camundongo ou coelho conjugados à peroxidase diluídos em TBS-Tween suplementados com leite desnatado 0,5% p/v, conforme orientações dos fabricantes por 1 hora a temperatura ambiente. O imunocomplexo foi revelado com o *kit Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences) e a membrana foi exposta ao filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

Quadro 4.3 Lista dos anticorpos secundários utilizados

Anticorpo	Fabricante	Código
Anti-IgG de camundongo-HRP	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2005
Anti-IgG de coelho-HRP	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2004
Anti-IgG de camundongo-Alexa Fluor® 488	Invitrogen	A11029
Anti-IgG de coelho-Alexa Fluor® 546	Invitrogen	A11035

4.8. Silenciamento da expressão gênica de *CDK9*

4.8.1. Geração de partículas lentivirais

Partículas lentivirais encerrando as construções pLKO1 shCDK9 (TRC0000000494 - Openbiosystems, Lafayette, EUA) contendo a sequência codificante para RNA do tipo *short hairpin* (shRNA) de reconhecimento do transcrito de *CDK9* ou pLKO1 shSCR (*Scrambled* – RHS6848 - Openbiosystems) contendo a sequência codificante para shRNA de reconhecimento de sequência não relacionada (utilizada como controle negativo) foram geradas através de transfecção de células HEK293FT conforme descrito no item 3.5. Nas rotinas de transfecção foram utilizadas misturas contendo as construções pLKO1 shCDK9 ou pLKO1 shSCR, em conjunto com as construções pLP1, pLP2 e pLP/VSVG do *kit* de produção de partículas lentivirais Virapower (Invitrogen), na proporção 2:1:1:2. Após 48 horas da transfecção, o meio de cultura contendo as partículas virais foi recolhido e percolado em elemento filtrante de poro 0,45 µm (EMD Millipore, Massachusetts, EUA).

4.8.2. Transdução viral

O meio de cultura contendo partículas lentivirais obtido conforme descrito na seção 3.10.1 foi imediatamente suplementado com brometo de hexadimetrina (Polybrene®, Sigma) 6µg/ml. A suspensão foi utilizada na transdução de células MCF7 apresentando confluência da área de cultura entre 60-70%. As células foram incubadas por 24 h conforme condições descritas no **item 4.4**. Após este período, o meio das culturas foi repostado com meio fresco na presença de puromicina 2 µg/ml (Invitrogen). Paralelamente, foi realizado o mesmo procedimento com uma cultura de células MCF7 não transduzidas. As culturas foram mantidas sob pressão seletiva, com reposição periódica do meio de cultura, até a morte de toda a população de células não transduzidas.

As linhagens geradas, interferidas para a expressão de *CDK9* e controle, foram denominadas MCF7 shCDK9 e shSCR respectivamente.

Os níveis proteicos de *CDK9* nas linhagens transduzidas foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* como descrito na **seção 4.9**.

4.9. Ensaio de avaliação de mecanismos de reparo

As avaliações dos mecanismos de reparo valeram-se de duas construções plasmidiais denominadas NHEJ (*non-homologous end-joining*) e HR (*homologous recombination*) (**Figuras 4.3A e 4.3B – painéis superiores**) previamente descritas por Seluanov e colaboradores (2010). A construção NHEJ encerra um cassete que codifica a proteína verde fluorescente truncada (não funcional), pela presença de um exon adenoviral flanqueado por duas regiões intrônicas do gene Pem1 que somam 3kb. As bordas da região exônica apresentam dois sítios não palíndromos de reconhecimento da enzima de restrição I-SceI, em orientações distintas, para indução da quebra de dupla-fita (**Figura 4.3A – painel intermediário**). O perfil de digestão gerado pelos sítios em orientações distintas, geram regiões protuberantes não compatíveis, mimetizando de forma mais eficiente a quebra de dupla fita do DNA em um contexto natural (**Figura 4.3C**). O cassete codificante do GFP só se torna funcional mediante reparo pela via de recombinação não homóloga por junção de pontas da quebra induzida pela digestão dos sítios de I-SceI (**Figura 4.3A – painel inferior**).

De forma semelhante, a construção HR encerra um cassete que codifica a proteína verde fluorescente truncada (não funcional), pela deleção de um cassete de 22 pares de bases e a presença de dois sítios de I-SceI em orientações distintas gerando, mediante digestão com a enzima I-SceI, (**Figura 4.3B – painel intermediário**) regiões protuberantes não compatíveis como exemplificado para a construção NHEJ (**Figura 4.3C**). O cassete codificante do GFP só se torna funcional mediante reparo pela via de recombinação homóloga, utilizando como molde a região doadora à 3' do cassete truncado (**Figura 4.3B – painel inferior**).

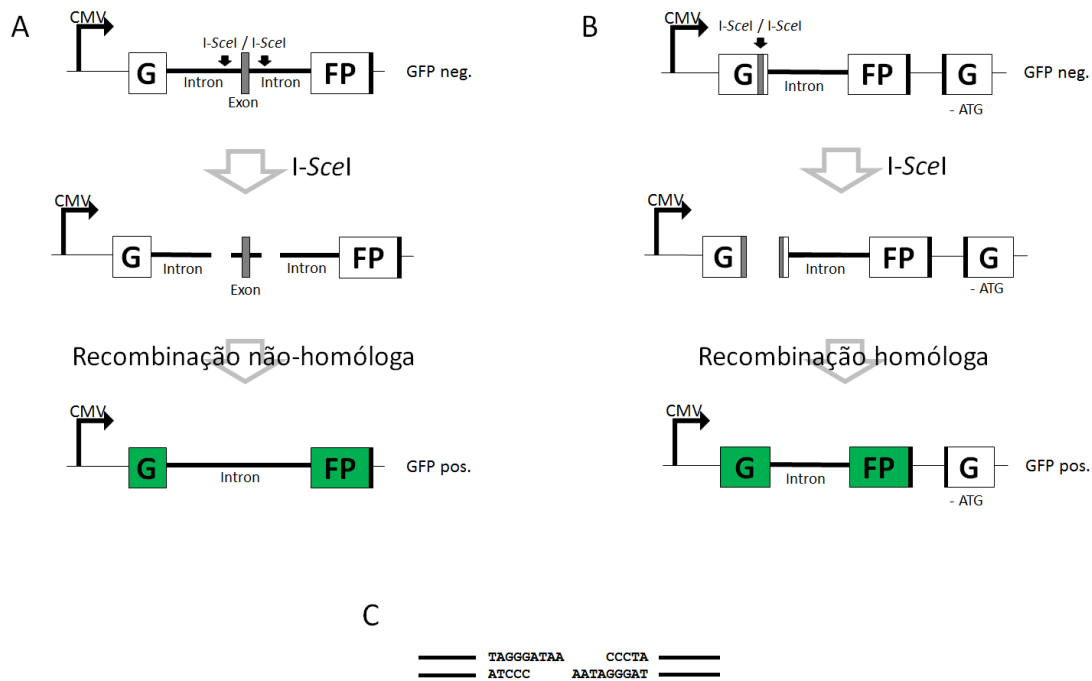


Figura 4.3 Representação esquemática dos ensaios de avaliação de mecanismos de reparo. (A) Representação esquemática da construção NHEJ, com destaque para as regiões intrônicas do gene Pem1, da região exônica adenoviral no painel superior, do perfil pós-digestão *in vitro*, no painel intermediário, e da restauração do cassete de GFP funcional, mediante reparo por recombinação não homóloga. (B) Representação esquemática da construção HR, com destaque para a região truncada (em cinza) do primeiro éxon de GFP, com os sítios de reconhecimento da enzima I-SceI, da região intrônica do gene Pem1, da sequência doadora à 3' do cassete truncado de GFP, no painel superior. O painel intermediário representa o perfil pós-digestão e o painel inferior a restauração do cassete de GFP funcional, mediante reparo por recombinação homóloga

Resumidamente, as construções plasmidiais foram digeridas *in vitro* com a enzima I-SceI (New England Biolabs Ipswich, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, a 37°C por 16 horas. Em seguida os produtos da digestão foram purificados utilizando-se o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel purification kit* (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA), segundo instruções do fabricante. Os produtos purificados foram utilizados para transfecção das células alvo, como descrito em 3.5. As células foram cotransfectadas com a construção plasmidial pDsRED (PT3725-5 – Clontech), utilizada como um controle interno de transfecção, e 72 horas após a transfecção, as células foram dissociadas em solução de tripsina 0,25% p/v e EDTA 0,01% p/v (ambos Sigma Co., St, Louis, EUA) a 37°C por cerca de 2 minutos. As células recuperadas em meio suplementado com SFB foram centrifugadas à 1600 RPM por 5 minutos em centrífuga clínica, as células sedimentadas foram resuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo. O nível de recombinação de cada célula foi obtido através da normalização da porcentagem de células positivas para o GFP pela porcentagem de células positivas para o DsRed.

4.10. Análise por microscopia confocal

Foram plaqueadas 30.000 células das linhagens MCF7 shSCR e MCF7 shCDK9 em placas de cultivo de 1,9cm² de área contendo lamínulas de vidro estéreis. Após incubação por 24 horas em condições padrão de cultura, como descrito no item 3.4, as células foram submetidas ou não à radiação ionizante (5 e 10Gy) (X-RAD 320, Precision X-ray, North Branford, EUA). As células foram recuperadas em diferentes intervalos de tempo para análise.

As células foram tratadas com solução fixadora (paraformaldeído 4% v/v em solução salina PBS, todos reagentes Sigma Aldrich) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de permeabilização (Triton-X100 0,5% v/v em PBS, todos reagentes Sigma Aldrich) por 5 minutos a temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas com PBS e incubadas com solução de bloqueio (albumina sérica bovina – BSA 5% p/v em PBS, todos reagentes Sigma Aldrich) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período a solução de bloqueio foi removida e repostada por solução BSA 1% p/v em PBS contendo anticorpo primário específico conforme orientações dos fabricantes (**Quadro 4.2**). As células foram incubadas na presença do anticorpo primário apropriado por 30

minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas com solução de solução de BSA 1% p/v em PBS com anticorpos secundários (**Quadro 4.3**) segundo recomendações do fabricante, por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período as células foram lavadas com PBS e montadas em lâminas com meio de montagem (contendo DAPI) (Prolong Gold, Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

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

4.11. Ensaio de viabilidade celular

Foram plaqueadas 100 células das linhagens MCF7 shSCR e MCF7 shCDK9 em placas de petri de 9,5cm² de área. Após incubação por 24 h em condições padrão de cultura, como descrito no item 3.4, as células foram expostas à diferentes doses de radiação ionizante (2, 5 e 10Gy). As placas foram mantidas em cultura por 14 dias, utilizando uma mistura de meio de cultura fresco e meio condicionado (previamente metabolizado pelas linhagens, recolhido e filtrado) 50% v/v. Após este período as placas tiveram seus meios removidos e lavadas com solução salina PBS e, posteriormente, coradas com solução de cristal violeta (Sigma Aldrich) 1% p/v em metanol (Sigma Aldrich) por 30 minutos. A descoloração foi feita com sucessivas lavagens com água. As colônias celulares com mais de 20 células foram quantificadas por microscopia ótica de contraste de fase.

4.12. Análises estatísticas

Todos os dados apresentados na forma de gráficos de barras foram representados como média dos valores com desvio padrão. As diferenças entre os grupos foi avaliada através do teste de t de *student* (**Figuras 5.7, 5.8 e 5.9**); ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni (**Figuras 5.11 e 5.12**) (realizado no programa Graphpad Prism v.5.0[®] (Graphpad, La Jolla, EUA). Foram considerados significativamente diferentes valores com probabilidade de hipótese nula (*p*) menores que 0,05.

5. Resultados

5.1. Identificação de CDK9 como alvo de estudo

O trabalho colaborativo do nosso grupo (WOODS, N *et al.*, 2012), identificou mais de mil novas interações entre os diferentes domínios tBRCTs analisados. Este trabalho foi capaz de mapear a rede de interação entre diferentes proteínas, identificando parceiras de interação com apenas um ou mais tBRCTs. Dentre os alvos identificados, CDK9 se mostrou capaz de interagir com os domínios tBRCT de BARD1, PTIP (através da metodologia de purificação por afinidade em tandem seguido por espectrometria de massas) e BRCA1 (através da metodologia de dois híbridos em levedura).

O clone identificado na varredura de interação proteica, por interagir com o domínio tBRCT de BRCA1, através da metodologia de dois híbridos em levedura, corresponde à região C-terminal de CDK9, comum às isoformas 42k e 55k (**Figura 5.1**).

