

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR -  
PPGBCM

**O silenciamento da quinase humana Nek1 altera  
a resposta a danos ao DNA induzidos por agente  
indutor de *crosslinks***

**Tese de Doutorado**

**Alessandra Luíza Pelegrini**

**Orientador: Guido Lenz**

**Porto Alegre, 2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR -  
PPGBCM

**O silenciamento da quinase humana Nek1 altera  
a resposta a danos ao DNA induzidos por agente  
indutor de *crosslinks***

**Alessandra Luíza Pelegrini**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientador: Guido Lenz**

**Porto Alegre, 2012**

Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular e do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte do trabalho também foi realizada no Laboratório de Reparo de DNA na Universidade Estadual de São Paulo, sob a supervisão do professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck. Parte dos experimentos de espectrometria de massas foram desenvolvidos nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, SP.

O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“Se nós não somos o nosso ideal, por que julgamos os outros tão impiedosamente?”*

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador, o professor Dr. Guido Lenz por todos esses anos que trabalhamos juntos, por sua orientação e amizade. Agradeço por ter confiado em mim e ter me permitido crescer e evoluir, profissionalmente e como pessoa.

Ao Professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck por ter me recebido tão bem em seu laboratório e ter me orientado no último ano. Obrigada pela confiança, pelo incentivo e pelas conversas inspiradoras.

À professora Dra. Jenifer Saffi e ao professor Dr. João Antonio Pêgas Henriques pelas discussões muito produtivas, pelo apoio na realização desse trabalho e por disponibilizar a infraestrutura necessária ao desenvolvimento do mesmo. Agradeço ainda à Jenifer pela cuidadosa revisão dessa tese, obrigada por todas as sugestões.

Aos professores membros da comissão de acompanhamento Dra. Célia Carlini e Fabiana Horn, pela atenção e colaboração. Agradeço ainda a Professora Célia por ter confiado em mim durante a implantação e o desenvolvimento do projeto “Curso de Férias” no PPGBCM, foi de extrema importância para minha formação como pesquisadora, cientista e pessoa, obrigada.

Agradeço à banca, pela disponibilidade e paciência.

À Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo pelos incontáveis auxílios ao longo desses anos e por toda a simpatia e carinho.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa FAPERGS, FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos meus colegas dos diferentes laboratórios que trabalhei ao longo do projeto e a todos que participaram direta ou indiretamente. À Dra. Dinara Jaqueline Moura, pelo auxílio na realização desse trabalho, pelas conversas e discussões, pelo apoio e amizade e, não menos importante, pelo nosso futebol. Às minhas alunas de iniciação científica que em algum momento se envolveram no projeto Bethânia Luise Brenner, Fernanda Peruzatto, Natana Binotto e Gabriela Pôrto, obrigada por me ajudarem a desenvolver meu lado didático e também meu lado “mandona” e “ditadora”. Agradeço também a todos que participaram comigo do projeto

“Curso de Férias” e puderam contribuir ainda mais com a minha formação didática e no trabalho em equipe.

Aos colegas do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, agradeço em especial às colegas de pós que passaram por esse momento lindo e enlouquecedor: Dra. Alessandra Tamajusuko e Dra. Lauren Zamin, que me ensinaram muitas coisas, entre essas, a ter paciência, lidar com as pessoas e claro, fazer ciência; à Dra. Patrícia Lopes, obrigada pela troca de experiências e desabafos, pela ajuda nos experimentos e pela amizade, obrigada principalmente por ter segurado a minha barra nos momentos mais difíceis. Obrigada também aos colegas e amigos José e Eduardo, que à distância escutaram meus desabafos e nunca desistiram de mim. Obrigada aos amigos e colegas Andrew, Emilly, Fran e Pítia, pela amizade e carinho; e aos outros colegas de laboratório pelo companheirismo e por fazerem do nosso laboratório um ambiente agradável para se trabalhar. E claro, obrigada a nossa técnica e querida mascote, Priscilene.

Aos colegas (e agora amigos) da USP, agradeço a todos por me receberem tão bem em seu laboratório e me fazerem sentir parte do grupo tão rápido. Primeiramente quero agradecer a Ligia por ter dividido a bancada comigo, ter procurado um lugar para eu ficar e estar sempre disposta para qualquer coisa. Agradeço a Letícia, a Ju e a Annabel por terem se esforçado para me integrar ao grupo. Agradeço aos meninos, ao Leonardo, ao Alexandre, ao Francisco, ao Tiago, ao André e ao Teiti, sempre muito prestativos e atenciosos. Agradeço também a Veridiana, a Débora e a Clarissa por todo o auxílio nos experimentos e pela amizade. Agradeço à Camila, Carolina e a Luciana por todas as conversas e pelo carinho. Aos meus vizinhos de bancada, Marinas, Rosa e Janu, por todas as conversas e pelo carinho. Obrigado também aos demais colegas pela convivência agradável.

Aos colegas do PPGBCM, principalmente as irmãs que a vida me deu, Nicolle e Juliana, por toda a nossa amizade e consultas científicas, com certeza levarei essa amizade para o resto da minha vida junto com uma eterna saudade dos momentos que vivemos juntas, nossas idas ao bar do Ildo para desabafos, os muitos almoços que dividimos, as muitas lágrimas e risadas que compartilhamos.

Obrigada as minhas colegas de apê, Mariana e Maju, por tornarem a vida em SP mais fácil e alegre e entenderem meus horários e hábitos estranhos.

Agradeço ainda aos meus amigos de fora do mundo acadêmico (ou não tão fora assim) que me acompanharam por todos esses anos, me apoiando e me incentivando e, principalmente, por entenderem a minha ausência em alguns momentos e aceitarem que eu sou assim mesmo. Às eternas desfrutáveis, Clarissa, Mariana e Marília, que sempre foram um grupo de terapia coletiva ao longo desses muitos anos de formação acadêmica. Aos meus amigos que insistentemente perguntavam sobre a tese (assunto tabu) e nunca me abandonaram, mesmo com a distância; Alessandra, Rachel, Rici (Uranha), Carla, Matias Alemão, Wagner, Rafael, Carol e tantos outros, vocês sabem quem são. Família nem sempre é aquela que nasce com a gente e tem o mesmo sangue, amigos não precisam se falar todo dia para manter uma amizade verdadeira. Sou eternamente grata por todos que cruzaram meu caminho e fizeram meus dias mais felizes.

Agradeço ao Guilherme, por sempre ter acreditado em mim, por ter feito tudo para me ajudar a finalizar essa tese, levando anticorpos, células e reagentes de um estado para outro, ficando horas me esperando no laboratório e por ter aguentando minhas oscilações de humor, minha ausência e a distância, entre outras tantas coisas. À Chorris, que não é uma pessoa, mas está sempre do meu lado e isso basta. Ao meu irmão pelo apoio e compreensão durante a realização desse trabalho e em todos os momentos difíceis que passamos, e, claro, por cuidar da Chorris quando eu mais precisei. E por fim agradeço aos meus pais, que infelizmente não mais poderão presenciar as diferentes fases da minha vida e minhas conquistas, mas graças aos valores que me passaram, eu segui esse caminho e me tornei quem eu sou.

# ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	<b>11</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>14</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>17</b>
<b>Resumo</b>	<b>18</b>
<b>Abstract</b>	<b>19</b>
<b>I. Introdução</b>	<b>20</b>
1. A família das Neks	20
1.1 A proteína NIMA	21
1.2 As proteínas relacionadas à NIMA em mamíferos	23
2. A Nek1	26
2.1 A Nek1 e a Ciliogênese	32
2.2 Doenças relacionadas à ciliogêneses	34
2.2.1 A Doença Policística do Rim (PKD)	35
2.2.2 Síndrome de costelas curtas e polidactilia tipo Majewski (SCCPM)	38
2.3 O papel da Nek1 na gametogênese	39
2.4 O envolvimento da Nek1 em resposta a danos do DNA	41
2.5 A Nek1 e a morte celular	43
3. O Ciclo Celular	45
3.1 A regulação do ciclo celular	48
3.2 Pontos de checagem do ciclo celular ( <i>cell cycle checkpoints</i> )	50
3.3 O ciclo celular e as Neks	53
4. O estresse genotóxico e a indução de danos ao DNA	54
4.1 Danos ao DNA	56
4.2 Processos de Reparação do DNA	60
<b>II. Objetivos</b>	<b>72</b>
1. Objetivo Geral	72



1.2 Objetivos específicos	72
<b>III. Materiais e Métodos</b>	<b>73</b>
1. Cultivo Celular	73
2. Obtenção das linhagens silenciadas	73
3. Agentes genotóxicos	73
4. Contagem de células	74
5. Tratamentos	74
6. Preparo das células e Eletroforese	75
7. Ensaio de Imunodeteção	75
8. RT-PCR	76
9. Ensaio Cometa alcalino e neutro	76
10. Citometria de Fluxo	78
11. <i>Host Cell Reactivation</i> (HCR)	78
12. Análise Estatística	78
13. Imunoprecipitação	78
14. Espectrometria de Massas	79
<b>IV. Resultados</b>	<b>80</b>
1. Obtenção de linhagens silenciadas para Nek1	80
2. O silenciamento da Nek1 altera a capacidade de reparo do DNA	81
3. A Nek1 está envolvida diretamente no reparo de lesões induzidas por cisplatina, mas não por ACNU	87
4. O silenciamento da Nek1 altera a parada no ciclo celular induzida por danos ao DNA	89
5. O silenciamento da Nek1 altera a sinalização de danos ao DNA induzidos por cisplatina	92
5.1 A fosforilação rápida de H2AX é alterada na ausência da Nek1 em resposta à cisplatina	93
5.2 Nek1 é importante para a ativação de Chk2 e Chk1 em resposta à cisplatina	94

5.3 O silenciamento da Nek1 afeta a sinalização de danos induzidos por cisplatina via Fanconi/BRCA1	96
6. Estudo de interação proteica da Nek1	98
<b>V. Discussão</b>	<b>101</b>
<b>VI. Conclusões</b>	<b>119</b>
<b>VII. Perspectivas</b>	<b>120</b>
<b>VIII. Referências</b>	<b>121</b>
<b>IX. Anexos:</b>	<b>132</b>
Anexo I: Artigo publicado durante o período do doutorado referente a Tese: <i>“Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest.”</i>	
Anexo II: Artigos publicados durante o período do doutorado referentes a outros trabalhos: <i>“Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines”</i> e <i>“Sensitization of glioma cells by x-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown”</i>	
<b>X. Currículo</b>	<b>144</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACNU	Nimustina
ADPKD	Doença policística do rim autossômica dominante
AP	Sítiosapurínicos ou apirimidínicos
APC	Complexo promotor de anáfase ( <i>anaphase promoting complex</i> )
ARPKD	Doença policística do rim autossômica recessiva
A, T, C, G	Adenina, Timina, Citosina, Guanina
ATM	Proteína mutada em ataxia telangiectasia ( <i>ataxia-telangiectasia mutated protein</i> )
ATP	Adenosina tri-fosfato
ATR	Proteína relacionada a ataxia telangiectasia e a rad3 ( <i>ataxia telangiectasia and Rad3 related protein</i> )
ATRX	Proteína relacionada à síndrome alfa talassemia e retardo mental ligada a X ( <i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein</i> )
BER	Reparo por excisão de bases ( <i>base excision repair</i> )
BRCA1/2	proteína relacionada ao câncer de mama 1/2 ( <i>breast cancer related protein 1/2</i> )
CC	Regiões super-hélice ( <i>coiled-coiled regions</i> )
cDNA	DNA complementar
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas ( <i>Cyclin-Dependent Kinases</i> )
CKIs	Inibidores de CDKs ( <i>CDKs Inhibitors</i> )
C-Nap1	Proteína centrosomal 1 associada a Nek2
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
CPT	Cisplatina
DDR	Resposta a danos de DNA ( <i>DNA Damage Response</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSBs	Quebras de dupla fita de DNA ( <i>Double-strand breaks</i> )
DTT	Ditiotreitól