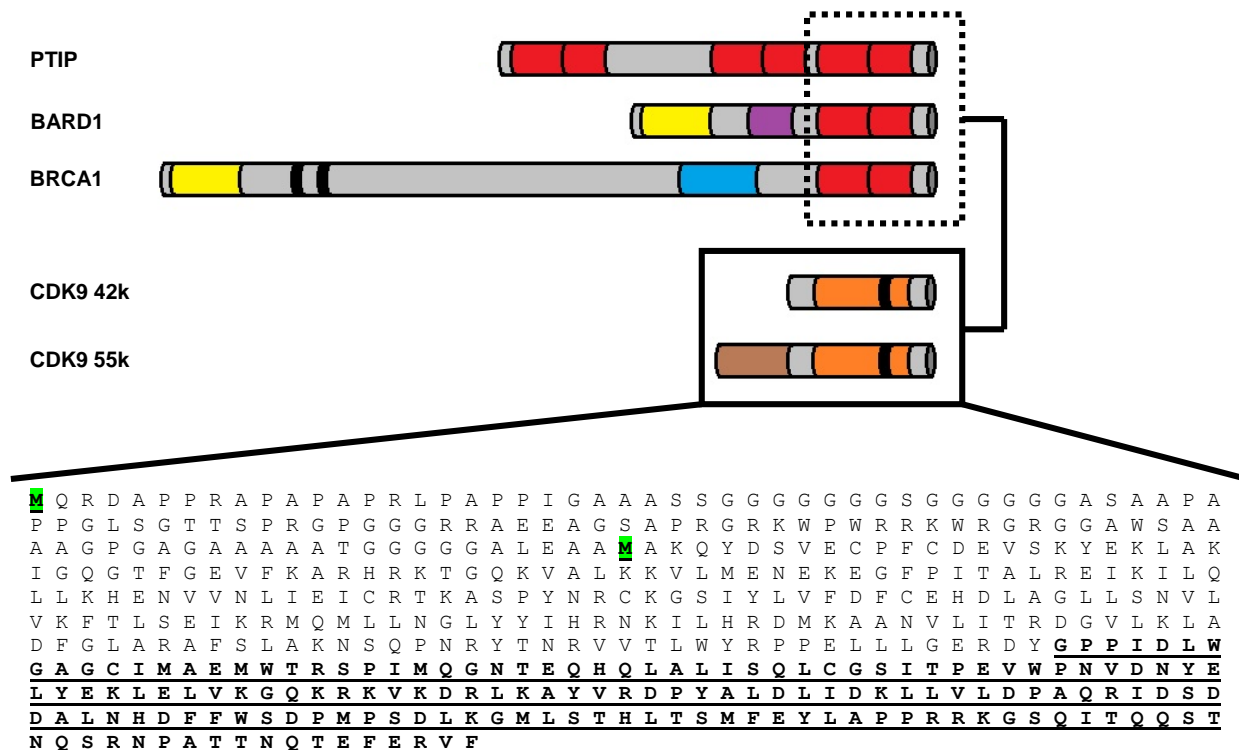


Figura 5.1 Representação esquemática da identificação de CDK9 como putativa parceira de interação dos domínios tBRCT de BRCA1, BARD1 e PTIP. As regiões vermelhas representam os domínios tBRCT, sendo destacados pela caixa pontilhada os domínios tBRCTs avaliados por Woods e colaboradores (2012). Os domínios RING-finger (em amarelo), repetições de ankirina (em roxo), coiled-coil (em azul), região rica em prolina e glicina (em marrom) e os domínios kinase (em laranja) também estão representados. Destaque para a sequência peptídica primária de CDK9, com destaque para os primeiros resíduos de aminoácidos das isoformas 42k e 55k (em verde) e para a sequência identificada por interagir com o domínio tBRCT de BRCA1 (adaptado de Woods e colaboradores, 2012).

5.2. Confirmação da interação entre CDK9 e BARD1

A interação entre o domínio tBRCT de BARD1 e CDK9, previamente descrita por Woods e colaboradores (2012), foi confirmada valendo-se de proteínas constitutivas de células humanas. Primeiramente, os níveis proteicos constitutivos de CDK9 e BARD1 foram analisados em extratos citoplasmáticos e nucleares de células humanas da linhagem HEK293FT. Apenas a isoforma 42k de CDK9 foi detectada (nas frações citoplasmática e nuclear); por outro lado, BARD1, foi detectado somente na fração nuclear, como esperado (**Figura 5.2**). Desta forma foram utilizados apenas extratos nucleares nos ensaios subsequentes.

A confirmação da interação foi realizada através de ensaios de coimunoprecipitação, onde CDK9 foi imunoprecipitada e o complexo proteico recuperado foi analisado através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para BARD1 (**Figura 5.2**). Os ensaios de coimunoprecipitação valeram-se de controle negativo utilizando anticorpos específicos para o epítipo HA.

Nossos resultados demonstraram que CDK9 e BARD1 interagem constitutivamente em células humanas.

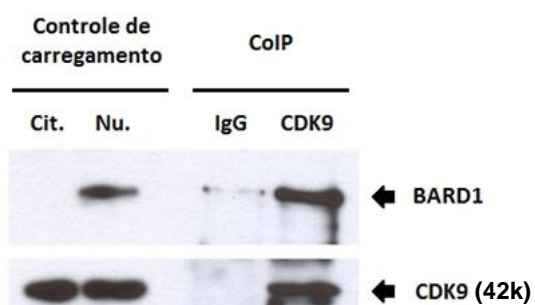


Figura 5.2 CDK9 interage contitativamente com BARD1. Os níveis proteicos de CDK9 e BARD1 foram avaliados em extratos citoplasmáticos (Cit) e nucleares (Nu) de células humanas da linhagem HEK293FT, através de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para CDK9 e BARD1. O ensaio de coimunoprecipitação (CoIP) foi realizado utilizando o extrato nuclear, usando anticorpos anti-HA (IgG) ou anti-CDK9. A presença das proteínas coimunoprecipitadas foi identificada com anticorpos anti-BARD1 e anti-CDK9.

Uma vez confirmada a interação BARD1/CDK9, a capacidade de BARD1 interagir igualmente com as duas isoformas descritas de CDK9 foi analisada através de ensaios de *GST pulldown*. A sequência codificante de BARD1 clonada no vetor de expressão em procariotos, pGEX-6p1 (para produção da proteína quimérica GST-BARD1; **Figura 5.3A**) foi transformada em bactérias *E. coli*, da cepa BL21 DE3. A expressão condicional da proteína de fusão foi realizada pela indução com IPTG, como descrito no item 3.3.5 e avaliada por *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para GST (**Figura 5.3B**). Paralelamente, células humanas da linhagem HEK293FT foram transfectadas com as construções codificantes das duas isoformas de CDK9, pCDNA3-HA-CDK9 42k ou pCMV-FLAG-CDK9 55k e seus extratos proteicos contendo as proteínas de fusão HA-CDK9 42k ou FLAG-CDK9 55k (**Figura 5.3A**) foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para os epítomos FLAG e HA.

Nossos resultados demonstraram que a proteína de fusão GST-BARD1, produzida em células procarióticas é capaz de interagir com ambas as isoformas de CDK9 (**Figura 5.3C e 5.3D**).

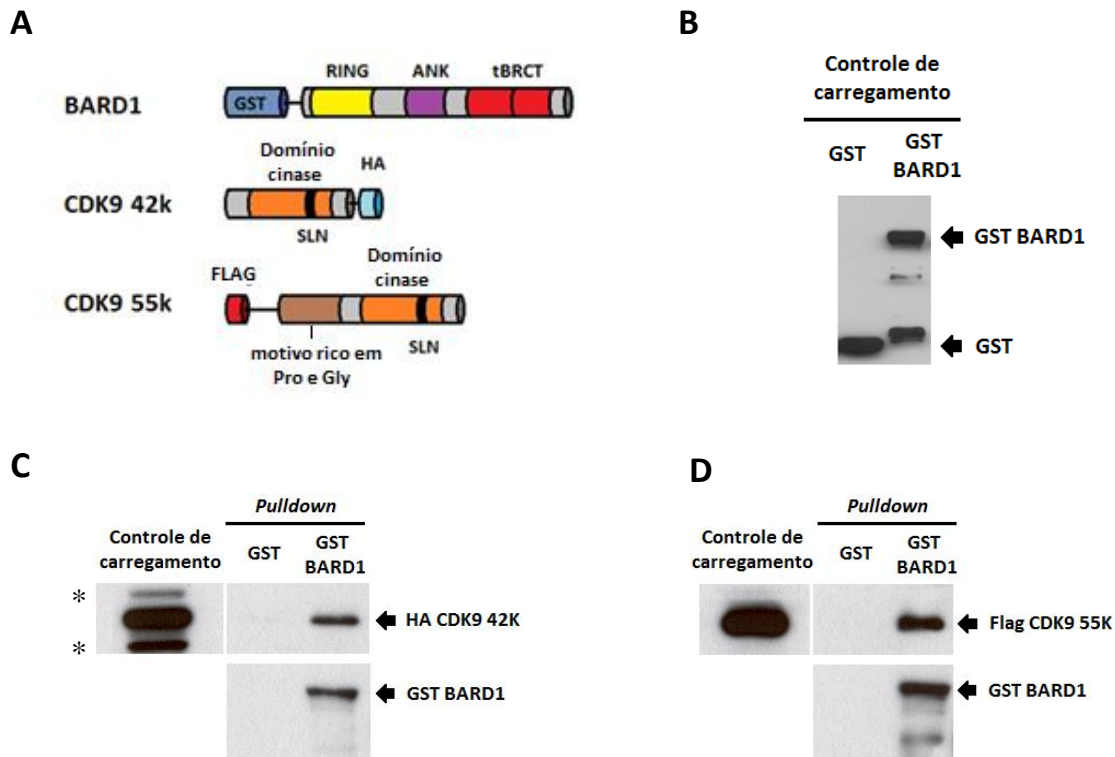


Figura 5.3 BARD1 é capaz de interagir com ambas isoformas de CDK9. (A) Representação esquemática das proteínas de fusão utilizadas nos ensaios de GST *pull-down*. Os principais domínios de cada proteína apresentam-se destacados. (B) O controle de carregamento das proteínas GST e GST-BARD1 produzidas em bactérias *E.coli* foi realizado através de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-GST. (C) os ensaios de GST pull-down foram realizados com as proteínas HA-CDK9 42k e (D) FLAG-CDK9 55k produzidas ectópicamente em células HEK293FT. O resultado dos ensaios foi avaliado através de *immunoblotting* usando anticorpos anti-HA, anti-FLAG e anti-GST. * representam possíveis modificações pós-traducionais da proteína de fusão HA-CDK9 42k.

5.3. Confirmação da interação entre CDK9 e BRCA1

Assim como BARD1, a interação entre BRCA1 e CDK9 descrita primeiramente por Woods e colaboradores em 2012, também foi confirmada valendo-se de proteínas constitutivas. Células humanas da linhagem HeLa tiveram a produção de CDK9 e BRCA1 avaliadas em extratos nucleares, e posteriormente utilizados nos ensaios de coimunoprecipitação (**Figura 5.4**). Fomos capazes de observar que as células humanas da linhagem HeLa produzem ambas as isoformas de CDK9, sendo a isoforma 42k produzida em maior extensão, como previamente demonstrado por Shore e colaboradores em 2003.

A confirmação da interação foi realizada através de ensaios de coimunoprecipitação, como descrito em 5.1, onde CDK9 foi imunoprecipitada e o complexo proteico recuperado foi analisado por rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para BRCA1 (**Figura 5.4**). Os ensaios de coimunoprecipitação valeram-se do controle negativo utilizando anticorpos específicos para o epítipo HA.

Nossos resultados demonstraram que CDK9 e BRCA1 interagem constitutivamente em células humanas, assim como com BARD1.

Também avaliamos a capacidade da região C-terminal de BRCA1 (região limitada pelos resíduos de aminoácido 1314 e 1863) de interagir com as duas isoformas de CDK9. Para isso, células humanas da linhagem HEK293FT foram cotransfectadas com as construções codificantes pEBG-BRCA1-tBRCT e pCMV-FLAG-CDK9 42k ou pCMV-FLAG-CDK9 55k e seus produtos proteicos (**Figura 5.5A**) foram utilizados em ensaios de GST *pulldown* como descrito em 3.9 (**Figura 5.5B**).

Nossos resultados demonstraram que a região C-terminal de BRCA1 interage somente com a isoforma 42k de CDK9.

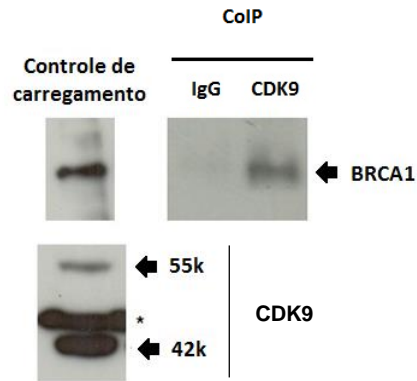


Figura 5.4 CDK9 interage contitativamente com BRCA1. Os níveis proteicos de CDK9 e BRCA1 foram avaliados em extratos nucleares em células humanas da linhagem HeLa, através de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para CDK9 e BRCA1. O * indica um reconhecimento inespecífico. O ensaio de coimunoprecipitação (CoIP) foi realizado utilizando o extrato nuclear, utilizando anticorpos anti-HA (IgG) ou anti-CDK9. A presença das proteínas coimunoprecipitadas foi identificada utilizando anticorpos anti-BRCA1 e anti-CDK9.

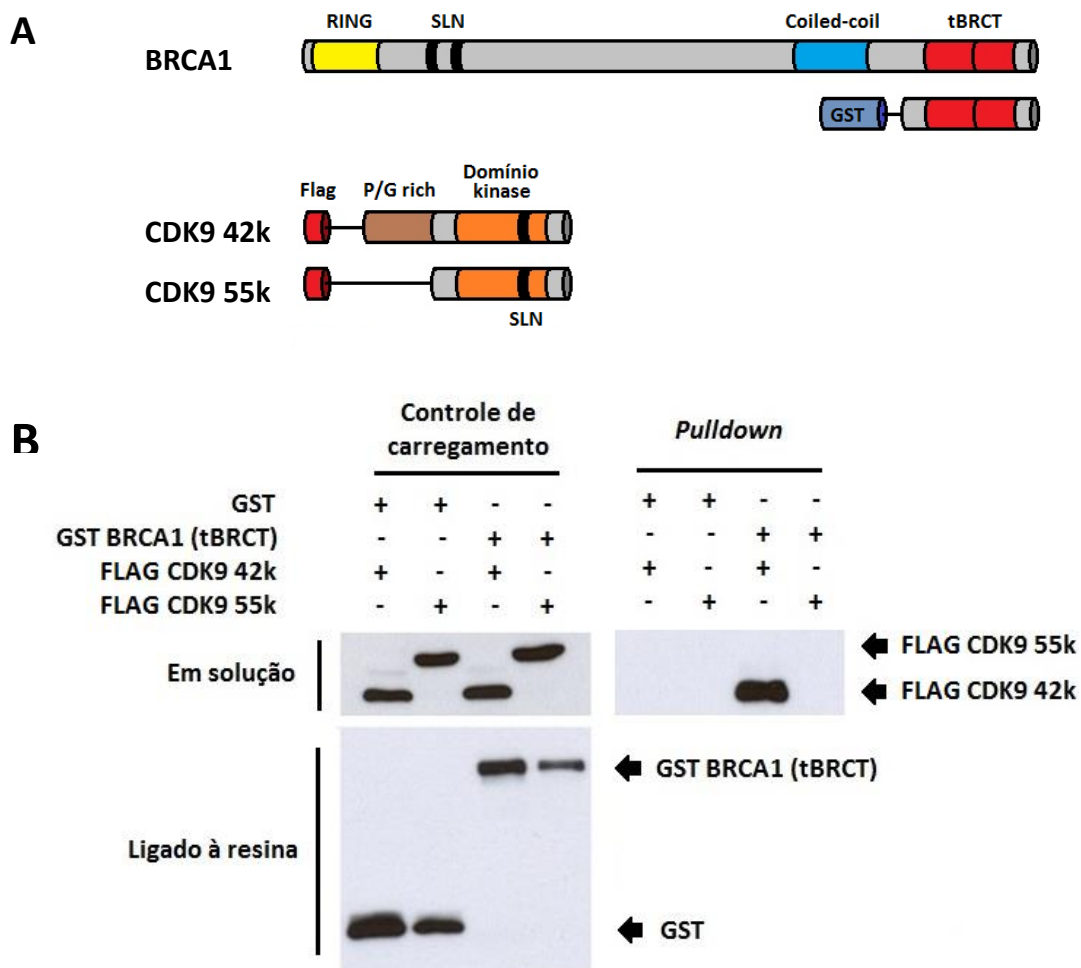


Figura 5.5 O domínio tBRCT de BRCA1 interage somente com a isoforma 42k de CDK9. (A) Representação esquemática das proteínas de fusão utilizadas nos ensaios de GST *pulldown*. Os principais domínios de cada proteína apresentam-se destacados. (B) as proteínas produzidas em células humanas da linhagem HEK293FT, em solução e ligadas à resina Sepharose 4B® foram avaliadas através de rotinas de *immunoblotting*. Os ensaios de GST *pulldown* foram avaliados através de *immunoblotting* com anticorpos anti-FLAG e anti-GST.

5.4 Análise da localização subcelular de CDK9 após dano ao DNA

A distribuição nuclear de CDK9 frente ao tratamento com radiação ionizante, foi realizada, com a finalidade de avaliar um possível papel da proteína na resposta ao dano de DNA. Células humanas da linhagem MCF7 foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e avaliadas três horas depois por microscopia confocal, utilizando anticorpos específicos para CDK9 e comarcação com DAPI.

Como demonstrado na **figura 5.6A**, CDK9 se localiza predominantemente no núcleo, de forma difusa. Porém, mediante ao tratamento com radiação ionizante, CDK9 acumula em determinadas regiões do núcleo, semelhante aos focos formados por proteínas envolvidas no reparo ao dano de DNA quando recrutadas aos sítios de dano (Rothkamm e colaboradores, 2015).

Tendo em vista que CDK9 interage com BRCA1 (**Figura 5.4**), avaliamos se os focos de CDK9, observados mediante tratamento com radiação ionizante, colocalizam com focos de BRCA1. Como descrito anteriormente, células humanas da linhagem MCF7 foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e avaliadas três horas depois por microscopia confocal, utilizando anticorpos específicos para CDK9 e BRCA1 e comarcação com DAPI. Nossos dados demonstraram que CDK9 se colocaliza com os focos de BRCA1 mediante danos ao DNA, induzidos por radiação ionizante (**Figuras 5.6B e 5.6C**)

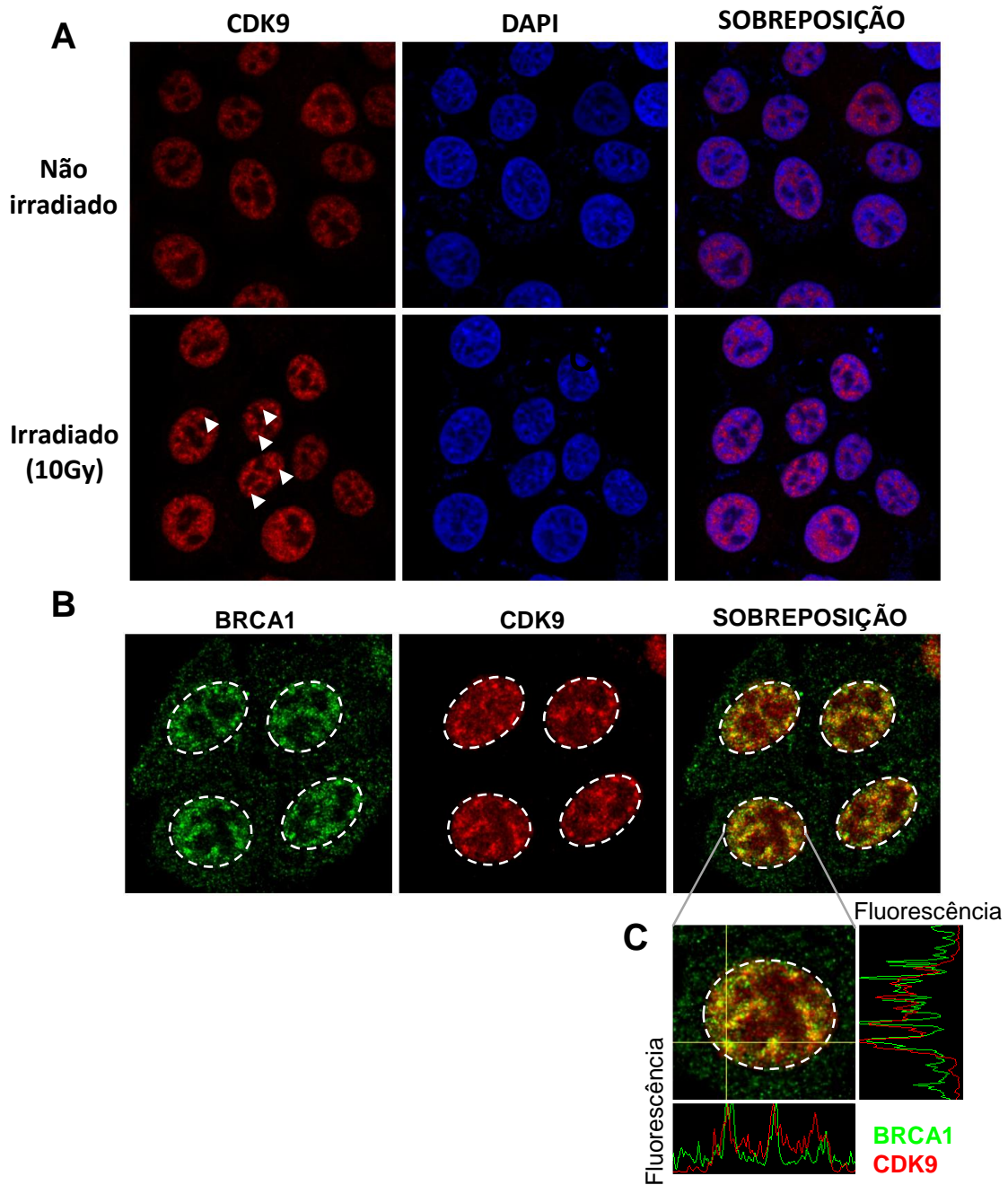


Figura 5.6 CDK9 forma focos mediante dano ao DNA, que colocalizam com BRCA1. Células humanas da linhagem MCF7 foram marcadas somente com anticorpos anti-CDK9 (**A**), ou juntamente com anticorpos anti-BRCA1 (**B**) e analisada por microscopia confocal. A análise da intensidade de fluorescência (**C**) demonstra o perfil de marcação para CDK9 (vermelho) e BRCA1 (verde) em um único núcleo. Todos os núcleos foram comarcadas com DAPI.

5.5 Análise do perfil proteico de CDK9 em células humanas

A produção proteica de ambas as isoformas de CDK9 foi avaliada em um painel de linhagens celulares humanas derivadas de tecidos mamários normal (MCF10A) ou tumoral (MCF7, MDA MB-231, T47D, HCC1937 e SUM1315). Extratos proteicos totais das diferentes linhagens celulares foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para CDK9 e β -actina (utilizada como controle de carregamento) (**Figura 5.7A**). Não fomos capazes de estabelecer uma relação direta entre o perfil molecular descrito das diferentes linhagens analisadas e a produção das duas isoformas de CDK9. De forma geral, todas as células se mostraram capazes de produzir as duas isoformas, mesmo que em diferentes extensões.

Com a finalidade de avaliar os efeitos da ausência de CDK9 em processos relacionados à resposta ao dano de DNA, células humanas da linhagem MCF7 foram transduzidas com partículas virais contendo construções para interferência da expressão gênica de *CDK9*, assim como para um alvo não-relacionado *scramble*. As células transduzidas foram selecionadas com puromicina e mantidas em culturas, como descrito em 4.10.2. Os níveis proteicos de CDK9 e β -actina (utilizada como controle de carregamento) foram avaliados através de rotinas de *immunoblotting* em extratos proteicos das linhagens interferidas MCF7 shSCR e MCF7 shCDK9 (**Figura 5.7B**). Nossos resultados demonstraram que as células MCF7 com a expressão gênica de *CDK9* silenciada apresentaram redução dos níveis proteicos de aproximadamente 95% e 100% das isoformas de 42k e 55k, respectivamente, quando comparado com as células MCF7 shSCR (**Figura 5.7C**).