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACT	Complexo facilitador da transcrição da cromatina
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GFP	Proteína fluorescente verde
GGR	Reparo genômico global ( <i>Global Genomic Repair</i> )
GTP	Guanosina trifosfato
HCR	Ensaio de reativação na célula hospedeira ( <i>Host Cell Reactivation</i> )
Hek293t	Linhagem de células humanas embrionárias de rim
HK2	Linhagem de células humanas de túbulo renal humano
ICLs	Ligação cruzada intercadeia ( <i>DNA interstrand crosslink</i> )
Luc	Luciferase
MGMT	Metilguanina metiltransferase
MMR	Reparo do emparelhamento errôneo de bases ( <i>mismatch repair</i> )
MMS	Metil-Metanosulfonato
MPF	Fator promotor da mitose
Nrks	Proteínas relacionadas a NIMA ( <i>Nima related kinases</i> )
NES	Sequência de exportação nuclear ( <i>Nuclear exportation signal</i> )
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos ( <i>Nucleotide excision repair</i> ),
NHEJ	Recombinação não homologa ( <i>Non-homologous end joining</i> )
NLS	Sequência de localização nuclear ( <i>Nuclear localization signal</i> )
ORCs	Origens de replicação do DNA
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de dados de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas,
PEST	Domínio rico nos aminoácidos prolina, glutamato, serina e treonina
PKD	Doença policística do rim ( <i>Polycystic Kidney Disease</i> )

RCC1	Região regulatória de condensação da cromatina ( <i>regulator of chromosome condensation</i> )
RH	Recombinação Homóloga
RI	Radiação ionizante
RL	Renila
RNA	Ácido ribonucléico
SCCPM	Síndrome de Costela Curta e Polidactilia do tipo Majewski
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
Ser	Serina
SGC	<i>Structural Genomics Consortium</i>
shRNA	RNA de interferência de alça curta ( <i>short hairpin</i> )
SSB	Quebra de simples fita ( <i>single strand breaks</i> )
TCR	Reparo acoplado a transcrição ( <i>Transcription Coupled Repair</i> )
TGF $\beta$	Fator de transformação do crescimento
TLS	Síntese translesão
U87	Linhagem celular humana de glioma
UV	Radiação ultravioleta
VDAC1	Canal de anions dependente de voltagem
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
XP	Xeroderma Pigmentoso

## Lista de Figuras

### I. Introdução

Figura 1: Alinhamento das sequências de membros da família Nek/NRK de diferentes organismos.

Figura 2: Esquema demonstrativo do alinhamento de importantes características estruturais da família Nek em mamíferos e da quinase NIMA do fungo *A. nidulans*.

Figura 3: Comparação esquemática da estrutura da NIMA com a Nek1 de camundongo.

Figura 4: Comparação da estrutura cristalográfica da região catalítica da Nek1 com as Neks humanas 2 e 7.

Figure 5: Comparação da estrutura do domínio quinásico da Nek1 com a Nek2.

Figura 6: Diagrama ilustrando uma possível correlação entre as funções atribuídas a quinase humana Nek1 e no surgimento de patologias

Figura 7: Representação gráfica da estrutura básica de cílios e flagelos.

Figura 8: Representação comparativa entre um rim humano saudável e um rim policístico.

Figura 9: Radiografia de pacientes investigados para Síndrome de costela curta e polidactilia Tipo Majewski.

Figura 10: Ilustração esquematizada sobre o papel proposto para a Nek1 na regulação da morte celular mediada pela permeabilidade mitocondrial através da fosforilação de VDAC1.

Figura 11: Esquema ilustrativo demonstrando as fases do ciclo celular e os estados inativos de progressão incluindo senescência.

Figura 12: Representação esquemática de vias de ativação das etapas de controle/pontos de checagem do ciclo em resposta a danos ao DNA.

Figura 13: Representação esquemática da via de resposta a danos ao DNA.

Figura 14: Representação esquemática dos mecanismos de reparo existentes em relação as lesões causadas ao DNA e os principais agentes indutores.

Figura 15: Representação esquemática das vias de reparo por excisão.

Figura 16: Representação esquemática das vias de reparo de DSBs por recombinação homóloga e não homóloga em eucariotos superiores.

Figura 17: Modelo de reparo de ICLs envolvendo as vias de reparo NER, HR, TLS e ativação da via de Fanconi.

### III. Materiais e Métodos

Figura 18: Classificação visual de danos utilizada na análise do ensaio cometa

### IV. Resultados

Figura 19: Confirmação do silenciamento por shRNA da quinase humana Nek1 através da técnica de *western blot* com anticorpo específico anti-Nek1.

Figura 20: Quantificação gráfica do ensaio cometa alcalino realizado em células U87 expostas a diferentes doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MMS.

Figura 21: O silenciamento da Nek1 induz alterações nos índices de dano ao DNA de células tratadas com cisplatina.

Figura 22: O silenciamento da Nek1 altera o reparo de lesões induzidas por cisplatina em células Hek293t.

Figura 23: O silenciamento da Nek1 altera o reparo de lesões causadas por cisplatina em Hek293t.

Figura 24: A ausência da Nek1 altera a migração do DNA lesado por MMS e cisplatina no ensaio cometa.

Figura 25: Quantificação do ensaio HCR demonstrando o envolvimento direto da Nek1 no reparo de lesões provocadas por Cisplatina.

Figura 26: Quantificação do ensaio HCR de lesões provocadas por ACNU.

Figura 27: Efeito do silenciamento da Nek1 na progressão do ciclo celular de células Hek293t tratadas com agentes indutores de dano ao DNA.

Figura 28: Nek1 é importante para a rápida fosforilação de H2AX após indução de dano ao DNA por cisplatina.

Figura 29: A Nek1 é importante para a ativação de Chk1 em resposta a cisplatina.

Figura 30: O silenciamento da Nek1 é altera a ativação de Chk2 em resposta a cisplatina.

Figura 31: A Nek1 é importante para a rápida ativação de BRCA1 após a exposição a cisplatina.

Figura 32: Perfil de ubiquitinação de FANCD2 de linhagens KD e WT expostas a cisplatina.



## **Lista de tabelas**

### **I. Introdução**

Tabela 1: Tabela de comparação funcional das Neks de mamíferos.

Tabela 2: Descrição dos agentes indutores de danos ao DNA utilizados neste trabalho.

### **III. Materiais e Métodos:**

Tabela 3: Tratamentos indutores de danos ao DNA utilizados para os diferentes ensaios com as linhagens silenciadas para Nek1 e selvagem.

### **IV Resultados**

Tabela 4: Identificação de possíveis proteínas que interagem com a Nek1

### **V. Discussão**

Tabela 5: Mutações de Nek1 encontradas em amostra tumores de diferentes tecidos de humanos.

## RESUMO

Nek1 é uma serina/treonina quinase humana envolvida na ciliogênese, na resposta a danos ao DNA e na regulação do ciclo celular. Devido ao possível envolvimento dessa proteína em patologias como a Doença Policística do Rim (PKD), a Síndrome de Costelas Curtas e Polidáctilia tipo Majewski e no desenvolvimento de tumores, muitos estudos tem sido feitos buscando entender a via de atuação dessa quinase nas células. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da Nek1 em resposta a danos ao DNA, principalmente gerados por agentes indutores de *Crosslinks (ICLs)*, como cisplatina, buscando localizar a Nek1 nas vias de sinalização conhecidas e identificar proteínas que interagem com essa quinase. Para isto, foi utilizado um modelo de silenciamento estável de Nek1 por shRNAi na linhagem celular humana Hek293t. Essas células, quando comparadas à linhagem selvagem expressando a proteína, apresentaram um reparo deficiente de lesões induzidas por cisplatina e ausência de quebras de dupla fita através do ensaio cometa, confirmado pelos baixos níveis de fosforilação da histona H2AX. Entretanto, análises com outro agente indutor de ICLs, Nimustina (ACNU), demonstrou que a Nek1 parece atuar nos mecanismos envolvidos no reparo de lesões induzidas por cisplatina. Isso sugere que essa proteína possa estar agindo no reconhecimento da lesão do DNA e até mesmo regulando vias checagem de ciclo celular, uma vez que a linhagem silenciada apresentou modificações no ciclo celular e na sinalização de Chk1 e Chk2, após a exposição com cisplatina. Além disso, essas células também apresentaram alterações na sinalização das proteínas envolvidas no reparo de ICLs, BRCA1 e FANCD2. O estudo de interação proteica por espectrometria de massas destacou algumas proteínas de reparo, como proteínas da via de Fanconi, e principalmente moléculas relacionadas com o processo de ubiquitinação, sugerindo que este pode ser o mecanismo pelo qual essa molécula está atuando e integrando diferentes sistemas. Esse conjunto de dados indica o papel da Nek1 como uma proteína sensora de danos que atua no início das vias de reparo, regulando diferentes moléculas e interagindo em distintos processos celulares como controle do ciclo celular, reparo e morte.

## ABSTRACT

Nek1 is a human serine/threonine protein kinase involved in ciliogenesis, DNA damage response and cell cycle regulation. Because of its possible involvement in human diseases such as Polycystic Kidney Disease (PKD), Short-Rib Polydactyly Syndrome Type Majewski and development of tumors, many studies have been done to understand how this kinase acts in cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate a role for Nek1 in response to DNA damage, mainly generated by agents that induce crosslinks (ICLs), such as cisplatin, identifying pathways in which participate and how proteins interact with this kinase. To accomplish that, a stable silencing of Nek1 by shRNAi in human cell line Hek293t was employed. These cells, when compared to the wild type, showed a deficient repair of lesions induced by cisplatin and absence of double strand breaks, when analysed by comet assay and, confirmed by low levels of histone H2AX phosphorylation. However, analysis with another inducing ICLs agent, Nimustine (ACNU) demonstrated that Nek1 seems to act on mechanisms involved in repair of lesions induced by cisplatin. It suggesting that this protein might be acting on the recognition of DNA damage and even regulating checkpoint pathways, since the silenced strain showed changes in cell cycle and in signaling of Chk1 and Chk2 after exposure to cisplatin. Moreover, these cells also showed changes in signaling of proteins involved in the repair of ICLs FANCD2 and BRCA1. The study of protein interaction by mass spectrometry highlighted some repair proteins, like Fanconi pathway proteins, and protein involved in the ubiquitin-related process, suggesting a possible mechanism of action and integration with different systems. This dataset indicates the role of Nek1 as a DNA damage sensor protein that acts at the beginning of the repair pathways regulating and interacting with distinct molecules in different cellular processes such as cell cycle control, repair and death.