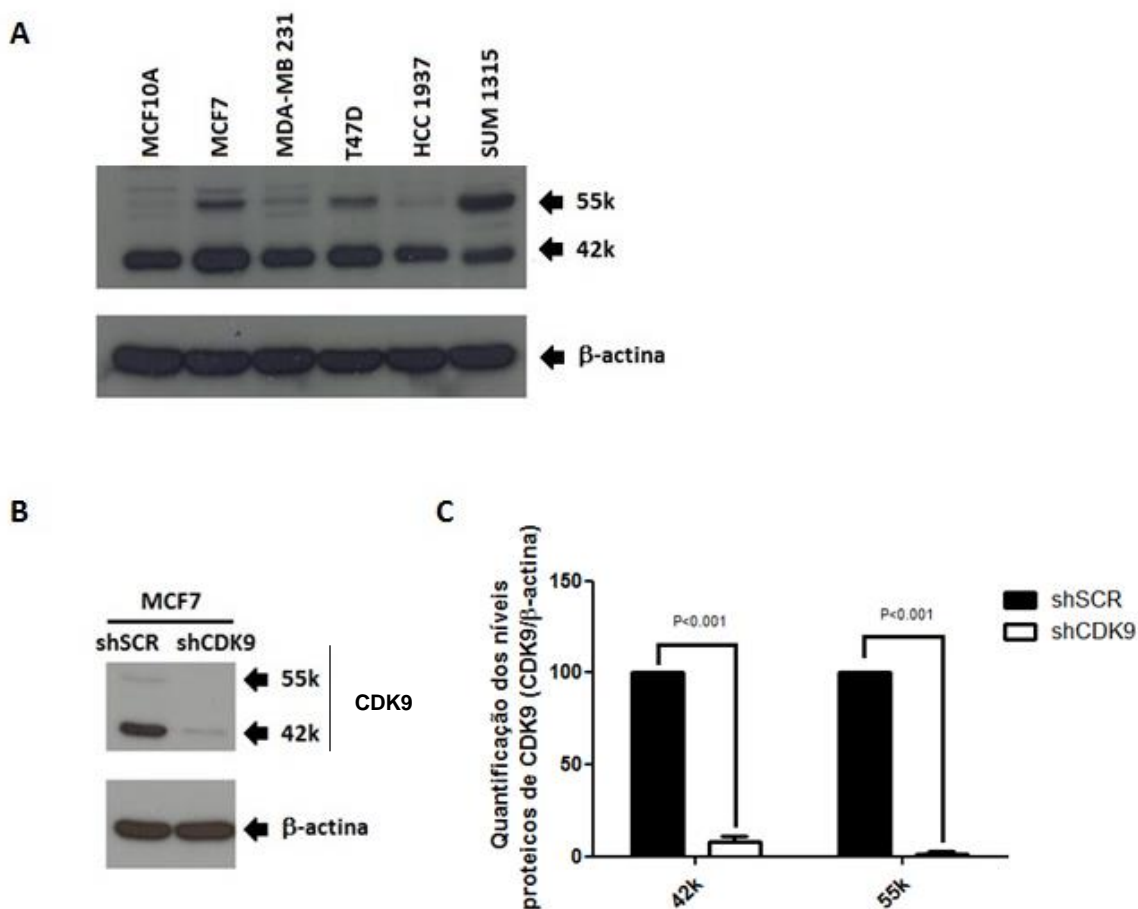


Figura 5.7 Perfil de produção das isoformas de CDK9 em linhagens humanas e células transduzidas com partículas lentivirais. (A) os níveis de CDK9 e β-actina (controle de carregamento) foram avaliados em extratos proteicos das células MCF10A, MCF7, MDA MB-231, T47D, HCC1937 e SUM1315 ou (B) nas transduzidas com as construções shSCR (*scrambled*) ou shCDK9, por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-CDK9 e anti-β-actina. (C) quantificação dos níveis proteicos de ambas as isoformas de CDK9. A quantificação foi realizada através de densitometria das bandas com o programa ImageJ (NCBI), tendo como normalizador os níveis de β-actina, e expressos em relação aos níveis das células shSCR.

5.6 Análise do reparo de quebra de dupla fita de DNA nas células com expressão gênica de *CDK9* silenciada

O papel de *CDK9* em vias de reparo moduladas pelo heterodímero *BRCA1/BARD1* foi analisado a fim de avaliarmos o papel das interações *CDK9/BRCA1* e *CDK9/BARD1*, no contexto de RDD. Sendo assim, as vias de reparo de quebra de dupla-fita por recombinação homóloga e não homóloga por junção de pontas foram avaliadas nas células com a expressão gênica de *CDK9* silenciada por citometria de fluxo, através de duas construções plasmidiais repórteres (**descritas em 4.11**).

As células interferidas para *CDK9* apresentaram deficiência de cerca de 40% na capacidade de reparar danos de quebra de dupla-fita de DNA pela via de recombinação homóloga, quando comparadas com as células controle (**Figuras 5.8A e 5.8B - painéis superiores**). Porém, a ausência de *CDK9* não alterou de forma significativa a capacidade das células de reparar o dano por quebra de dupla-fita através da via de recombinação não homóloga por junção de pontas (**Figura 5.8A e 5.8B - painéis inferiores**).

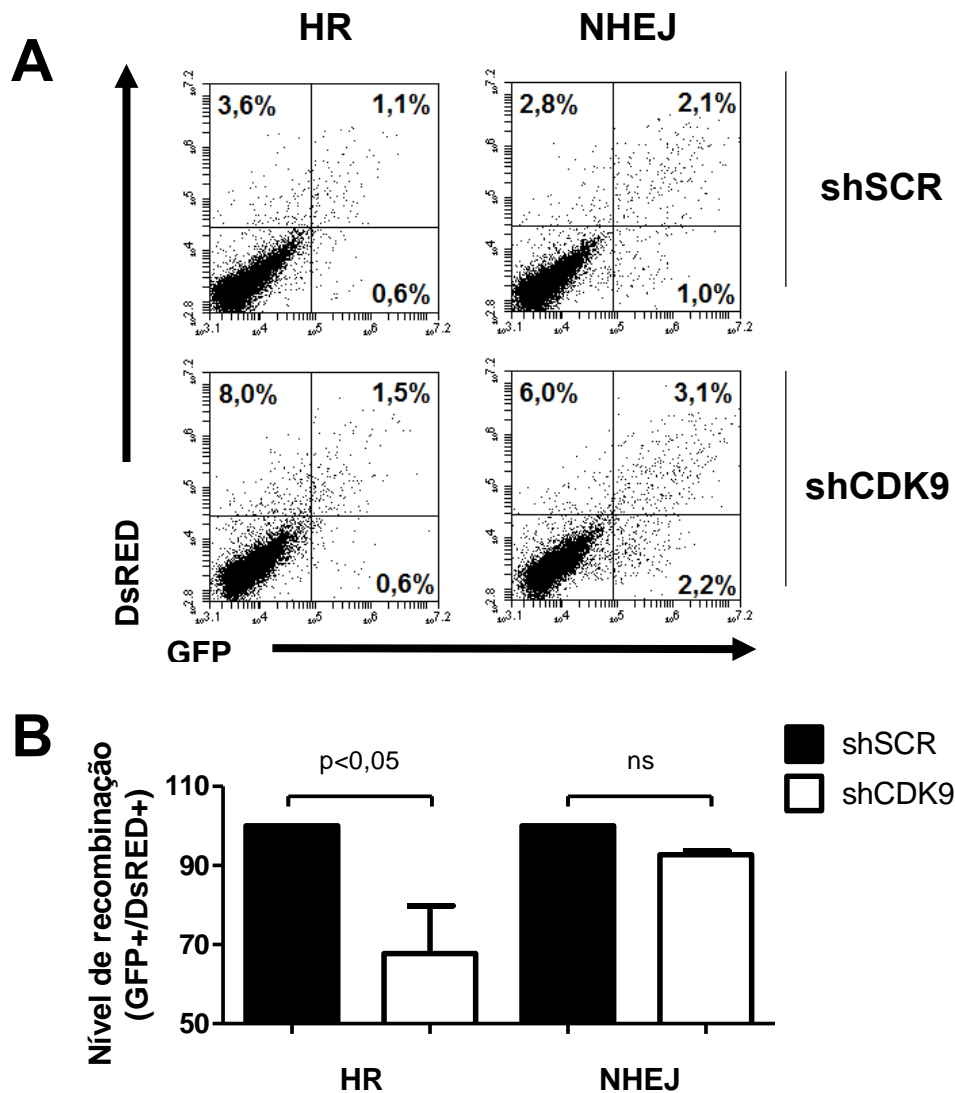


Figura 5.8 CDK9 modula o reparo por recombinação homóloga. (A) Aquisição das células por citometria de fluxo, avaliando o perfil de células positivas para GFP (eixo horizontal) e DsRED (eixo vertical). (B) representação gráfica dos níveis de recombinação homóloga e não-homóloga por junção de pontas. Os dados demonstram a média \pm DP da razão GFP⁺/DsRED⁺, normalizados pelas células shSCR. A análise estatística foi realizada pelo teste de t de *student*.

5.7 Análise do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano de DNA na ausência de CDK9

Tendo em vista que nossos resultados sugerem que CDK9 interage com BRCA1 e BARD1, e também participa do reparo ao dano de DNA por recombinação homóloga, avaliamos a formação de focos de BRCA1 mediante dano ao DNA induzido por radiação ionizante nas células com a expressão gênica de *CDK9* silenciada. As células MCF7 shCDK9 e shSCR foram expostas a radiação ionizante (10Gy) e após três horas, analisadas quanto a capacidade de formarem focos de BRCA1.

As células interferidas para CDK9 apresentaram deficiência na formação de focos de BRCA1 (**Figura 5.9A**), com redução de aproximadamente 40% no número de células com mais de 15 focos por núcleo (**Figura 5.9B**) e uma redução de aproximadamente 4 vezes do número absoluto de focos por célula (**Figura 5.9C**).

Considerando-se o papel de CDK9 em processos transcricionais, avaliamos se a redução do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA nas células MCF7 shCDK9 ocorre devido à redução dos níveis proteicos de BRCA1 e/ou BARD1, através da redução global dos transcritos de ambas as proteínas. Nossos resultados demonstraram que o silenciamento gênico de *CDK9* não é acompanhado pela redução dos níveis proteicos de BRCA1 e BARD1 (**Figura 5.10**)

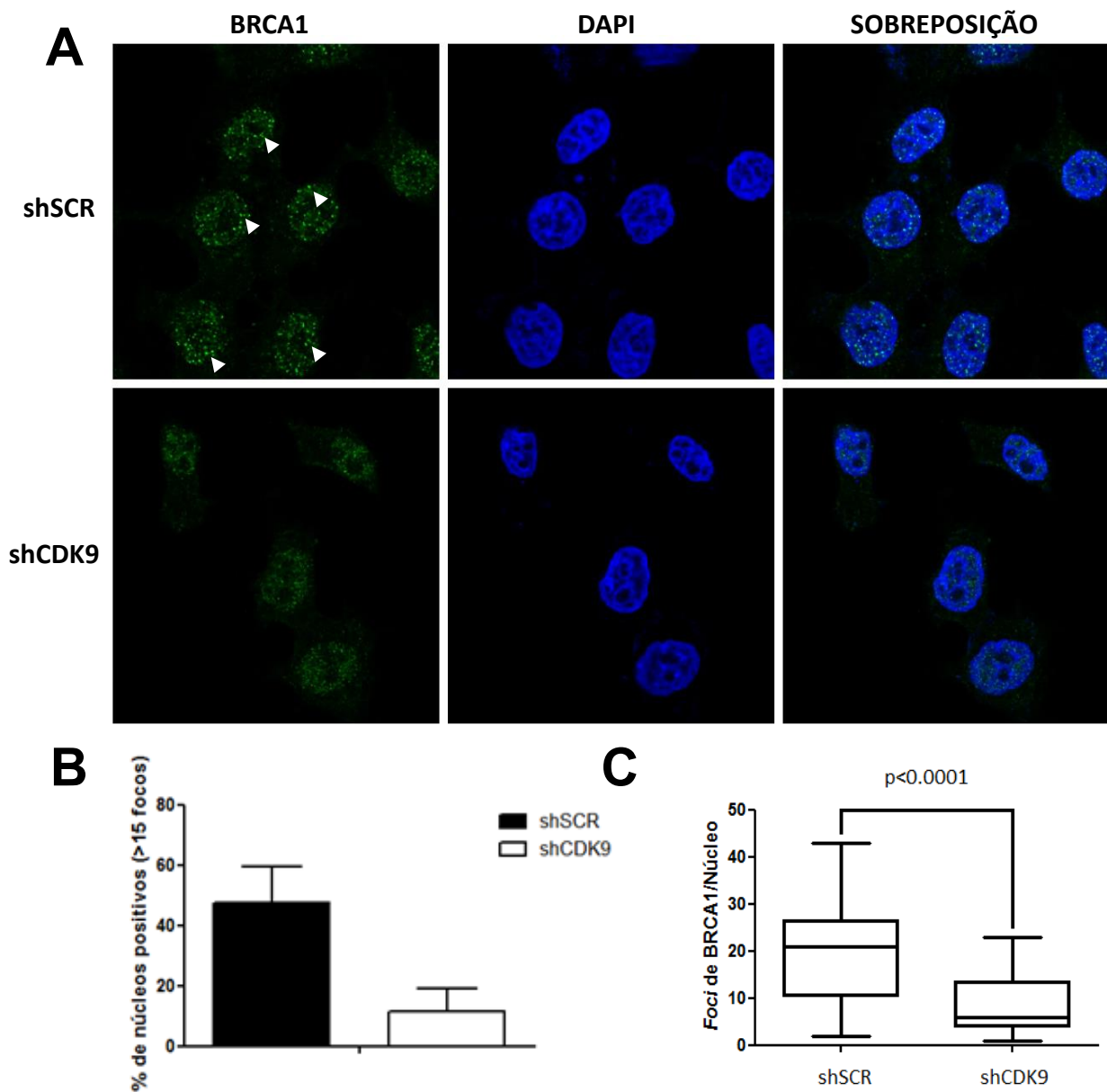


Figura 5.9 CDK9 modula o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA. (A) Células MCF7 shSCR e shCDK9 foram expostas à radiação ionizante (10Gy) e a formação de focos de BRCA1 (indicados pelas setas brancas), analisada três horas após o dano, usando anticorpos anti-BRCA1 e comarcadas com DAPI. (B) Os gráficos representam a porcentagem média de células com mais de 15 focos por núcleo em dois experimentos (C) e o número de focos/núcleo de um experimento representativo os focos de BRCA1 foram quantificados através do *software* ImageJ (NIH). A análise estatística foi realizada pelo teste de t de *student*.