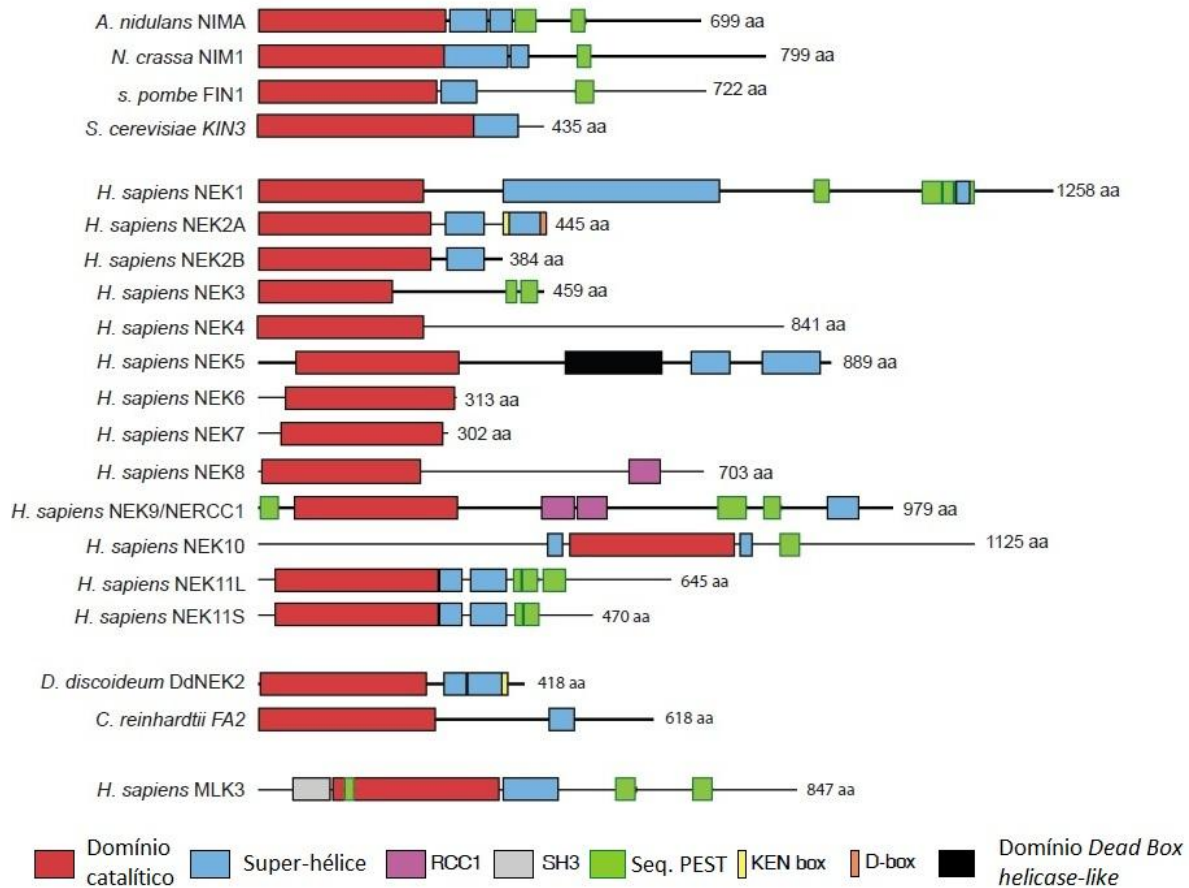
# INTRODUÇÃO

## 1. A família das Neks

As Neks ou Nrks (*Nima related Kinases*) são uma família de serina/treonina e tirosina quinases de mamíferos relacionadas estrutural e bioquimicamente à proteína NIMA (*Never in Mitosis A*), um importante regulador do ciclo celular presente no fungo *Aspergillus nidulans*, codificada pelo gene *nimA* e primeiro membro descrito dessa família (Osmani *et al.* 1987).

As proteínas quinases são classificadas como sendo relacionadas à NIMA com base na similaridade de sequência do domínio catalítico. Várias destas proteínas apresentam arranjos de motivos C-terminais semelhantes à NIMA e assim aumenta a confiabilidade na homologia dessas proteínas. Outras exibem motivos adicionais ou a falta de sequências na região não catalítica. Nestes casos, é possível que esses domínios tenham sido adquiridos ou perdidos durante o processo evolutivo e estejam associados a funções adicionais dessas proteínas que, possivelmente, não estão relacionados ao controle da mitose exatamente como ocorre na proteína do fungo. Geralmente, as proteínas homólogas à NIMA apresentam em torno de 40% de identidade entre as extremidades N-terminal, correspondente ao domínio catalítico, e a extremidade C-terminal apresenta maior variabilidade, sendo responsável pela regulação da atividade quinásica e também pela especificidade ao substrato e/ou interação com outras proteínas (Figura 1) (O'Connell *et al.* 2003; Moniz *et al.* 2011).

Atualmente, o interesse nesta família está aumentando devido à descoberta de sua atuação na regulação do ciclo celular, juntamente com as quinases Aurora e Polo (O'Connell *et al.* 2003). Cada vez mais funções estão sendo atribuídas a essas proteínas, inclusive associando a importância das Neks para a manutenção da integridade genômica e ao surgimento de tumores e, especula-se o potencial terapêutico dessas quinases.



**Figura 1: Alinhamento das sequências de membros da família Nek/NRK de diferentes organismos.** No esquema estão demonstradas as principais características estruturais apresentadas pelas proteínas da família de quinases relacionadas à NIMA, destacando-se o domínio catalítico conservado como principal atributo. Figura modificada de O'Connell e colaboradores, 2003 (O'Connell *et al.* 2003).

## 1.1 A proteína NIMA

Através do estudo de diferentes mutantes sensíveis a temperatura do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, identificou-se um grupo de indivíduos incapazes de entrar em mitose, permanecendo constantemente na interfase. A análise genômica desses mutantes revelou alterações em genes que codificavam reguladores do ciclo celular já conhecidos, como ciclina B, fosfatase Cdc25 e DNA-polimerase. Nesse grupo

também estavam incluídos quatro alelos do gene *nimA*, que codifica a proteína quinase NIMA (Osmani *et al.* 1987).

A NIMA é uma proteína de 79 kDa que apresenta um domínio quinásico N-terminal com a propriedade de reconhecer preferencialmente um resíduo hidrofóbico N-terminal no substrato, com alta seletividade para uma fenilalanina na posição 3 em relação ao sítio de fosforilação (Songyang *et al.* 1996). Na sua região não catalítica C-terminal próxima ao domínio quinásico, encontra-se um domínio super-hélice (*coiled-coil*), importante para a formação de oligômeros, e duas sequências PEST (domínio rico nos aminoácidos prolina, glutamato, serina e treonina) que atuam na degradação dependente de ubiquitinação. Esses motivos são cruciais para a funcionalidade dessa proteína e sua regulação (Lu *et al.* 1994).

A atuação da NIMA na divisão celular pode ser evidenciada por estudos com mutantes que possuem como principal característica a permanência ao final de G2, exibindo microtúbulos interfásicos e cromossomos não condensados, enquanto que a superexpressão dessa proteína ocasiona a mitose prematura a partir de qualquer ponto do ciclo celular (Osmani *et al.* 1988a; Osmani *et al.* 1988b). A NIMA é necessária para o transporte de Cdc2 ativo para dentro do núcleo, permitindo assim a iniciação da mitose (Wu *et al.* 1998). Além disso, essa quinase promove a condensação cromossômica através da fosforilação de histona H3 e regula a fissão da membrana nuclear durante a saída da mitose (Davies *et al.* 2004).

O papel essencial de NIMA para progressão do ciclo celular em *A.nidulans* e o fato de que grande parte dos genes envolvidos na regulação do ciclo são conservados em eucariotos superiores, levantou expectativas em torno da existência de homólogos dessa quinase em outros organismos. Com efeito, proteínas relacionadas foram identificadas em diferentes grupos de eucariotos superiores, com uma expansão significativa dessa família através da evolução. Embora um único homólogo de NIMA tenha sido identificado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em outros organismos esses representantes são mais numerosos, sendo 2 em *Drosophila melanogaster*, 4 em *Caenorhabditis elegans* e 11 em mamíferos, podendo chegar a mais de 70 proteínas homólogas em organismos ciliados/flagelados como as *Giardias* (Parker *et al.* 2007; Moniz *et al.* 2011). Essa correlação entre o número de Neks e a presença de

células ciliadas, sugerem um papel evolutivo dessa família quanto a presença dessas estruturas, indicando sua participação na coordenação da divisão celular de células ciliadas, auxiliando na montagem e desmontagem dessas estruturas (Quarmby & Parker 2005).

## 1.2 As proteínas relacionadas à NIMA em mamíferos

A primeira proteína quinase relacionada à NIMA em mamíferos foi identificada em 1991. A partir de uma biblioteca de cDNA de células sanguíneas de camundongo encontrou-se uma sequência codificadora homologa à NIMA (Ben-David *et al.* 1991). Em 1992, Letwin e colaboradores descreveram a primeira proteína quinase relacionada à NIMA em humanos, a Nek1. Parte de sua sequência foi clonada e atualmente se conhece toda a sua sequência, inclusive inferindo papel funcional para diferentes domínios (Letwin *et al.* 1992; Feige *et al.* 2006). Posteriormente, mais homólogos foram encontrados e atualmente, existem 11 membros descritos em humanos, mas nem todos possuem sua função caracterizada (Tabela 1).

Apesar da baixa homologia de sequência, em geral, as características organizacionais de NIMA são amplamente conservada entre as Nek de mamíferos. Todas essas quinases, exceto a Nek10, possuem domínios catalíticos na região N-terminal, enquanto que as Nek4, 6 e 7 são os únicos membros da família que não contêm domínios super-hélice. Além disso, 6 de 11 Nek de mamíferos apresentam possíveis sequências PEST (Figura 2).

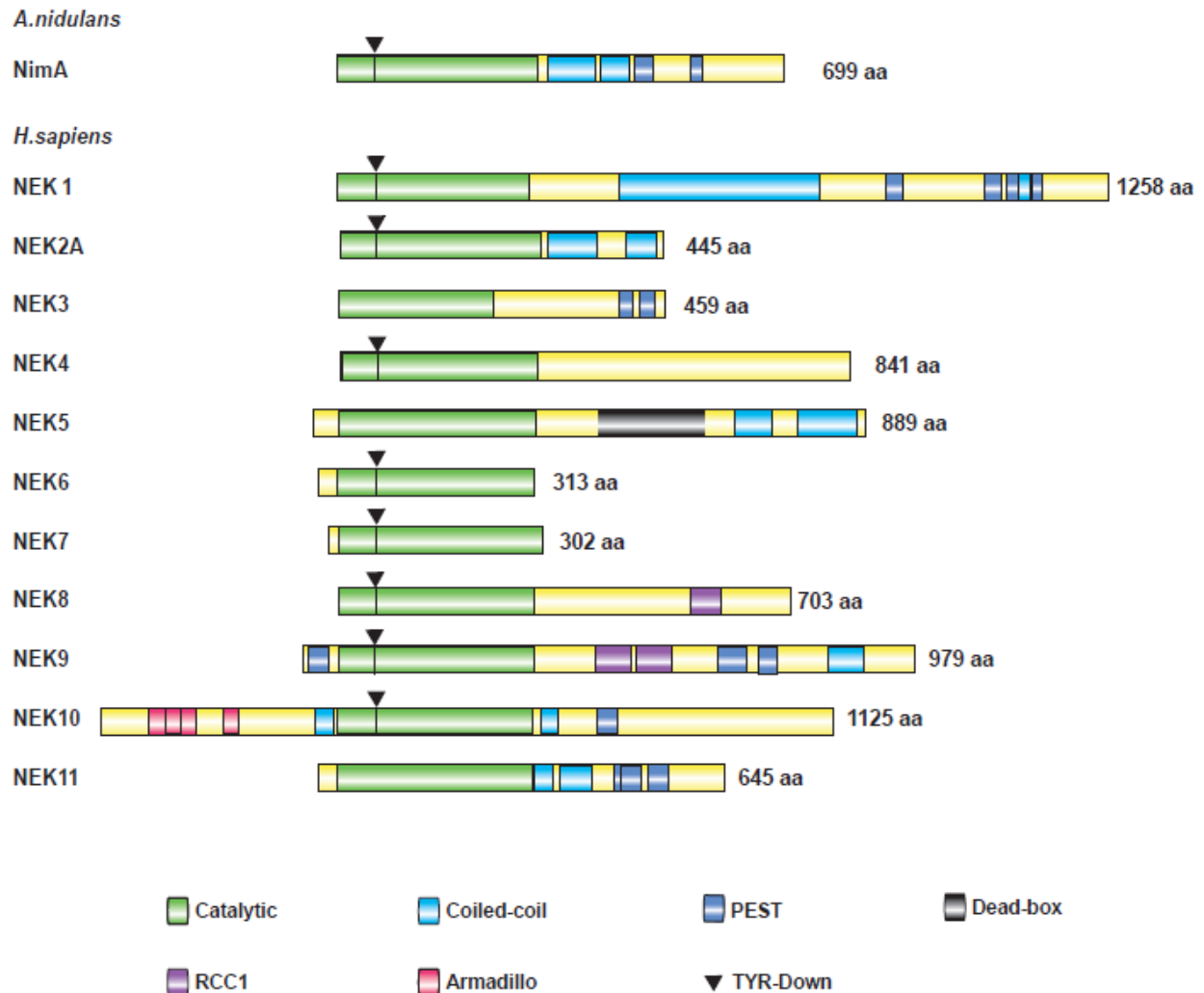
Algumas quinases Nek possuem domínios proteicos diferenciais, que apontam para a aquisição de novas funções em relação ao ancestral NIMA. A Nek8 e Nek9 diferem das demais por apresentarem sequências regulatórias da condensação de cromossomos RCC1 (*regulator of chromosome condensation*). Na Nek9, essa sequência é responsável por regular negativamente a atividade catalítica dessa enzima e pela interação com uma GTPase nuclear relacionada a Ras, a Ran (Roig *et al.* 2002). Outros domínios, como o domínio *Dead-box* presente na Nek5 e um grupo de repetições de sequência de armadillo encontrados na Nek10 são característicos dessas proteínas e não são encontrados em outras Neks humanas (Figura 2).

**Tabela 1: Tabela de comparação funcional das Neks de mamíferos.**

<b>Nek</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
Nek1	Responde a danos ao DNA; o silenciamento causa defeitos nos pontos de controle G1/S e G2/M; a superexpressão causa a perda do cílio primário; envolvida na PKD e na síndrome de costelas curtas e polidactília.	(Upadhy <i>et al.</i> 2000; Polci <i>et al.</i> 2004; Chen <i>et al.</i> 2008; Pelegri <i>et al.</i> 2010; Thiel <i>et al.</i> 2011)
Nek2	Promove a divisão do centrôssoma em G2/M e a segregação dos cromossomos; sua atividade é inibida após a exposição a RI; fosforila a C-Nap no centrôssoma.	(Rhee & Wolgemuth 1997; Fry <i>et al.</i> 1998a; Fry <i>et al.</i> 1998b; Chen <i>et al.</i> 2002)
Nek3	Regula a desacetilação dos microtúbulo nos neurônios; regula o citoesqueleto em resposta a prolactina.	(Miller <i>et al.</i> 2007; Chang <i>et al.</i> 2009)
Nek4	o seu silenciamento altera a sensibilidade das células MCF7 a vincristina e taxol.	(Doles & Hemann 2010; Boly <i>et al.</i> 2011)
Nek5	Não foi caracterizada.	
Nek6	É necessária para a formação do fuso mitótico e para citocinese; promove a separação dos centrôssomos; participa da ativação da Nek9; é superexpressa em muitos tumores humanos.	(Belham <i>et al.</i> 2003; O'Regan & Fry 2009; Jee <i>et al.</i> 2010)
Nek7	Participa da mesma via de sinalização das Neks 6 e 9, atuando na formação do fuso mitótico e na separação dos centrôssomos.	(Belham <i>et al.</i> 2003; Kim <i>et al.</i> 2007)
Nek8	Atua na regulação do cílio primário; regula a localização e a expressão de proteínas envolvidas na formação do cílio; envolvida na PKD e superexpressa em tumor de mama humano.	(Holland <i>et al.</i> 2002; Liu <i>et al.</i> 2002; Bowers & Boylan 2004; Otto <i>et al.</i> 2008; Sohara <i>et al.</i> 2008; Trapp <i>et al.</i> 2008)
Nek9	Associada a Bcd2 in vivo através de sua fosforilação; regula o alinhamento e a segregação dos cromossomos na mitose; mediador da organização dos cromossomos e do centrôssoma; participa da mesma via da Nek6 durante a mitose, regula a progressão de G1 e S através da interação com o complexo facilitador da transcrição da cromatina (FACT).	(Bertran <i>et al.</i> 2011; Regué <i>et al.</i> 2011)
Nek10	Regula a determinação dos pontos de checagem em G2/M induzidos por UV; interage com Raf-1/Mek para promover a ativação de Mek1 após a exposição a UV; mutações para esse gene foram identificados em tumores primários e linhagens de câncer humanas.	(Moniz & Stambolic 2011)
Nek11	Necessária para a parada em G2/M após indução de dano por RI; ativada pela fosforilação de Chk1; mutações para esse gene são encontradas em tumores humanos.	(Noguchi <i>et al.</i> 2002, 2004; Melixetian <i>et al.</i> 2009; Sørensen <i>et al.</i> 2010)

Tabela modificada de Moniz *et al.* 2011.





**Figura 2: Esquema demonstrativo do alinhamento de importantes características estruturais da família Nek em mamíferos e da quinase NIMA do fungo *A. nidulans*.**

Observa-se a localização conservada do domínio quinásico na região N-terminal, exceto para a Nek10, e a presença de importantes motivos estruturais na região C-terminal, destacando-se domínios super-hélice (*coiled coil*) e sequências PEST presentes na maioria das proteínas demonstradas no esquema.

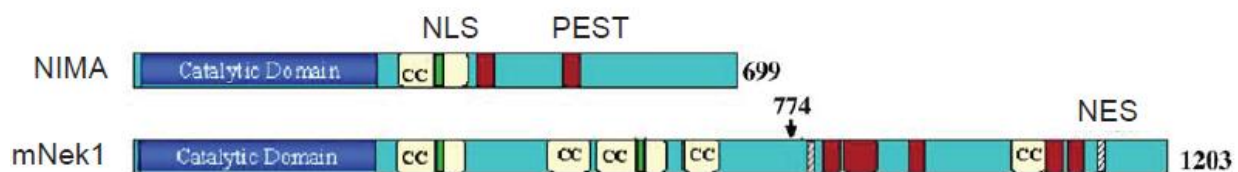
Figura modificada de (Moniz *et al.* 2011).

Existem divergências de função entre as Neks de mamíferos e a proteína NIMA ancestral, realçado pelo fato de que em mamíferos essas quinases estão envolvidas

em muitos aspectos da progressão do ciclo celular, mas não assumem a função exata que exercem no fungo. É interessante destacar que grande parte dessas quinases podem ser atribuídas à regulação dos microtúbulos e de estruturas contendo microtúbulos. Mais recentemente, membros dessa família de proteínas também se mostraram envolvidos no controle do ciclo celular através de *checkpoints* após estresse genotóxico, bem como no desenvolvimento de câncer, como é o caso da Nek1.

## 2. A Nek1

A Nek1 foi a primeira proteína serina/treonina quinase descrita em humanos relacionada à NIMA, apresentando 42% de identidade com a extremidade catalítica da proteína do fungo (Letwin *et al.* 1992). Ambas quinases possuem um arranjo estrutural semelhante, com o domínio quinásico na extremidade N-terminal seguido por um longo domínio C-terminal (Figura 3). A Nek1 de mamíferos apresenta mais de 1200 aminoácidos e cerca de 175 kDa (Feige *et al.* 2006). Além disso, em sua região C-terminal possui sequências de localização nuclear (NLS – *Nuclear localization signal*) e de exportação nuclear (NES – *Nuclear exportation signal*), sequências PEST e regiões super-hélice. Essas estruturas parecem exercer papel determinante na função da proteína, sendo importante para a interação dessa quinase com outras moléculas e na sua regulação.



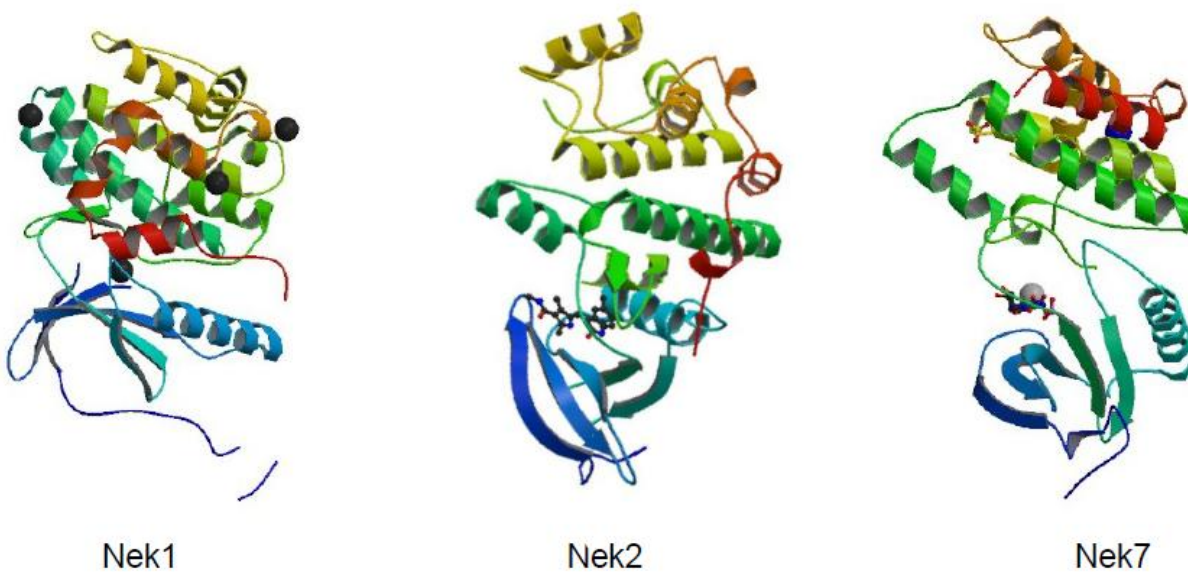
**Figura 3: Comparação esquemática da estrutura da NIMA com a Nek1 de camundongo.** Ambas as proteínas apresentam a região N-terminal conservada, onde se encontra o domínio catalítico. A região C-terminal varia entre as duas proteínas que apresentam motivos proteicos conhecidos: domínios super-hélice (CC - *coiled-coiled regions*); NLS (sinal de localização nuclear); NES (sinal de exportação nuclear); PEST (sequências de sinalização para degradação proteica, rico nos aminoácidos prolina, glutamato, serina e treonina). Figura adaptada de (Feige *et al.* 2006).

Alguns membros da família das Neks já tiveram sua estrutura resolvida através de cristalografia (Rellos *et al.* 2007; Richards *et al.* 2009), entretanto, a Nek1 é uma proteína de alto peso molecular e com um domínio quinásico, por isso deve conter regiões de elevada flexibilidade estrutural. Esses fatores dificultam a obtenção de um cristal protéico que ofereça resolução suficiente para a determinação de sua estrutura. Como alternativa, pode-se optar pela separação das sequências codificadoras de diferentes domínios estruturais, na tentativa de formar cristais mais refinados e por fim, construir um modelo com a junção desses dados e através de pesquisa em bancos de dados como o *Protein Data Bank*. Além disso, pode-se utilizar como estratégia adjuvante, o uso de ligantes irreversíveis que conseguem estabilizar regiões móveis, principalmente relacionadas à atividade enzimática da proteína, obtendo-se assim um cristal de maior qualidade. Recentemente, a porção catalítica da Nek1 teve sua estrutura resolvida e aparenta um dobramento semelhante a outras Neks e as quinases em geral (Figura 4 e 5).