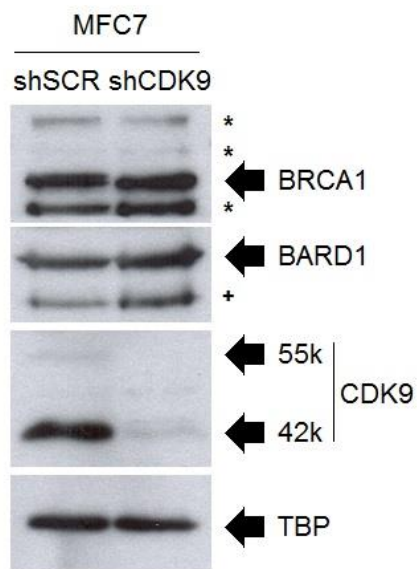


Figura 5.10 Perfil de produção de BRCA1 e BARD1 nas células com a expressão gênica de *CDK9* silenciada. Os níveis de BRCA1, BARD1, CDK9 e TBP (controle de carregamento) foram avaliados em extratos nucleares das células MCF7 shSCR e shCDK9, por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-BRCA1, anti-BARD1, anti-CDK9 e anti-TBP. Os * e + indicam bandas com massas moleculares diferentes das previstas nas marcações com anti-BRCA1 e anti-BARD1, respectivamente.

5.8 Análise da cinética de formação de focos de γ H2AX nas células silenciadas para *CDK9*

Ainda buscando avaliar o papel de *CDK9* nas vias de RDD, fomos avaliar a cinética de formação de focos de γ H2AX, principal marcador de quebra de dupla fita de DNA, nas células interferidas para *CDK9*. As células MCF7 shSCR e sh*CDK9* foram expostas à radiação ionizante (5Gy) e analisadas quanto a dinâmica de formação e resolução dos focos de γ H2AX, em um curso temporal.

Tanto a linhagem celular shSCR quanto sh*CDK9* apresentaram todas as células com marcação de mais de 10 focos de γ H2AX 30 minutos após o tratamento com radiação ionizante (**Figura 5.11A**). Contudo, uma hora após o tratamento, evidenciamos que as células sh*CDK9* apresentaram a redução de aproximadamente 40% no número de células com marcação de mais de 10 focos de γ H2AX, quando comparadas com as células controle (**Figura 5.11A e ampliado em 5.11B**). Por outro lado, três horas após a radiação, não há alteração entre os perfis de ambas as linhagens quanto à formação de focos de γ H2AX. As células interferidas para *CDK9* não apresentaram alteração na cinética de formação de focos de γ H2AX, porém apresentaram um perfil de resolução acelerado, quando comparadas com as células controle (**Figura 5.11C**).

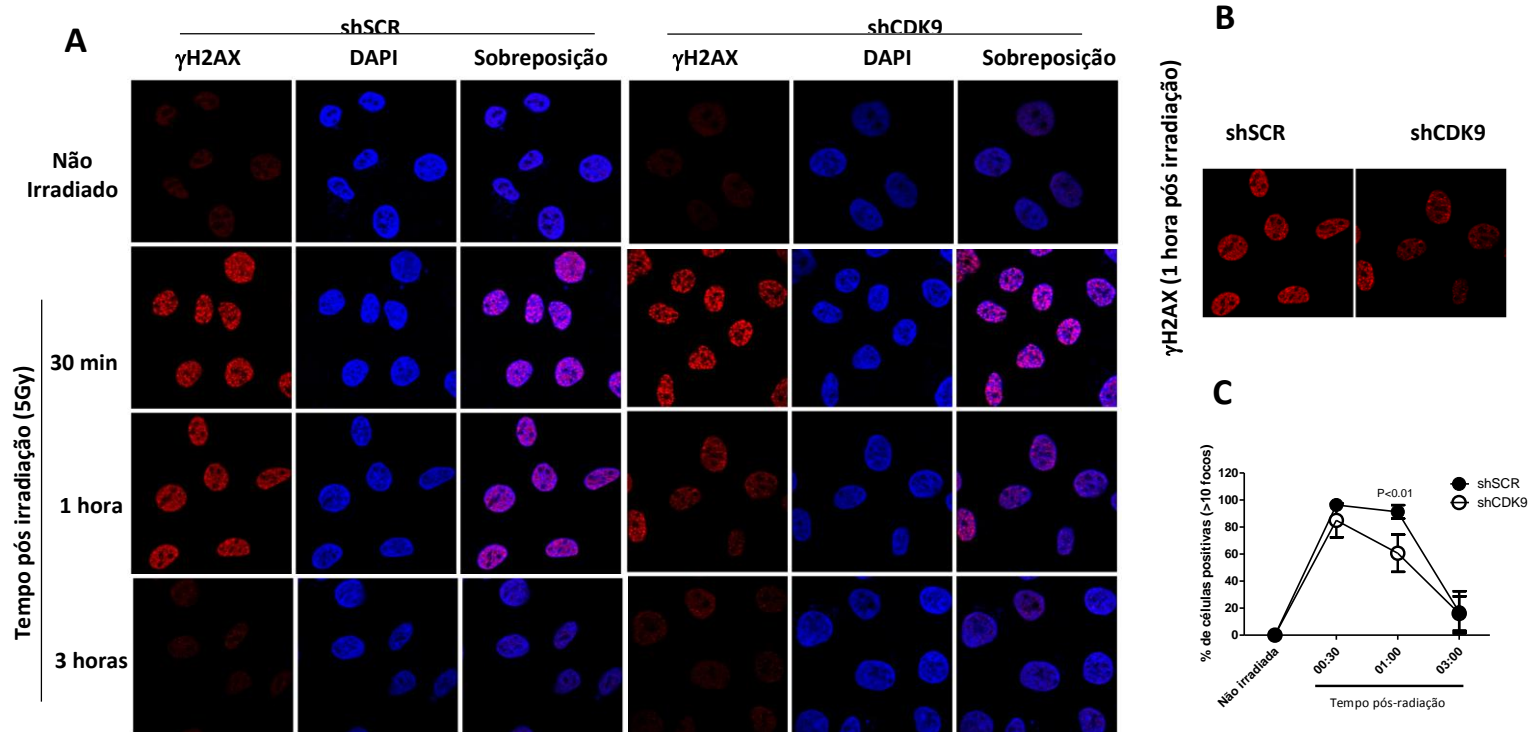


Figura 5.10. Células silenciadas para CDK9 apresentam a cinética de resolução dos *foci* de γ H2AX alterado. (A) células MCF7 shSCR e shCDK9 foram expostas à radiação ionizante (5Gy) e marcadas nos tempos determinados, com anticorpos anti- γ H2AX e comarcadas com DAPI. (B) as células shCDK9 apresentam uma dinâmica de resolução dos focos de γ H2AX acelerada, quando comparadas com as células controle. (C) os foci foram quantificados através do *software* ImageJ (NIH). A análise estatística foi realizada pelo teste de t de *student*.

5.9 Avaliação da sensibilidade de células interferidas para *CDK9* à radiação ionizante.

Tendo em vista o papel de CDK9 no reparo ao dano de DNA, avaliamos a capacidade das células interferidas para *CDK9* de reparar danos ao DNA induzidos pela radiação ionizante e continuarem proliferando, através de um ensaio formação de colônias. As células MCF7 shSCR e shCDK9 foram tratadas com diferentes doses de radiação ionizante e tiveram o número de colônias quantificado após 14 dias em cultura.

Nossos resultados demonstraram que a ausência de CDK9 nas células MCF7 provocou uma redução de aproximadamente 23% na capacidade de formar colônias, após tratamento com 2Gy de radiação ionizante, quando comparadas com a linhagem controle. Por outro lado, quando expostas a 5Gy, ambas as linhagens exibiram o mesmo perfil de sensibilidade, apresentando cerca de 10% do número de colônias observado na situação controle. Na dose mais alta, de 10Gy, não fomos capazes de evidenciar a formação de colônias em nenhuma das linhagens (**Figura 5.12**).

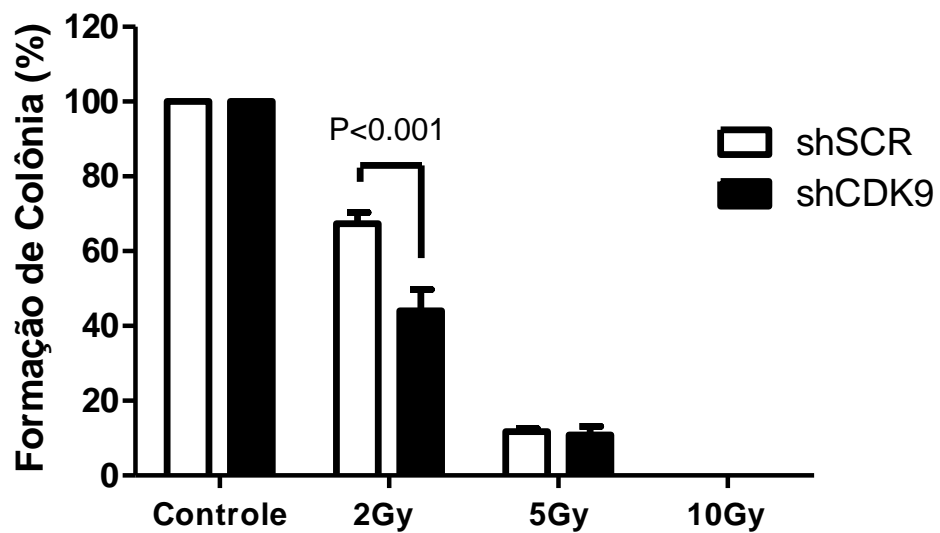


Figura 5.12 A redução dos níveis de CDK9 geram um fenótipo de sensibilidade à radiação ionizante. As células shSCR e shCDK9 foram plaqueadas em baixa densidade (100 células por poço) e expostas à diferentes doses de radiação ionizante. Após 15 dias em cultura, as células foram coradas com cristal violeta e colônias com mais de 20 células foram quantificadas. Os dados representam as médias \pm DP de triplicadas, normalizadas

pelos respectivos controles. A análise estatística foi realizada pelo método, ANOVA bifatorial.

6. Discussão

Nos últimos anos, CDK9 vem sendo relacionada à processos de manutenção da IG, através de seu papel no estresse replicativo e reparo ao dano de DNA. A primeira descrição de CDK9 atuando em resposta ao estresse replicativo foi feita por Yu e colaboradores (2010), que demonstraram um aumento de sensibilidade ao colapso da forquilha de replicação induzido por hidroxiuréia, na ausência de CDK9 e ciclina K (previamente descrita por interagir com CDK9 por Fu e colaboradores, 1999) Este mesmo trabalho demonstrou que CDK9 é capaz de interagir com ATR e ATRIP, duas proteínas fundamentais para a sinalização da exposição de fita simples durante a replicação do DNA, e que na ausência de CDK9 o recrutamento de RPA, proteína que se liga à regiões de simples fita de DNA, para a cromatina ocorre de forma aberrante. No mesmo ano, Liu e colaboradores (2010) demonstraram que somente uma das isoformas de CDK9 (55k) é capaz de interagir com o heterodímero Ku70/80, proteínas moduladoras do reparo por NHEJ, mostrando que a ausência da isoforma 55k é acompanhada de um aumento da fosforilação de H2AX, e da clivagem de PARP1, marcadores clássicos de quebra de dupla fita e da indução de apoptose, respectivamente.