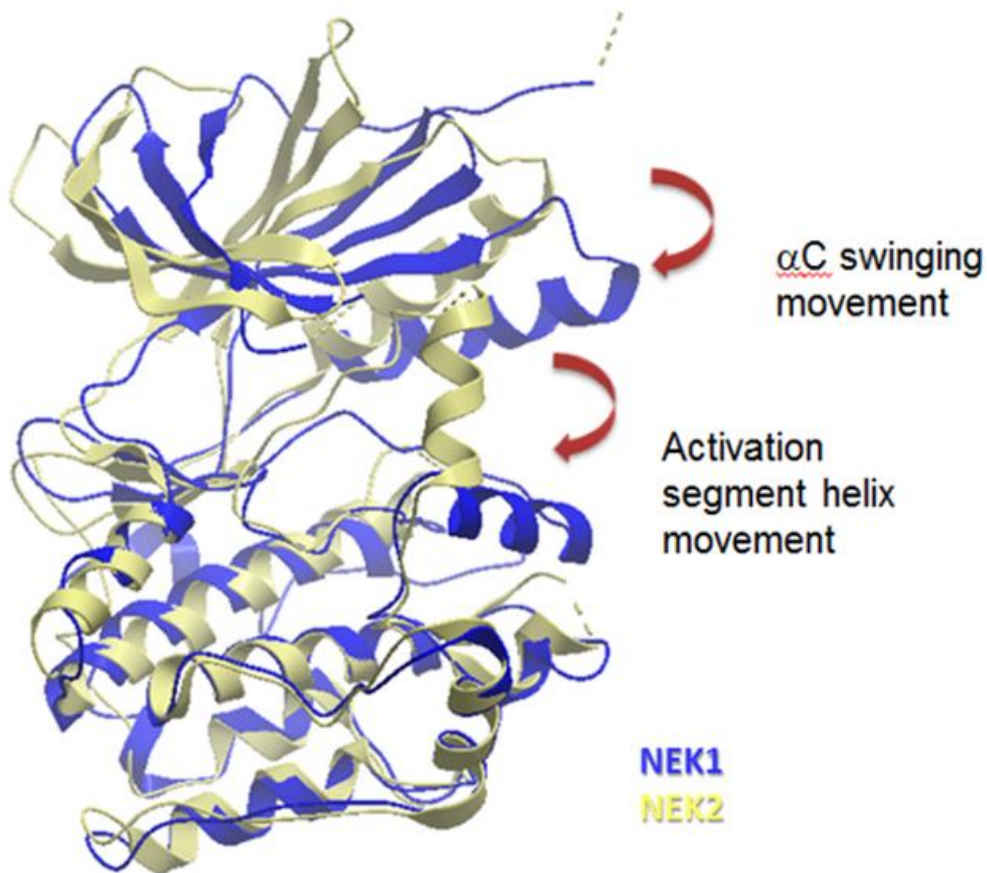
De modo geral, as proteínas quinases catalisam uma reação de transferência de um fosfato do ATP para o grupo hidroxil de uma serina, uma treonina, ou uma tirosina. As proteínas quinases podem adotar, pelo menos, duas conformações distintas: um estado "on" que é maximamente ativo, e um estado "off", com atividade mínima. Durante a ativação, é esperado que as quinases assumam conformações estruturalmente muito semelhantes, nas quais ocorrem modificações estruturais principalmente na região correspondente a alça de ativação, que devido a uma modificação por fosforilação, acaba expondo o sítio ativo da proteína. O que difere entre essas quinases é a região reconhecida em relação a posição do aminoácido que será fosforilado na molécula alvo. A regulação da atividade da proteína também difere e pode ser mediada por motivos regulatórios presentes na própria região catalítica ou no restante da estrutura, que tende a ser muito variável de uma quinase para outra (Huse & Kuriyan 2002).

A estrutura da região catalítica das quinases é extremamente conservada apresentando dois domínios principais, ou lobos, um menor na região N-terminal e um maior, na outra extremidade. O primeiro é geralmente composto de cinco cadeias  $\beta$  e uma  $\alpha$  hélice predominante, chamada de hélice- $\alpha$ C. O segundo, próximo à região C-

terminal, possui predomínio de hélices. Esses domínios são ligados através alças, incluindo a alça de ativação denominada *T-loop*. O ATP se liga em uma fenda profunda entre os dois lobos e promove a conexão das cadeias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  através de uma alça altamente conservada rica em resíduos de glicina. Esses resíduos permitem a interação com os grupos fosfatos do ATP, auxiliando na transferência para a molécula alvo. Entretanto, essa alça se torna muito flexível na ausência de ligantes (Huse & Kuriyan 2002) .



**Figura 4: Comparação da estrutura cristalográfica da região catalítica da Nek1 com as Neks humanas 2 e 7.** Imagens foram obtidas no *Protein Data Bank* pelos códigos 4APC, 2JAV e 2WQN respectivamente e estão disponíveis no <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>



**Figure 5: Comparação da estrutura do domínio quinásico da Nek1 com a Nek2.**

Ambas as estruturas foram sobrepostas para comparação do domínio catalítico dessas enzimas.

Imagem obtida do Structural Genomics Consortium (SGC), depositada em abril de 2012 e disponível no endereço <http://www.thesgc.org/structures/details?pdbid=4APC/>

Estudos estruturais de proteínas como as quinases são importantes para entender o funcionamento dessas enzimas. Além disso, esses modelos são necessários para a construção de inibidores específicos, com potencial alvo em terapias antitumorais, como é caso da Nek2 que teve sua estrutura resolvida em 2007 e desde então, diferentes grupos estão buscando um inibidor eficiente e seletivo (Qiu *et al.* 2009; Hayward *et al.* 2010; Innocenti *et al.* 2012).

A quinase Nek1 tem sido descrita como atuando em diferentes mecanismos, principalmente relacionadas à ciliogênese, ao controle do ciclo celular e em resposta ao

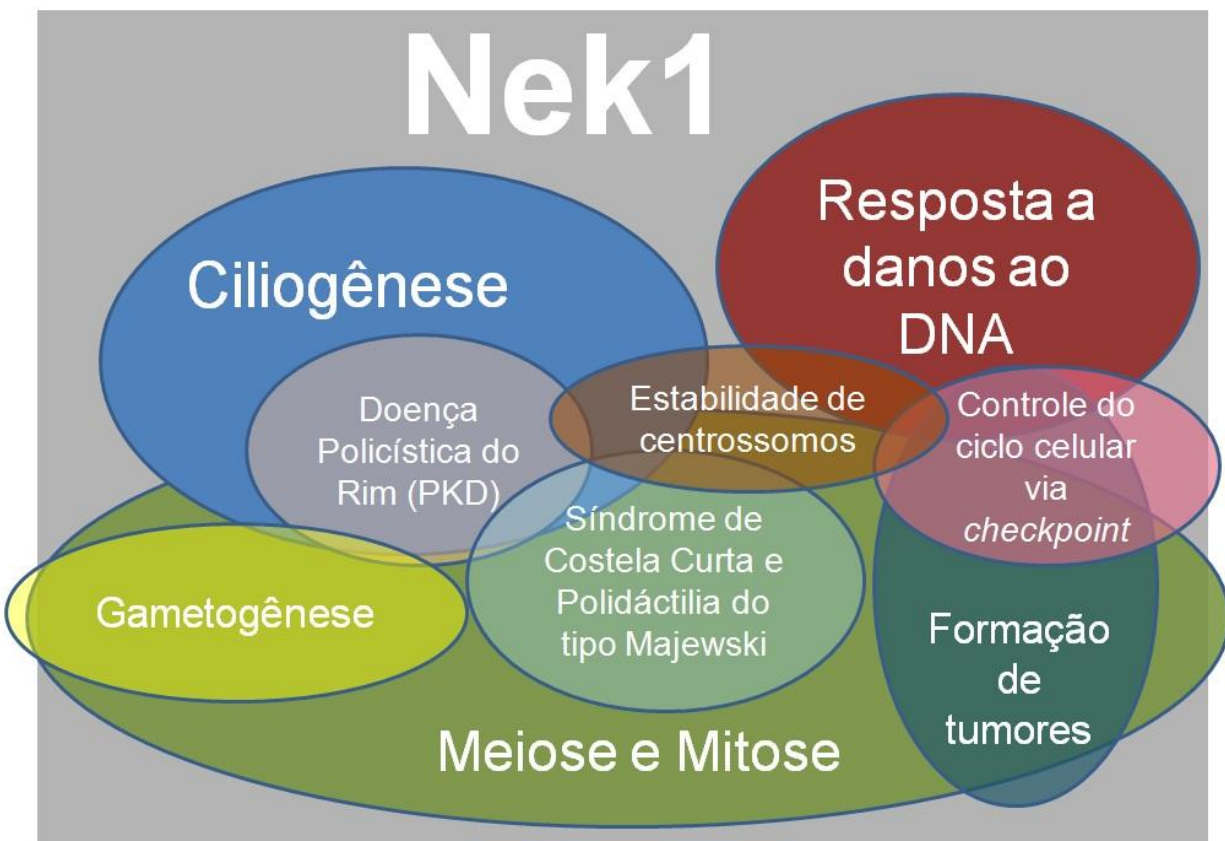
estresse genotóxico. Mutações no gene que a codifica estão associadas a patologias em humanos como a Doença Policística do Rim (PKD), a Síndrome de Costela Curta e Polidactilia do tipo Majewski (SCCPM) e ao surgimento de tumores. O diagrama apresentado na Figura 6 propõem possíveis correlações entre as de funções atribuídas a Nek1.

Grande parte dos estudos funcionais da Nek1 são focados no seu papel na ciliogênese e na resposta a danos ao DNA e, esses eventos não parecem estar relacionados, sugerindo que sejam dependentes da situação fisiológica da célula e do conjunto de moléculas disponíveis para aquela situação ou até mesmo do tipo celular. A Nek1 é capaz de interagir com muitas proteínas e essas relações podem explicar a sua atuação nesses mecanismos. Por exemplo, em células que apresentam estrutura ciliar, existe um conjunto de proteínas atuantes cuja expressão dos seus genes não costumam estar presentes em outros tipos celulares. Por isso, na presença de diferentes moléculas interatoras, a Nek1 pode assumir funções distintas (Quarmby & Mahjoub 2005). O mesmo ocorre em resposta ao estresse genotóxico. Uma cascata de sinalização ativa que recruta proteínas específicas que não costumam estar atuantes em situações normais ou fisiológicas para cada tipo celular. Por isso, no diagrama apresentado na figura 6, as caixas representando a ciliogênese e a resposta a danos ao DNA foram dispostas de maneira que não se encontrem, para demonstrar a não relação entre essas duas funções, que ainda não fora estabelecida. Entretanto, algumas funções estão correlacionadas, como é o caso do envolvimento dessa quinase na ciliogênese como explicação para a associação com as patologias PKD e a SCCPM. Além disso, existe uma ligação muito forte na regulação do ciclo celular através da ativação de etapas de controle (*cell cycle checkpoints*) em resposta a danos ao DNA. Defeitos nesses mecanismos levam a instabilidade genômica e a formação de tumores (Ljungman 2010). Neste caso, o diagrama ilustra a interação desses eventos, propondo uma ligação entre esses fenômenos (Figura 6)

Como muitos membros das Neks, essa quinase também tem sido relacionada à estabilidade de centrossomos durante a divisão celular, sendo um fator essencial para a mitose (White & Quarmby 2008). O envolvimento da Nek1 nesse processo, independente de danos ao DNA, também pode contribuir para o surgimento das

patologias mencionadas anteriormente, pois os portadores dessas síndromes apresentam desordens no desenvolvimento de tecidos em geral além do fenótipo relacionados à falha na ciliogênese (Thiel *et al.* 2011).

A divisão celular pode sofrer influência de todos esses fenômenos, afetando na integridade da mitose, e no caso das células germinativas, da meiose. Mais detalhes sobre a atuação da Nek1 nas células de mamíferos serão tratados nos tópicos a seguir.



**Figura 6: Diagrama ilustrando uma possível correlação entre as funções atribuídas a quinase humana Nek1 e no surgimento de patologias.** A sobreposição de caixas ilustra uma interação comprovada entre diferentes funções atribuídas a Nek1. As caixas que não se sobrepõem indicam mecanismos que até o momento não apresentaram relação.

## 2.1 A Nek1 e a Ciliogênese

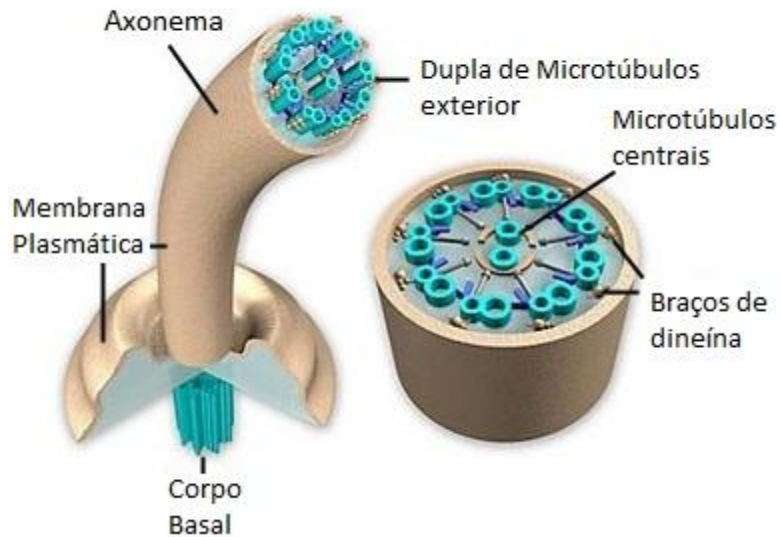
O cílio primário possui uma estrutura semelhante a fios e é encontrado na superfície de alguns tipos celulares, sendo altamente conservado nos eucariotos (Quarmby & Parker 2005). É constituído por um feixe de microtúbulos, denominado axonema, circundado por uma membrana contínua a membrana da célula (Figura 7). O cílio primário é ancorado a célula através do corpo basal, que também funciona como um centríolo durante a mitose. Os cílios podem ser classificados de acordo com a estrutura de seu axonema, que altera a motilidade dessas estruturas. Os cílios móveis contêm um axonema composto por nove pares de microtúbulos que cercam dois feixes de microtúbulos centrais e estão distribuídos por todo o sistema respiratório. Em contraste, a maioria dos cílios primários não são móveis e seu axonema está organizado em nove duplas de microtúbulos periféricos com ausência da estrutura central (Hildebrandt *et al.* 2011). No epitélio renal são encontradas células com apenas um cílio imóvel na superfície apical da maioria do epitélio que compõem os túbulos renais. Acredita-se que essas estruturas funcionam como mecanosensores dependentes do fluxo de urina. O fluído percorre a superfície apical das células e dobra o cílio primário, fornecendo a sinalização adequada para a ativação dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração de cálcio intracelular (Patel *et al.* 2009).

Os cílios são sensores de uma ampla variedade de sinais extracelulares que influenciam na proliferação, polaridade, crescimento de nervos, diferenciação, ou manutenção de tecidos. Os sinais recebidos por receptores específicos presentes em sua estrutura podem ser devido a estímulos mecânicos, térmicos, hormonais, olfativos, luminosos e osmóticos. Proteínas motoras localizadas nessas estruturas transportam materiais ao longo do axonema ciliar, um processo chamado de transporte intraflagelar. Eventos como a perda de cílios, a interrupção do transporte intraflagelar, ou a desregulação da sinalização mediada por essa estrutura, levam à proliferação de células epiteliais e a cistogênese. Por isso as doenças humanas relacionadas à má formação dessas estruturas e sua sinalização são classificadas como ciliopatias, destacando-se a Doença Policística do Rim que será detalhada adiante. Entretanto, o mecanismo que permeia a relação entre a multiplicação excessiva de células e a



formação de cistos com os defeitos na formação e atividade dos cílios ainda não está bem estabelecido (Huber & Cormier-Daire 2012)

### Estrutura de Cílios e Flagelos



**Figura 7: Representação gráfica da estrutura básica de cílios e flagelos.** Figura modificada de <http://www.cartage.org.lb>

Algumas proteínas com conhecida função na regulação do processo mitótico também apresentam papel na montagem ciliar, como a Fa2p, um membro da família Nek identificado a partir de uma triagem de mutantes defectivos em desflagelação em *Chlamydomonas* (Finst *et al.* 1998). As Neks de mamíferos também parecem estar envolvidas na formação e funcionalidade dos cílios. A Nek8 é encontrada em regiões próximas a cílios primários durante a interfase, mas não é observada durante a mitose e o silenciamento desta quinase não afeta a montagem ciliar (Mahjoub *et al.* 2005).

A Nek1 localiza-se próxima a centrossomos na interfase e, durante a mitose permanece associada ao centro de organização de microtúbulos nos pólos do fuso mitótico (Mahjoub *et al.* 2005). Os centrossomos são tipicamente localizados próximos ao núcleo da célula, onde eles orquestram a organização do citoesqueleto microtubular durante a interfase e a mitose. Somado a isso, os centrossomos também servem como

base para a integração de diferentes vias de sinalização que coordenam a progressão do ciclo celular. A Nek1 também é encontrada na região do corpo basal, um corpúsculo que existe na base dos cílios e dos flagelos e, sua superexpressão inibe a ciliogênese em células de epitélio renal canino (Shalom *et al.* 2008), mas sem interromper a estrutura centrossomal (White & Quarmby 2008). Esses efeitos são dependentes da atividade quinásica da Nek1 e domínios proteicos existentes na região C-terminal dessa proteína são importantes para sua localização próxima ao corpo basal de células ciliadas (White & Quarmby 2008).

Algumas proteínas que se ligam a Nek1 foram identificadas através de um ensaio de duplo híbrido em leveduras utilizando os domínios catálico e regulatório dessa proteína como isca (Surpili *et al.* 2003). Dentre as 11 proteínas encontradas está a quinesina KIF3A, que atua no transporte celular, na organização do citoesqueleto e no controle de transdução de sinais. Essa proteína é expressa em todas as células, mas é encontrada predominantemente no cérebro, no testículo e na medula adrenal e é importante para o desenvolvimento embrionário (Kondo *et al.* 1994; Surpili *et al.* 2003) Outra proteína encontrada, a tuberina, atua na determinação da localização correta da policístina-1 na membrana. Essa proteína interage com o complexo E-caderina/catenina na membrana e, no ensaio de duplo-híbrido, também se observou a interação da Nek1 com a  $\alpha$ -catulina, uma proteína relacionada com a  $\alpha$ -catenina (Huan & van Adelsberg 1999). A função dessas proteínas encontra-se alterada em modelos animais para a Doença Policística do Rim (Upadhyya *et al.* 2000) e a possível interação da Nek1 com essas proteínas pode explicar o envolvimento da Nek1 na ciliogênese e nas ciliopatias descritas a seguir.

## **2.2 Doenças relacionadas à ciliogênese**

Uma variedade de síndromes humanas está relacionada com defeitos na montagem, manutenção e função de cílios (Ong & Wheatley 2003; Lina & Satlinb 2004; Hildebrandt *et al.* 2011). Ciliopatias, incluindo a PKD, envolvem a proliferação celular desordenada em função de alterações ciliares. Entretanto, a relação entre cílios e ciclo celular é pouco entendida. Na maioria das células ciliadas, a entrada no ciclo celular é

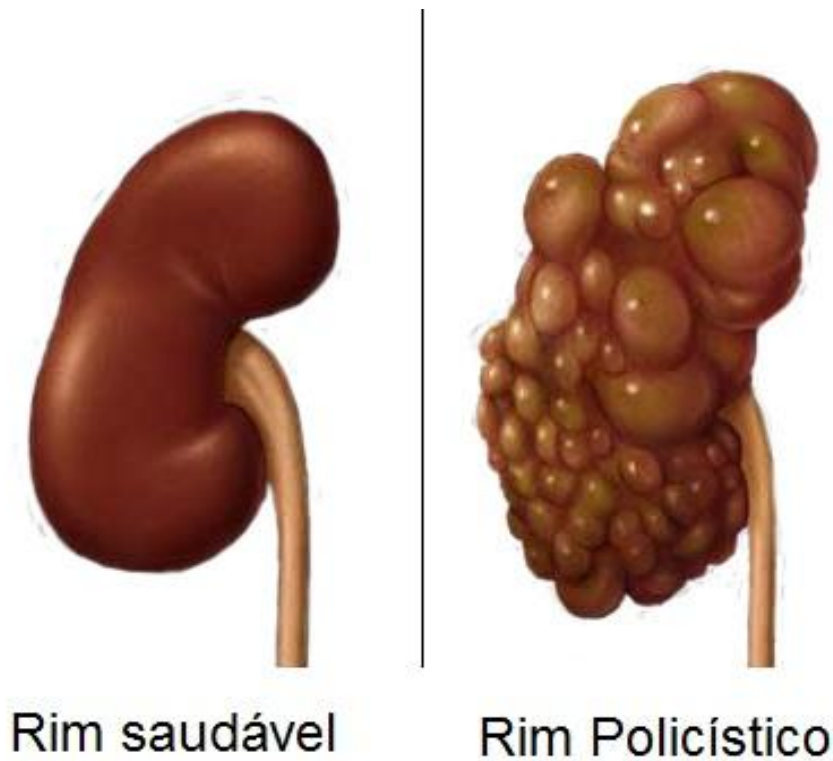
precedida pela desmontagem dos cílios e a saída da mitose é acompanhada pela montagem ciliar, uma relação que pode refletir o uso dos corpos basais/centríolos como polos do fuso mitótico (Wheatley *et al.* 1996). Em paralelo a isso, vias de sinalização importantes para o crescimento e diferenciação celular têm sido localizadas nos cílios (Huangfu *et al.* 2003).

### **2.2.1 A Doença Policística do Rim (PKD)**

A Doença Policística do Rim ou PKD (*Policystic Kidney Disease*) é uma das doenças genéticas mais comuns, caracterizada pelo crescimento crônico de cistos (Figura 8) e insuficiência renal, podendo acometer adultos e crianças no mundo todo. A PKD pode ser herdada em sua forma autossômica dominante (ADPKD) ou autossômica recessiva (ARPKD). A forma autossômica dominante afeta principalmente adultos e é causada por mutações nos genes PKD1 ou PKD2, que codificam as proteínas policistina-1 e policistina-2, respectivamente. A PKD1 é um receptor de membrana e a PKD2 é um canal permeável a  $Ca^{2+}$ . Essas duas proteínas formam um complexo que regula os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular dependente do fluxo extracelular. Embora as policistinas sejam encontradas em diversos tecidos, elas possuem papel-chave no desenvolvimento e diferenciação normal dos rins (van Adelsberg 1999). Clinicamente, os adultos com ADPKD apresentam aumento do volume renal, dor abdominal, hematúria, infecção renal, cistos e os tecidos perdem a sua funcionalidade gradativamente. Cerca de metade dos indivíduos afetados pela ADPKD desenvolverão a doença até seu estágio terminal, atingindo o óbito devido essa patologia (Steinman 2012).