Mais recentemente, o trabalho de Zhang e colaboradores (2013) demonstrou que o papel desempenhado pela proteína SIRT2, deacetilase da família das sirtuínas, em resposta ao estresse replicativo ocorre, em parte, pelo controle de atividade de CDK9 através da manutenção da cinase em estado ativo, pela deacetilação de seus resíduos de lisina nas posições 44 e 48.

O nosso estudo buscou contribuir para o esclarecimento do papel de CDK9 em vias de manutenção da IG, em especial no reparo de danos ao DNA, em conjunto com BRCA1.

BRCA1 desempenha sua função supressora de tumor atuando como uma plataforma de coordenação que modula o recrutamento de diferentes complexos para os sítios de quebra de dupla fita, além de atuar no controle do ciclo celular e processos transcricionais. Em um primeiro momento, a identificação dos parceiros de interação de BRCA1 foi fundamental para o esclarecimento das diferentes funções desempenhadas por essa proteína (revisado por SAVAGE, K E HARKIN, D., 2015).

Em 2012, Woods e colaboradores descreveram uma rede de interação entre proteínas que, assim como BRCA1, apresentam domínios tBRCT. Nessa varredura, CDK9 foi identificada como um putativo parceiro de interação dos tBRCTs de BRCA1, BARD1 e PTIP. A determinação efetiva da participação de CDK9 em complexos com esses parceiros requer a confirmação dessas interações em um contexto de proteínas cadeia completa e em níveis constitutivos de síntese, tendo em vista que a identificação inicial se baseou apenas nos domínios tBRCTs isolados.

Em um primeiro momento, fomos capazes de observar que as interações CDK9/BARD1 e CDK9/BRCA1 ocorrem de forma constitutiva em células humanas das linhagens HEK293FT e HeLa, respectivamente (**Figuras 5.2 e 5.4**). Confirmando o resultado obtido por Woods e colaboradores (2012).

Nossos resultados sugerem que CDK9, talvez, possa atuar em conjunto com o heterodímero BRCA1/BARD1 em resposta a danos ao DNA.

Tendo em vista que os ensaios de coimunoprecipitação valeram-se de anticorpos específicos para CDK9 capazes de reconhecer ambas as isoformas (42k e 55k), inicialmente, não foi possível determinar se as interações com BRCA1 e BARD1 se davam com uma isoforma específica ou ambas. Para respondermos a essa questão fizemos uso de ensaios de GST *pull-down*, usando como isca, em um primeiro momento, a proteína de fusão GST-BARD1, produzida em bactérias *E.coli* (**Figura 5.3A e 5.3B**), e observamos que BARD1 cadeia-completa é capaz de interagir com ambas isoformas de CDK9 (**Figura 5.3C e 5.3D**). Por outro lado, a região C-terminal de BRCA1, que encerra seu domínio tBRCT, quando fusionada ao GST e produzida em células humanas da linhagem HEK293FT (**Figura 5.5A**), se mostrou capaz de interagir somente com a isoforma 42k de CDK9 (**Figura 5.5B**).

Esses dados sugerem que exista um controle fino no que diz respeito à modulação da formação desses complexos, uma vez que somente a adição de 117 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal da isoforma 42k, é capaz de abolir a interação com o tBRCT de BRCA1. E quando avaliamos a interação com BARD1, produzido em células procarióticas, onde o contexto de modificações pós-traducionais não é o mesmo encontrado em células humanas, ambas as isoformas são capazes de interagir com a proteína isca.

Não podemos descartar a possibilidade de que a isoforma 55k de CDK9 atue juntamente com BARD1 em suas funções independentes de BRCA1, como a modulação da atividade transcricional de NF- κ B através da interação com Bcl-3 (DECHEND, R. *et al.*, 1999).

A literatura sugere um papel importante de CDK9 na resposta ao dano de DNA, e nossos dados apontam para a interação desta cinase com duas proteínas centrais no reparo de quebra de dupla fita do DNA, BRCA1 e BARD1. Proteínas classicamente envolvidas com o reparo ao dano de DNA, quando recrutadas aos sítios de dano, formam estruturas denominadas focos que podem ser visualizadas através de análises por microscopia confocal (WANG, Y *et al.*, 2000). Avaliamos então, a capacidade de CDK9 formar focos mediante radiação ionizante.

Como demonstrado na **figura 5.6**, as células MCF7, apresentam uma distribuição nuclear difusa de CDK9 que, mediante dano ao DNA, é alterada, formando focos nucleares. Essa é a primeira observação de que CDK9 se comporte dessa forma frente a tratamento com radiação ionizante, não havendo descrição prévia desse fenômeno na literatura (**Figura 5.6A**). Considerando-se que esse é um comportamento classicamente observado com proteínas envolvidas com reparo ao dano de DNA, como BRCA1 e BARD1, nossos dados sugerem que CDK9 possa participar, efetivamente, de mecanismos de reparo através do seu recrutamento para os sítios de dano. Adicionalmente, nossos dados demonstraram a colocalização dos focos de CDK9 e BRCA1 (**Figura 5.6B**), corroborando a ideia de que a interação, previamente observada através de rotinas de coimunoprecipitação, ocorra em sítios de dano ao DNA, e também sugerindo que o complexo BRCA1/CDK9 atue em conjunto nesses processos.

O perfil de produção das isoformas de CDK9 foi avaliado em um painel de diferentes linhagens celulares humanas provenientes de tecidos mamários normais e tumorais, onde todas as extrações proteicas foram realizadas com as culturas celulares

em alta densidade (confluência). Nossos resultados demonstraram que a produção da isoforma 42k ocorre de forma ubíqua dentre as diferentes linhagens, ao passo que a produção da isoforma 55k ocorre de forma variável (**Figura 5.7A**). Não fomos capazes de estabelecer uma relação entre os níveis de produção da isoforma 55k com as características histopatológicas das linhagens avaliadas. Segundo dados do atlas humano de proteínas (acessível através do sítio www.proteinatlas.org) os níveis de CDK9 em tecido mamário, normal e tumoral, são altos e localizados majoritariamente no núcleo. Entretanto, tendo em vista que esta análise foi realizada através de rotinas de imunohistoquímica, não podemos avaliar a abundância das isoformas.

Para avaliarmos o papel de CDK9 em resposta ao dano de DNA, utilizamos como modelo o silenciamento gênico pela metodologia de shRNA através da transdução com partículas lentivirais. As células MCF7 foram escolhidas para as rotinas de silenciamento por serem a única linhagem a disposição com informações depositadas no banco de dados do atlas humano de proteínas. O silenciamento gênico de *CDK9* se mostrou eficaz, gerando uma extensa redução dos níveis de ambas as isoformas da proteína (**Figura 5.7B e 5.7C**), demonstrando que as células silenciadas podem ser utilizadas como modelo para avaliar o impacto de CDK9 no reparo ao dano de DNA, como no contexto das funções desempenhadas por BRCA1 e BARD1.

Uma das principais funções desempenhadas pelo heterodímero BRCA1/BARD1 é a modulação das vias de reparo por recombinação homóloga e não homóloga por junção de pontas (NHEJ). Já foi demonstrado que células deficientes em BRCA1 apresentam alterações nos níveis de recombinação homóloga e não homóloga (DURANT, S E NICKOLOFF, J 2005). BRCA1 forma, majoritariamente, quatro diferentes complexos mediante dano ao DNA. Dentre esses, o complexo BRCA1-A (composto por RAP80, MERIT e BRE) é capaz de controlar os níveis de recombinação homóloga através da promoção do reparo por NHEJ (Revisdo por CHRISTOU, C. e KYRIACOS, K., 2013; SAVAGE, K e HARKIN, D., 2015). Os outros complexos de BRCA1 (complexos B, C e D) são descritos como responsáveis somente pela ativação do reparo por HR.

Tendo em vista que CDK9 interage tanto com BRCA1 como BARD1, e parece estar envolvida com mecanismos de reparo ao dano de DNA, uma vez que forma focos frente ao dano, as células com expressão gênica de *CDK9* silenciada foram avaliadas quanto sua capacidade de reparar danos ao DNA pelas vias de HR e NHEJ.

A análise do reparo foi realizada através de sistemas repórteres episomais que permitem a avaliação das vias de HR e NHEJ de forma independente (descrito na **seção 4.11**). Por essa estratégia, as construções plasmidiais são submetidas a rotinas de digestão com a enzima de restrição I-SceI e posteriormente purificadas e utilizadas em rotinas de transfecção das células alvo. Para a avaliação do reparo por HR, o plasmídeo reporter apresenta, sobre o controle do promotor de CMV, a sequência codificante da proteína verde fluorescente truncada, pela ausência de 22 pares de base e adição de dois sítios de reconhecimento para a enzima I-SceI no início da sequência. À jusante desta região codificante, encontra-se a sequência homóloga selvagem da porção codificante inicial do GFP, sem a presença de um códon de iniciação (ATG), impossibilitando que haja transcrição desta região (**Figura 4.3A**). Mediante a quebra de dupla fita induzida pela digestão com a enzima I-SceI, as vias de sinalização e reparo são ativadas com o intuito de reparar o dano gerado. Porém somente o reparo pela via de HR é capaz de restaurar a fluorescência do GFP, por fazer uso da região homóloga à jusante do sítio da lesão, permitindo a avaliação pontual do reparo por HR. No caso do sistema para avaliação do reparo por NHEJ, o plasmídeo apresenta a sequência codificante do GFP truncada pela presença de uma região exônica flanqueada por dois sítios de reconhecimento da enzima I-SceI e dois íntrons (**Figura 4.3A**). Nesse caso, mediante a quebra de dupla fita induzida pela digestão com a enzima I-SceI, as vias de sinalização e reparo também são ativadas, porém somente o reparo pela via de NHEJ é capaz de restaurar a fluorescência do GFP através da ligação das fitas lesionadas, restaurando assim a região intrônica, que será processada durante a transcrição do GFP (SELUANOV, A *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram que a ausência de CDK9 é acompanhada pela redução dos níveis de HR e não de NHEJ, sugerindo que CDK9 possa participar de complexos, juntamente com BRCA1 e BARD1, que modulem essa via de forma específica (**Figura 5.8**). Dos complexos proteicos formados por BRCA1, três modulam o reparo por HR. O complexo BRCA1-B (formado por BARD1, TopBP1 e BACH1) atua durante a replicação do DNA, sendo responsável pela ativação da cinase ATR mediante exposição de fita simples, que por sua vez pode causar eventos de recombinação aberrante (Revisado por CHRISTOU, C e KYRIACOS, K., 2013; SAVAGE, K e HARKIN, D., 2015).

O complexo BRCA1-C (formado por BARD1, MRE11, NBS1, RAD50 e CtIP) é responsável pela etapa de ressecção das fitas lesionadas, mediante quebra de dupla fita,

fundamental para que ocorra a ativação do reparo por HR em detrimento do reparo por NHEJ (Revisdo por CHRISTOU, C e KYRIACOS, K., 2013; SAVAGE, K e HARKIN, D., 2015). Em seguida, a fita simples gerada pela ressecção é capeada por RPA que consequentemente ativa ATR. Yu e colaboradores (2010) demonstraram o importante papel desempenhado por CDK9 no controle do recrutamento de RPA para a cromatina em situações de estresse replicaivo. No contexto de nossos dados, é razoável especular que CDK9 possa participar destes complexos durante o reparo por HR, juntamente com BRCA1 e BARD1.

BRCA1 desempenha duas outras funções determinantes no reparo por recombinação homóloga. A promoção do recrutamento da recombinase RAD51 através do complexo BRCA1-D (BRCA1/PALB2/BRCA2) e juntamente com BARD1, através da ubiquitinação da histona H2A, modulando a compactação do DNA e ativação das vias de reparo (Revisdo por CHRISTOU, C e KYRIACOS, K., 2013; SAVAGE, K e HARKIN, D., 2015).