A forma autossômica recessiva afeta principalmente bebês e crianças e é causada por mutações no gene PKHD1, que codifica a proteína fibrocistina. A ARPKD pode estar presente em recém-nascidos, que apresentam sintomas como enorme alargamento renal, protusão abdominal, insuficiência renal intra-uterina e hipoplasia pulmonar. Essa doença pode, ainda, se manifestar mais tardiamente através da insuficiência renal e hepática, acompanhada de hipertensão arterial sistêmica e portal (Patel *et al.* 2009). O tratamento das infecções urinárias e da hipertensão arterial pode

prolongar a vida dos portadores, entretanto, sem diálise ou transplante, a insuficiência renal pode ser fatal (Steinman 2005).



**Figura 8: Representação comparativa entre um rim humano saudável e um rim policístico.**

Imagem adaptada de <http://www.riversideonline.com>

Nos últimos anos, surgiram evidências sobre a origem da PKD a partir de anormalidades na formação do cílio primário. Essas anormalidades alteram a regulação do crescimento e da diferenciação do epitélio renal levando a formação de cistos e são resultado de alterações nos genes que regulam o desenvolvimento, a formação e a função dessas estruturas celulares (Lina & Satlinb 2004; Patel *et al.* 2008). Essas evidências corroboram com a classificação da PKD como uma ciliopatia. Primeiramente, as proteínas PKD1, PKD2 e a PKHD1, bem como outras proteínas

associadas a doenças renais císticas, tais como a síndrome Nefronofitíase e Bardet-Biedl, estão localizados no cílio primário e no corpo basal. Em segundo lugar, células mutantes para PKD1 apresentam cílio primário não funcional evidenciado pela falha em aumentar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dependentes do fluxo urinário. Por último, a perda da função de genes necessários para a síntese dos cílios, tais como Kif3a e Ift88, resulta na ausência dessas estruturas e acarreta o surgimento de uma síndrome semelhante a PKD em camundongos (Patel *et al.* 2009). O mecanismo molecular pelo qual as anormalidades no cílio primário resultam na PKD também não estão bem esclarecidos. A identificação de outras proteínas associadas às ciliopatias podem auxiliar no entendimento dessas patologias e, possivelmente, na busca por terapias mais eficazes.

Mutações no gene que codifica a Nek1 foram encontradas em camundongos utilizados como modelo da PKD, denominados *kat* e *kat2j*. O animal *kat* apresenta uma deleção em parte do gene que codifica a Nek1, enquanto que o outro modelo apresenta um stop códon prematuro. Ambas as alterações produzem o mesmo fenótipo, alterando a molécula da Nek1 e deletando o domínio quinásico dessa proteína. Como resultado dessas mutações, esses animais apresentam um desenvolvimento anormal, incluindo retardo no crescimento e mortalidade precoce. Aqueles que chegam à idade adulta apresentam esterilidade (machos) e subfertilidade (fêmeas), anemia e PKD progressiva (Upadhyia *et al.* 2000).

Duas proteínas possivelmente associadas a Nek1, a KIF3A e a tuberina, estão ligadas ao desenvolvimento dos cílios primários (Lin *et al.* 2003; Surpili *et al.* 2003) e a possível interação da Nek1 com essas proteínas pode esclarecer o envolvimento da Nek1 na etiologia dessa doença.

A PKD também pode surgir a partir de perda funcional da proteína TAZ, uma proteína adaptadora do complexo de sinalização para degradação pela ligase E3 ubiquitina que tem como alvo a proteína ciliar policistina 2 (PKD2). A Nek1 fosforila TAZ em uma região essencial para a ubiquitinação e degradação proteossômica de PKD2. A ausência da Nek1 leva a não ativação de TAZ, que permanece em sua forma não fosforilada, promovendo assim o acúmulo anormal de PKD2. Além disso, a Nek1 parece ser alvo de TAZ. Dessa forma, essas duas proteínas constituem um mecanismo

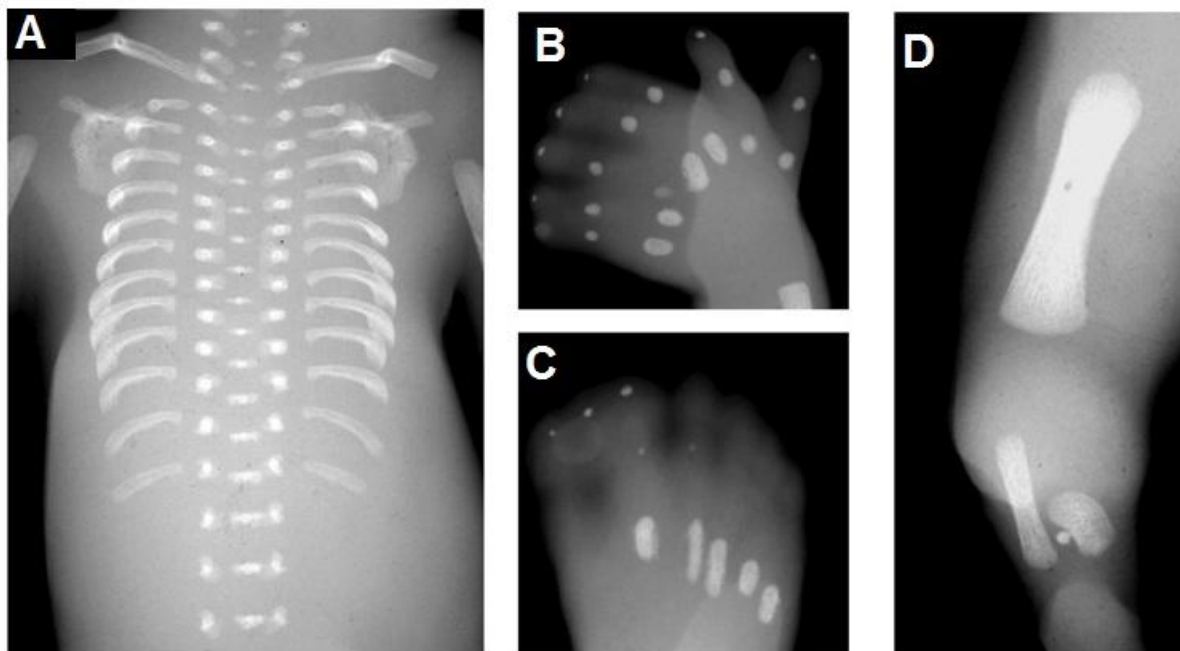
de retroalimentação negativa ligada através de fosforilação e ubiquitinação que, a partir da interação entre Nek1 e TAZ, mantem os níveis de PKD2 necessário para a ciliogênese adequada (Dutcher & Lin 2011; Yim *et al.* 2011).

### **2.2.2 Síndrome de costelas curtas e polidactilia tipo Majewski (SCCPM)**

Alguns distúrbios em humanos têm sido associados a defeitos em uma variedade de proteínas envolvidas na manutenção, formação e função dos cílios. Estas ciliopatias afetam os componentes dos cílios, o corpo basal, o centrossoma e/ou o transporte intraflagelar e muitos dos fenótipos associados incluem malformações cerebrais, cistos nos rins, polidactilia, degeneração da retina e anormalidades do desenvolvimento. Em particular, estas características fenotípicas estão presentes em portadores da Síndrome de Costelas Curtas e Polidactilia (SCCP). Esta síndrome constitui a mais freqüente osteocondroplastia autossômica recessiva letal e foi anteriormente classificada em quatro tipos distintos: tipo I, Saldino-Noonan; tipo II, Majewski ; tipo III, Verma-Neumhoff; tipo IV, Beemer. Os tipos I e III recentemente foram agrupados e um tipo V foi descrito em associação ao o tipo III. Mutações em diferentes genes foram encontradas nos portadores dessas desordens e os mais frequentes são EVC1 ou EVC2, IFT80, WDR35 e DYNC2H1 (Huber & Cormier-Daire 2012).

A SCCP do tipo Majewski ou tipo II é caracterizada por ossos tubulares curtos e com extremidades lisas, polidactilia pré e pós-axial e tíbias curtas ou ausente (Figura 9). Outras características incluem lábio leporino/palato fendido, malformações da epiglote e da laringe, cistos renais e anomalias cardíacas, genital, e intestinal. Recentemente, foram identificadas mutações na Nek1 em diferentes famílias com SCCP do tipo II, associadas a DYNC2H1 (cadeia pesada 1 da dineína citoplasmática 2) (Thiel *et al.* 2011; El Hokayem *et al.* 2012) ou sozinhas (Chen *et al.* 2012). A DYNC2H1 codifica uma subunidade do complexo da dineína citoplasmática e está envolvida no contato e translocação desse complexo ao longo dos microtúbulos. Também atua na formação e manutenção da estrutura ciliar em mamíferos, além do transporte através do cílio. Visto que Nek1 possui papel na ciliogênese, a associação de mutações no gene

que codifica essa quinase com mutações em outros genes já descritos para essa doença, podem fornecer uma correlação entre o grau de defeitos na organização dos microtúbulos e centríolos com a gravidade do fenótipo.



**Figura 9: Radiografia de pacientes investigados para Síndrome de costela curta e polidactilia Tipo Majewski.** Na imagem A está representado o encurtamento das costelas, em B e C está mostrando membros com ossos tubulares e irregulares, incompletamente calcificados e polidactilia, em D é observado o encurtamento dos ossos da perna, incluindo a tíbia. Imagem modificada de Thiel e colaboradores, 2011 (Thiel *et al.* 2011).

### 2.3 O papel da Nek1 na gametogênese

Transcritos de Nek1 são encontrados em diferentes tecidos, mostrando-se mais abundante nas gônadas de camundongos (Letwin *et al.* 1992; Arama *et al.* 1998) Também parece haver uma correlação entre a proliferação celular e os níveis de expressão da Nek1, como na camada granulosa do ovário de camundongos fêmeas. Nesse caso, a atividade mitótica acompanha o aumento da expressão de Nek1,

enquanto que o declínio na proliferação celular coincide com a queda nos níveis de mRNA de Nek1. No entanto, essa relação não foi encontrada nos demais tecidos estudados, como no baço, onde baixos níveis de transcritos da *nek1* são observados durante a indução de mitose com lipopolissacarídeos (Letwin *et al.* 1992). Uma possível razão para isso, mencionada anteriormente, é que a Nek1 pode atuar diferentemente de acordo com o tecido e das moléculas que interage. Baseado nisso, essa proteína pode estar desempenhando um papel na divisão meiótica e conseqüentemente na gametogênese no tecido germinativo, que não é semelhante para outras células proliferativas.

Posteriormente, foi realizado um ensaio de duplo híbrido utilizando biblioteca de cDNA de testículo de rato, objetivando encontrar substratos e proteínas que interagem com a Nek1 durante a espermatogênese (Feige *et al.* 2002). Foi encontrada a interação da Nek1 com a proteína Nurit, cuja expressão ocorre em fases tardias da espermatogênese e, há especulações sobre seu papel na eliminação de componentes citoplasmáticos. A Nurit apresenta em sua estrutura um motivo zíper de leucina e dois domínios super-hélice que podem estar envolvidos na homodimerização e oligomerização dessa proteína e/ou na interação com outras moléculas(Feige *et al.* 2002).