Tendo em vista esse papel central de BRCA1 no reparo por recombinação homóloga e que a ausência de CDK9 é acompanhada pela redução dos níveis de reparo por HR, avaliamos se o recrutamento de BRCA1 para os sítios de dano ao DNA ocorre normalmente nas células com a expressão gênica de *CDK9* interferida. Para tanto, as células MCF7 shSCR e shCDK9 foram submetidas a tratamento com radiação ionizante e analisadas quanto a capacidade de formar focos de BRCA1. Os dados obtidos nesse modelo indicam que o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ocorre em parte de forma dependente de CDK9 (**Figura 5.9A - C**), sugerindo que a interação entre CDK9/BRCA1 module, de alguma forma, o recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano. Existe ainda a possibilidade de que a ausência de CDK9 possa desencadear o desacoplamento de complexos que a cinase participe e sejam responsáveis pelo recrutamento de BRCA1.

Dados da literatura apontam para um papel importante de CDKs no reparo por recombinação homóloga através da fosforilação de CtIP, NBS1 (WANG, H *et al.*, 2013) e RNF4 (LUO, K *et al.*, 2015), assim, existe a possibilidade de que CDK9 desempenhe sua função no reparo ao dano de DNA através da fosforilação dessas proteínas chave no reparo por HR.

Considerando o papel de CDK9 no controle da etapa de alongamento da transcrição, não podemos descartar a possibilidade de que a ausência da cinase no

contexto celular possa gerar uma redução dos níveis globais de transcritos e consequentemente de proteínas importantes na via de reparo ao dano de DNA, e consequentemente recrutamento de BRCA1. Contrapondo essa hipótese, dados de Liang e colaboradores (2015) demonstraram que células HCT116, quando interferidas para expressão de *CDK9*, apresentam aumento de cópias de RNA mensageiro (observado através de rotinas de sequenciamento de RNA) que codificam proteínas relacionadas ao reparo de quebras de dupla fita, como RAD50 e RAD51 (LIANG, K. *et al.*, 2015).

Paralelamente, também avaliamos se o fenômeno de redução do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA, na ausência da cinase, estariam relacionados a uma redução global dos níveis proteicos de BRCA1 ou BARD1 (que controla a importação nuclear de BRCA1), por meio da redução de sua expressão gênica. Como mostra a **Figura 5.10**, a redução dos níveis de CDK9 não é acompanhada pela redução de BRCA1 e BARD1, sugerindo que o mecanismo para o controle do recrutamento de BRCA1 por CDK9 ocorra de forma independente do seu papel no controle da transcrição.

Em 1998, Ragakou e colaboradores identificaram que a variante X da histona H2A era rapidamente fosforilada mediante quebras da dupla fita de DNA. O acúmulo de quase vinte anos de conhecimento, nos aponta um papel fundamental de H2AX na RDD, atuando como um marcador de quebras de dupla fita e sendo responsável pelo recrutamento de diferentes complexos proteicos aos sítios de dano, permitindo o reparo efetivo das lesões, seja por recombinação homóloga ou não homóloga (PODHORECKA, M. *et al.*, 2010).

Considerando o papel de CDK9 no reparo por recombinação homóloga associado a BRCA1, avaliamos a dinâmica de resolução das quebras de dupla fita geradas por radiação ionizante através da marcação de γ H2AX. Nossos dados demonstraram que na ausência de CDK9 as células MCF7 resolvem os danos mais rapidamente do que células proficientes em CDK9, sugerindo que na ausência da proteína, e consequentemente redução da recombinação homóloga, as células sejam capazes de reparar as quebras duplas de DNA por mecanismos mais simples e rápidos (**Figura 5.11A - C**) (SHIBATA, A. *et al.*, 2011).

Recentemente, Truong e colaboradores (2013) mostraram que os mecanismos de reparo por recombinação homóloga e por junção de pontas mediado por micro-homologia (*microhomology-mediated end joining* – MMEJ) compartilham as etapas

iniciais de sinalização. Adicionalmente, a redução do reparo por HR é capaz de favorecer o reparo por MMEJ (DENG, S. *et al.*, 2014). Tendo em vista que no nosso modelo, as células MCF7 shCDK9 apresentam redução dos níveis de recombinação homóloga e não são capazes de recrutar BRCA1 de forma eficiente, existe a possibilidade de que nestas mesmas células o reparo por MMEJ seja favorecido, e conseqüentemente o reparo ocorra de forma acelerada, justificando a alteração na cinética de resolução dos focos de γ H2AX.

As evidências observadas em nosso trabalho suportam um papel importante de CDK9 no reparo de danos ao DNA. Tendo em vista que células com deficiência no reparo por HR, apresentam uma maior sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante (LIM, Y. *et al.*, 2014), avaliamos a capacidade das células MCF7 shSCR e shCDK9 de sobreviverem e formarem colônias frente ao tratamento com radiação. Nossos resultados demonstraram que as células com a expressão gênica de *CDK9* silenciada apresentaram uma maior sensibilidade ao tratamento em baixas doses (**Figura 5.12**). Nossos dados sugerem que em doses baixas (2 Gy) a deficiência no reparo por HR, gerado pela ausência de CDK9, é suficiente para gerar um aumento na sensibilidade ao tratamento, enquanto que em doses mais altas (5 Gy), onde a quantidade de quebras é muito alta, isso não ocorre.

Coletivamente nossos dados demonstraram que CDK9 está envolvida em vias de RDD, atuando no reparo ao dano de DNA através da via de recombinação homóloga. Adicionalmente foi demonstrado que CDK9 interage com BRCA1 e BARD1 e é fundamental para o recrutamento efetivo de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA. Além disso, observamos que na ausência de CDK9 o reparo ocorre de forma acelerada. Demonstramos também que CDK9 desempenha um papel importante na capacidade de sobrevivência de células expostas a doses baixas de radiação ionizante.

7. Conclusões

Neste trabalho evidenciamos a participação de CDK9 no reparo ao dano de DNA, através de sua interação com BRCA1 e BARD1, classicamente envolvidos com as vias de reparo por recombinação homóloga e não homóloga por junção de pontas. Nossos dados apontam para a interação exclusivamente da isoforma 42k de CDK9 com a região C-terminal de BRCA1. Porém ambas as isoformas de CDK9 demonstraram-se capazes de interagir com BARD1.

Foi demonstrado que CDK9 é capaz de formar focos mediante danos ao DNA, e que estes focos colocalizam com BRCA1. Adicionalmente demonstramos que células com a expressão gênica de *CDK9* silenciada apresentam redução dos níveis de recombinação homóloga, mas não de recombinação não homóloga por junção de pontas.

Por fim, a depleção de CDK9 é acompanhada por uma drástica redução do recrutamento de BRCA1 aos sítios de dano ao DNA, e de um aumento na cinética de resolução dos danos gerados por radiação ionizante. Adicionalmente, a depleção de CDK9 é acompanhada por um aumento na sensibilidade ao tratamento com radiação ionizante.

Coletivamente nossos dados apontam para um papel importante de CDK9 no reparo ao dano de DNA por recombinação homóloga, juntamente com BRCA1.

8. Bibliografia

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

BORK P, HOFMANN K, BUCHER P, NEUWALD AF, ALTSCHUL SF, KOONIN EV. **A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins.** *FASEB J.* 1997 Jan;11(1):68-76.

BOTUYAN MV, NOMINÉ Y, YU X, JURANIC N, MACURA S, CHEN J, MER G. **Structural basis of BACH1 phosphopeptide recognition by BRCA1 tandem BRCT domains.** *Structure.* 2004 Jul;12(7):1137-46.

BRADFORD MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976. 72: 248-254.

BRANZEI D, FOIANI M. **Regulation of DNA repair throughout the cell cycle.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):297-308.

BRÈS V, YOH SM, JONES KA. **The multi-tasking P-TEFb complex.** *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):334-40.

BRODIE, K., MOK, M., HENDERSON, B. **Characterization of BARD1 targeting and dynamics at the centrosome: the role of CRM1, BRCA1 and the Q564H mutation.** Cellular Signalling, 2012. 24(2), 451-459

CALLEBAUT I, MORNON JP. **From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair.** FEBS Lett. 1997 Jan 2;400(1):25-30.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. **Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas.** N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2481-98.

CARVALHO RS, FERNANDES VC, NEPOMUCENO TC, RODRIGUES DC, WOODS NT, SUAREZ-KURTZ G, CHAMMAS R, MONTEIRO AN, CARVALHO MA. **Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response.** Cancer Biol Ther. 2014 Jul;15(7):840-50.

CHEN CF, LI S, CHEN Y, CHEN PL, SHARP ZD, LEE WH. **The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor.** J Biol Chem. 1996 Dec 20;271(51):32863-8.

CHRISTOU CM, KYRIACOU K. **BRCA1 and Its Network of Interacting Partners.** Biology (Basel). 2013 Jan 2;2(1):40-63.

CLAPPERTON JA, MANKE IA, LOWERY DM, HO T, HAIRE LF, YAFFE MB, SMERDON

SJ. **Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer.** Nat Struct Mol Biol. 2004 Jun;11(6):512-8.

CLAUDIO PP, CUI J, GHAFOURI M, MARIANO C, WHITE MK, SAFAK M, SHEFFIELD JB, GIORDANO A, KHALILI K, AMINI S, SAWAYA BE. **Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII.** J Cell Physiol. 2006 Sep;208(3):602-12.

CRUZ-GARCÍA A, LÓPEZ-SAAVEDRA A, HUERTAS P. **BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection.** Cell Rep. 2014 Oct 23;9(2):451-9.

DAPIĆ V, MONTEIRO AN. **Functional implications of BRCA1 for early detection, prevention, and treatment of breast cancer.** Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2006;16(3):233-52.

DECHEND R, HIRANO F, LEHMANN K, HEISSMEYER V, ANSIEAU S, WULCZYN FG, SCHEIDEREIT C, LEUTZ A. **The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators.** Oncogene. 1999 Jun 3;18(22):3316-23.

DENG SK, GIBB B, DE ALMEIDA MJ, GREENE EC, SYMINGTON LS. **RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks.** Nat Struct Mol Biol. 2014 Apr;21(4):405-12.

DURANT ST, NICKOLOFF JA. **Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1.** Cell Cycle. 2005 Sep;4(9):1216-22.

EASTON D, FORD D, PETO J. **Inherited susceptibility to breast cancer.** Cancer Surv. 1993;18:95-113.

ELIA AE, BOARDMAN AP, WANG DC, HUTTLIN EL, EVERLEY RA, DEPHOURE N, ZHOU C, KOREN I, GYGI SP, ELLEDGE SJ. **Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response.** Mol Cell. 2015 Sep 3;59(5):867-81.

ENGEBRECHT J, HEILIG JS, BRENT R. **Preparation of bacterial plasmid DNA.** Curr Protoc Neurosci. 2001 May;Appendix 1:Appendix 1J.

Estimativa 2016 de Incidência de Câncer no Brasil – obtido através do sítio <http://www.inca.gov.br/> (Acessado em Janeiro de 2016)

FISHEL R, LESCOE MK, RAO MR, COPELAND NG, JENKINS NA, GARBER J, KANE M, KOLODNER R. **The human mutator gene homolog MSH2 and its**

association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.

FRIEDBERG, EC. **DNA damage and repair.** Nature 421(6921): 436-440.

FU TJ, PENG J, LEE G, PRICE DH, FLORES O. **Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription.** J Biol Chem. 1999 Dec 3;274(49):34527-30.

FUJINAGA K, CUJEC TP, PENG J, GARRIGA J, PRICE DH, GRAÑA X, PETERLIN BM. **The ability of positive transcription elongation factor B to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat.** J Virol. 1998 Sep;72(9):7154-9.

GARRIGA J, PENG J, PARREÑO M, PRICE DH, HENDERSON EE, GRAÑA X. **Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation.** Oncogene. 1998 Dec 17;17(24):3093-102.

GERLINGER M, ROWAN AJ, HORSWELL S, LARKIN J, ENDESFELDER D, GRONROOS E, MARTINEZ P, MATTHEWS N, STEWART A, TARPEY P, VARELA I, PHILLIMORE B, BEGUM S, MCDONALD NQ, BUTLER A, JONES D, RAINE K, LATIMER C, SANTOS CR, NOHADANI M, EKLUND AC, SPENCER-DENE B, CLARK G, PICKERING L, STAMP G, GORE M, SZALLASI Z, DOWNWARD J, FUTREAL PA, SWANTON C. **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** N Engl J Med. 2012 Mar 8;366(10):883-92.

GLOBOCAN 2012: *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* – obtido através do sítio <http://www.globocan.iarc.fr/> (Acessado em Janeiro de 2016)

GOLDBERG M, STUCKI M, FALCK J, D'AMOURS D, RAHMAN D, PAPPIN D, BARTEK J, JACKSON SP. **MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint.** Nature. 2003 Feb 27;421(6926):952-6.

GRAÑA X, DE LUCA A, SANG N, FU Y, CLAUDIO PP, ROSENBLATT J, MORGAN DO, GIORDANO A. **PITALRE, a nuclear CDC2**

related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3834-8.

GRAWUNDER U, ZIMMER D, FUGMANN S, SCHWARZ K, LIEBER MR. **DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes**. Mol Cell. 1998 Oct;2(4):477-84.

HALAZONETIS TD, GORGOULIS VG, BARTEK J. **An oncogene-induced DNA damage model for cancer development**. Science. 2008 Mar 7;319(5868):1352-5.

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation**. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

1 HANAHAN D, WEINBERG RA. **The hallmarks of cancer**. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

IRMINGER-FINGER I, JEFFORD CE. **Is there more to BARD1 than BRCA1?** Nat Rev Cancer. 2006 May;6(5):382-91.

IRMINGER-FINGER I, LEUNG WC. **BRCA1-dependent and independent functions of BARD1**. Int J Biochem Cell Biol. 2002 Jun;34(6):582-7.

JEFFORD CE, FEKI A, HARB J, KRAUSE KH, IRMINGER-FINGER I. **Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity**. Oncogene. 2004 Apr 29;23(20):3509-20.

JOO WS, JEFFREY PD, CANTOR SB, FINNIN MS, LIVINGSTON DM, PAVLETICH NP. **Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure**. Genes Dev. 2002 Mar 1;16(5):583-93.

JOWSEY PA, DOHERTY AJ, ROUSE J. **Human PTIP facilitates ATM-mediated activation of p53 and promotes cellular resistance to ionizing radiation**. J Biol Chem. 2004 Dec 31;279(53):55562-9. Epub 2004 Sep 27.

KASTAN, MB. E J. BARTEK. **Cell-cycle checkpoints and cancer**. Nature 2004 432(7015): 316-323.

KENNEDY RD, D'ANDREA AD. **DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes.** J Clin Oncol. 2006 Aug 10;24(23):3799-808.

KOONIN EV, ALTSCHUL SF, BORK P. **BRCA1 protein products ... Functional motifs...** Nat Genet. 1996 Jul;13(3):266-8.

LEACH FS, NICOLAIDES NC, PAPADOPOULOS N, LIU B, JEN J, PARSONS R, PELTOMAKI P, SISTONEN P, AALTONEN LA, NYSTROM-LAHTI M. **Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** Cell. 1993;75:1215–1225.

LIANG K, GAO X, GILMORE JM, FLORENS L, WASHBURN MP, SMITH E, SHILATIFARD A. **Characterization of human cyclin-dependent kinase 12 (CDK12) and CDK13 complexes in C-terminal domain phosphorylation, gene transcription, and RNA processing.** Mol Cell Biol. 2015 Mar;35(6):928-38.

LIM YC, ROBERTS TL, DAY BW, STRINGER BW, KOZLOV S, FAZRY S, BRUCE ZC, ENSBEY KS, WALKER DG, BOYD AW, LAVIN MF. **Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells.** Mol Oncol. 2014 Dec;8(8):1603-15.

LIN X, TAUBE R, FUJINAGA K, PETERLIN BM. **P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA.** J Biol Chem. 2002 May 10;277(19):16873-8.

LIU H, HERRMANN CH, CHIANG K, SUNG TL, MOON SH, DONEHOWER LA, RICE AP. **55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair.** Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jun 25;397(2):245-50.

LORD CJ, ASHWORTH A. **The DNA damage response and cancer therapy.** Nature. 2012 Jan 18;481(7381):287-94.

LORICK KL, JENSEN JP, FANG S, ONG AM, HATAKEYAMA S, WEISSMAN AM. **RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Sep 28;96(20):11364-9.

LOU Z, MINTER-DYKHOUSE K, FRANCO S, GOSTISSA M, RIVERA MA, CELESTE A, MANIS JP, VAN DEURSEN J, NUSSENZWEIG A, PAULL TT, ALT FW, CHEN J. **MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals.** Mol Cell. 2006 Jan 20;21(2):187-200.

LUO K, DENG M, LI Y, WU C, XU Z, YUAN J, LOU Z. **CDK-mediated RNF4 phosphorylation regulates homologous recombination in S-phase.** Nucleic Acids Res. 2015 Jun 23;43(11):5465-75.

MANKE IA, LOWERY DM, NGUYEN A, YAFFE MB. **BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting.** Science. 2003 Oct 24;302(5645):636-9.

MESQUITA RD, WOODS NT, SEABRA-JUNIOR ES, MONTEIRO AN. **Tandem BRCT Domains: DNA's Praetorian Guard.** Genes Cancer. 2010 Nov;1(11):1140-6.

MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W. **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** Science. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.

MONTEIRO AN, AUGUST A, HANAFUSA H. **Common BRCA1 variants and transcriptional activation.** Am J Hum Genet. 1997 Sep;61(3):761-2.

MORRIS JR, SOLOMON E. **BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair.** Hum Mol Genet. 2004 Apr 15;13(8):807-17. Epub 2004 Feb 19.

NEGRINI S, GORGOULIS VG, HALAZONETIS TD. **Genomic instability--an evolving hallmark of cancer.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Mar;11(3):220-8.

NISHIKAWA H, OOKA S, SATO K, ARIMA K, OKAMOTO J, KLEVIT RE, FUKUDA M, OHTA T. **Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked**

polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. J Biol Chem. 2004 Feb 6;279(6):3916-24.

O'BRIEN SK, CAO H, NATHANS R, ALI A, RANA TM. **P-TEFb kinase complex phosphorylates histone H1 to regulate expression of cellular and HIV-1 genes.** J Biol Chem. 2010 Sep 24;285(39):29713-20.

O'BRIEN SK, KNIGHT KL, RANA TM. **Phosphorylation of histone H1 by P-TEFb is a necessary step in skeletal muscle differentiation.** J Cell Physiol. 2012 Jan;227(1):383-9.

OUCHI T. **BRCA1 phosphorylation: biological consequences.** Cancer Biol Ther. 2006 May;5(5):470-5.

PANIER S, BOULTON SJ. **Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jan;15(1):7-18.

PARSONS DW, JONES S, ZHANG X, LIN JC, LEARY RJ, ANGENENDT P, MANKOO P, CARTER H, SIU IM, GALLIA GL, OLIVI A, MCLENDON R, RASHEED BA, KEIR S, NIKOLSKAYA T, NIKOLSKY Y, BUSAM DA, TEKLEAB H, DIAZ LA JR, HARTIGAN J, SMITH DR, STRAUSBERG RL, MARIE SK, SHINJO SM, YAN H, RIGGINS GJ, BIGNER DD, KARCHIN R, PAPADOPOULOS N, PARMIGIANI G, VOGELSTEIN B, VELCULESCU VE, KINZLER KW. **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.** Science. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

PAULL TT, ROGAKOU EP, YAMAZAKI V, KIRCHGESSNER CU, GELLERT M, BONNER WM. **A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.** Curr Biol. 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):886-95.

PENG J, MARSHALL NF, PRICE DH. **Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb.** J Biol Chem. 1998 May 29;273(22):13855-60.

PENG J, ZHU Y, MILTON JT, PRICE DH. **Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb.** Genes Dev. 1998 Mar 1;12(5):755-62.

PING YH, RANA TM. **DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation.** J Biol Chem. 2001 Apr 20;276(16):12951-8.

PODHORECKA M, SKLADANOWSKI A, BOZKO P. **H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy.** J Nucleic Acids. 2010 Aug 3;2010. pii: 920161.

RAPPOLD I, IWABUCHI K, DATE T, CHEN J. **Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways.** J Cell Biol. 2001 Apr 30;153(3):613-20.

RIPPERGER T, GADZICKI D, MEINDL A, SCHLEGELBERGER B. **Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling.** Eur J Hum Genet. 2009 Jun;17(6):722-31.

RODRIGUEZ M, YU X, CHEN J, SONGYANG Z. **Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains.** J Biol Chem. 2003 Dec 26;278(52):52914-8.

ROGAKOU EP, PILCH DR, ORR AH, IVANOVA VS, BONNER WM. **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.** J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5858-68.

ROMANO G, GIORDANO A. **Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases.** Cell Cycle. 2008 Dec;7(23):3664-8.

RUFFNER H, JOAZEIRO CA, HEMMATI D, HUNTER T, VERMA IM. **Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):5134-9.

RUFFNER H, JOAZEIRO CA, HEMMATI D, HUNTER T, VERMA IM. **Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):5134-9.

SAURIN AJ, BORDEN KL, BODDY MN, FREEMONT PS. **Does this have a familiar RING?** Trends Biochem Sci. 1996 Jun;21(6):208-14.

SAVAGE KI, HARKIN DP. **BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability.** FEBS J. 2015 Feb;282(4):630-46.

SELUANOV A, MAO Z, GORBUNOVA V. **Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells.** J Vis Exp. 2010 Sep 8;(43). pii: 2002.

SHIBATA A, CONRAD S, BIRRAUX J, GEUTING V, BARTON O, ISMAIL A, KAKAROUGKAS A, MEEK K, TAUCHER-SCHOLZ G, LÖBRICH M, JEGGO PA. **Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase.** EMBO J. 2011 Mar 16;30(6):1079-92.

SHIOZAKI EN, GU L, YAN N, SHI Y. **Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling.** Mol Cell. 2004 May 7;14(3):405-12.

SHORE SM, BYERS SA, DENT P, PRICE DH. **Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms.** Gene. 2005 Apr 25;350(1):51-8.

SHORE SM, BYERS SA, MAURY W, PRICE DH. **Identification of a novel isoform of Cdk9.** Gene. 2003 Mar 27;307:175-82.

SZABO CI, WORLEY T, MONTEIRO AN. **Understanding germ-line mutations in BRCA1.** Cancer Biol Ther. 2004 Jun;3(6):515-20.

TEMBE V, HENDERSON BR. **BARD1 translocation to mitochondria correlates with Bax oligomerization, loss of mitochondrial membrane potential, and apoptosis.** J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20513-22.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS - obtido através do sítio
<http://www.proteinatlas.org/> (Acessado em Janeiro de 2016)

THOMPSON LH. **Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography.** *Mutat Res.* 2012 Oct-Dec;751(2):158-246.

TRUONG LN, LI Y, SHI LZ, HWANG PY, HE J, WANG H, RAZAVIAN N, BERNS MW, WU X. **Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 7;110(19):7720-5.

WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, NEFF N, ELLEDGE SJ, QIN J. **BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures.** *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):927-39.

WANG H, SHI LZ, WONG CC, HAN X, HWANG PY, TRUONG LN, ZHU Q, SHAO Z, CHEN DJ, BERNS MW, YATES JR 3RD, CHEN L, WU X. **The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair.** *PLoS Genet.* 2013;9(2):e1003277.

WESTERMARK UK, REYNGOLD M, OLSHEN AB, BAER R, JASIN M, MOYNAHAN ME. **BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks.** *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7926-36.

WILLIAMS RS, LEE MS, HAU DD, GLOVER JNM. **Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11 (2004), pp. 519–525

WIRTH R, FRIESENEGGER A, FIEDLER S. **Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation.** *Mol Gen Genet.* 1989 Mar;216(1):175-7.

WOODS NT, MESQUITA RD, SWEET M, CARVALHO MA, LI X, LIU Y, NGUYEN H, THOMAS CE, IVERSEN ES JR, MARSILLAC S, KARCHIN R, KOOMEN

J, MONTEIRO AN. **Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions.** Sci Signal. 2012 Sep 18;5(242):rs6.

WU LC, WANG ZW, TSAN JT, SPILLMAN MA, PHUNG A, XU XL, YANG MC, HWANG LY, BOWCOCK AM, BAER R. **Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product.** Nat Genet. 1996 Dec;14(4):430-40.

WU-BAER F, LAGRAZON K, YUAN W, BAER R. **The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin.** J Biol Chem. 2003 Sep 12;278(37):34743-6.

YU DS, ZHAO R, HSU EL, CAYER J, YE F, GUO Y, SHYR Y, CORTEZ D. **Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response.** EMBO Rep. 2010 Nov;11(11):876-82.

YU X, CHINI CC, HE M, MER G, CHEN J. **The BRCT domain is a phospho-protein binding domain.** Science. 2003 Oct 24;302(5645):639-42.

ZHANG H, PARK SH, PANTAZIDES BG, KARPIUK O, WARREN MD, HARDY CW, DUONG DM, PARK SJ, KIM HS, VASSILOPOULOS A, SEYFRIED NT, JOHNSEN SA, GIUS D, YU DS. **SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 13;110(33):13546-51. doi: 10.1073/pnas.1301463110. Epub 2013 Jul 29.

ZHOU Q, YIK JH. **The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation.** Microbiol Mol Biol Rev. 2006 Sep;70(3):646-59.