A meiose é um processo altamente conservado e fortemente regulado em todos os organismos, desde fungos até mamíferos. Dois grandes eventos definem meiose em eucariotos. O primeiro é o pareamento de cromossomos homólogos ou sinapse e, o segundo, é a troca de informação genética em um processo chamado de recombinação meiótica. O emparelhamento dos cromossomos é mediado pelo complexo sinaptonémico em combinação com as coesinas que dirigem as cromátides irmãs através de prófase I (Bannister & Schimenti 2004).

Animais mutantes para Nek1 foram utilizados em estudos para aferir a função da Nek1 na gametogênese e meiose. Esses animais apresentam diminuição no tamanho dos testículos e defeitos em sua morfologia e, somado a alterações no padrão de redistribuição da coesina no final da prófase I, causando infertilidade masculina completa. A proteína coesina SMC3 permanece localizada no centro cromossômico meiótico das células do mutante para Nek1 durante a fase diplonema, enquanto que



em células de tipo selvagem, a SMC3 é removida no final da prófase I e torna-se mais difusa em toda a região do núcleo. Estes dados implicam a Nek1 como uma quinase envolvida na redistribuição de coesina nos espermátocitos murinos (Holloway *et al.* 2011).

## 2.4 O envolvimento da Nek1 em resposta a danos do DNA

Os primeiros dados obtidos acerca da participação da Nek1 nas vias sensoras de dano e de reparo de DNA surgiram a partir de um ensaio de duplo híbrido em leveduras focando na interação proteica (Surpili *et al.* 2003). A partir da triagem de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, empregando-se o domínio regulatório e catalítico da Nek1 como isca, foram identificadas proteínas envolvidas no ciclo celular e no reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs). Dentre estas, foram encontradas a Mre11, que participa da recombinação homóloga em *Saccharomyces cerevisiae* (Bressan *et al.* 1999) e em mamíferos, faz parte do complexo MRN, composto pelas proteínas Mre11/Nbs1/Rad50, que atua se ligando ao DNA lesado, sinalizando DSBs (Huang & Dynan 2002); a ATRX, homóloga a RAD54 de *S. cerevisiae* e importante para o reparo de DSBs via recombinação homóloga (Dronkert *et al.* 2000) e a 53BP1, um mediador da checagem de danos de DNA (Wang *et al.* 2002), que em *Xenopus laevis* está associada com a cromatina (Anderson *et al.* 2001) e colocaliza-se com Mre11 após danos induzidos por radiação (Schultz *et al.* 2000).

Posterior a esse ensaio, foram conduzidos estudos em células do epitélio tubular de rim humano (HK2) selvagens e silenciadas para Nek1 e fibroblastos extraídos dos camundongos Kat e Kat2j, naturalmente deficientes para essa proteína. Foi observado um aumento da atividade quinásica da Nek1 minutos após a exposição à radiação ionizante (RI) em doses subletais, indicando a atuação dessa enzima no início da resposta ao dano (Polci *et al.* 2004). Esse fato parece ser independente do nível de expressão da Nek1, que aumenta após trinta minutos da exposição e se mantém elevada por algumas horas. Através da técnica de imunofluorescência foi demonstrado que, concomitantemente com o aumento da atividade quinásica, a Nek1 redistribui-se progressivamente do citoplasma para o núcleo, sendo detectada em focos nucleares

de quebra dupla fita de DNA colocalizando com  $\gamma$ -H2AX e Nfbd1/Mdc1, proteínas conhecidas por atuarem no reparo de DNA (Polci *et al.* 2004). A  $\gamma$ -H2AX é a forma ativada dessa histona, fosforilada especificamente no resíduo serina 139 em resposta a danos ao DNA (Shiloh 2003), e interage diretamente com lesões do tipo DSB (Paull *et al.* 2000). Nfbd1 é uma proteína associada à cromatina e que atua como sensor de danos de DNA (Shang *et al.* 2003; Polci *et al.* 2004). A translocação da Nek1 citoplasmática para o núcleo também é observada após o tratamento com UV e diferentes agentes genotóxicos como Metil-Metanosulfonato (MMS), Cisplatina, Mitomicina C, Adriamicina, Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e Etoposídeo (Chen *et al.* 2008). Concomitantemente a translocação ao núcleo, ocorre a fosforilação da Nek1, indicando a rápida ativação dessa quinase após a lesão. Além disso, os fibroblastos estabelecidos a partir de camundongos deficientes para Nek1 falham em parar o ciclo nas etapas de checagem em G1/S e G2/M e, não conseguem ativar corretamente as quinases Chk1 e Chk2 em resposta a danos no DNA induzidos por UV e IR (Chen *et al.* 2008).

Em células com a ausência da Nek1 funcional, o DNA não é reparado adequadamente, gerando DSBs que persistem por muito tempo após baixas doses de IR, gerando quebras cromossômicas excessivas. Estes dados mostram que Nek1 é importante para o controle eficiente dos pontos de checagem e para a reparação adequada de danos ao DNA (Chen *et al.* 2008). Outro estudo realizado com células extraídas desses mesmos animais deficientes mostrou que ocorrem erros na segregação cromossômica e na citocinese, levando essas células a aneuploidia. Após algumas passagens em cultivo, essas células adquirem característica de células transformadas, obtendo a capacidade de crescer em condições independente da ancoragem. Quando injetadas em camundongos, ocorre a formação de tumores e os animais deficientes para Nek1 apresentam espontaneamente maior incidência de linfomas que a linhagem de animais selvagem. Esses achados indicam que a Nek1 é necessária para a manutenção da integridade do genoma, atuando no controle da estabilidade cromossômica (Chen *et al.* 2011a)

Através de diferentes técnicas, também foi demonstrado que células silenciadas ou deficientes para a Nek1, quando expostas a diferentes indutores de danos ao DNA,

apresentam alterações na sua capacidade de reparo. (Chen *et al.* 2008) A partir dessa evidência, sugere-se a atuação da Nek1 em resposta a diferentes tipos de danos ao DNA. Por isso, Nek1 pode estar participando do início da resposta celular ao estresse genotóxico, provavelmente como integradora de diferentes vias de sinalização e em etapas de controle do ciclo celular ao invés de fazer parte de uma via específica.

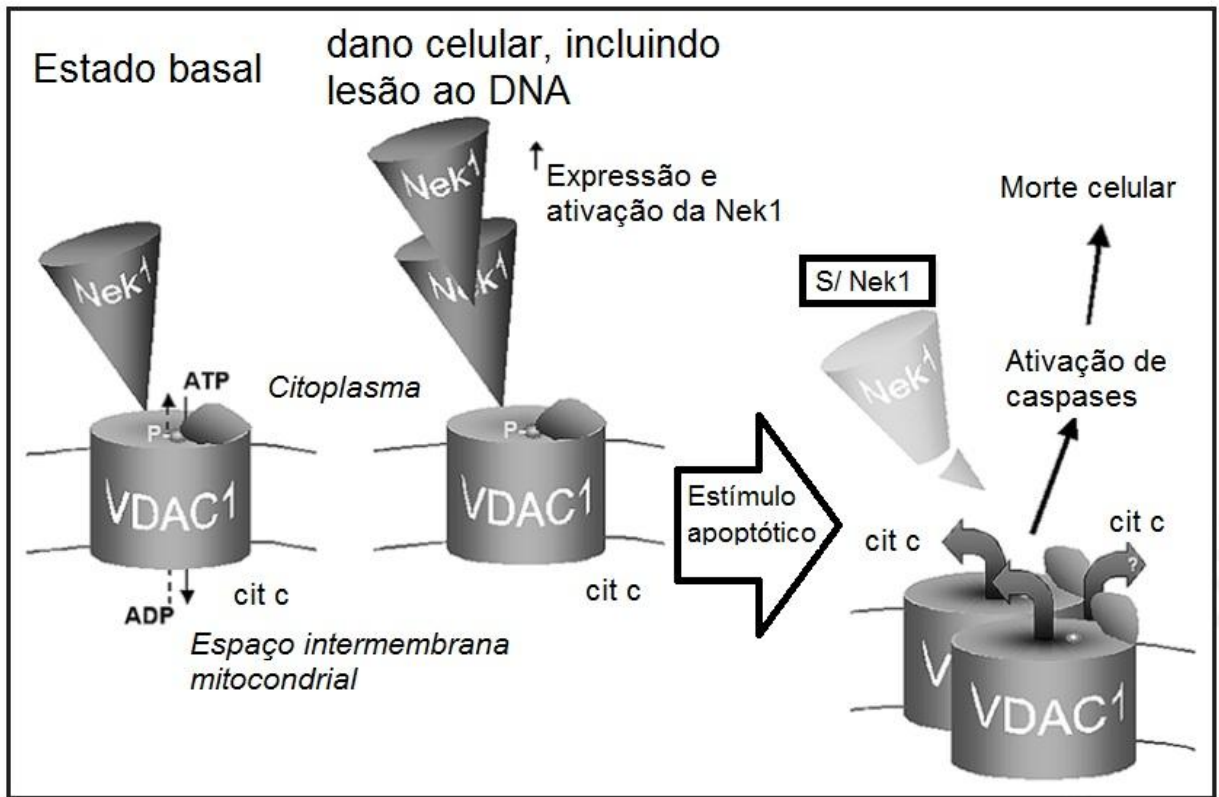
A união desses dados sugere a atuação de Nek1 como uma quinase proximal ou iniciadora de uma cascata de sinalização, similar à ATM e ATR, mas que atuaria em alguns tipos celulares específicos, tais como células do epitélio renal tubular, espermatozônias e certos neurônios, onde é encontrada mais abundantemente. Entretanto, a Nek1 parece atuar independentemente da ação de ATM e ATR, pelo menos em respostas a danos causados pela radiação ionizante. O uso de inibidores químicos específicos e de linhagens mutantes para essas quinases não alterou a atividade da Nek1 em resposta a indução de danos ou sua localização. Além disso, a atividade de ATM e ATR também não se altera na ausência da Nek1, indicando que a Nek1 pode ser uma quinase que atua em resposta ao estresse genotóxico independente de ATM e ATR (Chen *et al.* 2011b).

## **2.5 A Nek1 e a morte celular**

Lesões ao material genético podem acionar uma variedade de respostas celulares, incluindo a ativação da transcrição de genes que regulam a reparação do DNA, envolvidos no controle do ciclo celular e da apoptose (Islaih *et al.* 2005). A resposta ao estresse genotóxico também pode se dar por modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, que são fatores essenciais para dirigir a cascata de sinalização envolvida na resposta ao dano de DNA. Muitas proteínas são encontradas atuando nesses mecanismos, nos quais as proteínas quinases surgem como protagonistas, direcionando a célula para eventos relacionados ao reparo ou até mesmo, morte celular.

Recentemente, surgiram evidências sobre a participação da Nek1 na morte celular através da fosforilação de um canal de ânions dependente de voltagem (VDAC1) presente na mitocôndria (Chen *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010). O VDAC1 é um

componente do poro de transição de permeabilidade da membrana. Para iniciar a apoptose e outras formas de morte celular, a mitocôndria se torna permeável para que o citocromo C e outras moléculas pré-apoptóticas residentes no seu interior espalhem-se no citosol, ativando cascatas apoptóticas. A Nek1 parece interagir diretamente com VDAC1, fosforilando essa proteína e alterando a sua conformação (Chen *et al.* 2010). Células deficientes ou com a Nek1 endógena silenciada falham em fosforilar essa proteína e morrem precocemente após a exposição à UV. Somado a isso, essas células possuem um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial e, a expressão ectópica de uma Nek1 mutante também resulta na perda da fosforilação da VDAC1 com conseqüente morte celular. Através de um estímulo, como o estresse genotóxico, a atividade da Nek1 é modificada, levando a fosforilação de VDAC1 (Chen *et al.* 2009). Esse processo protege a célula da morte celular induzida pela perda do potencial da membrana mitocondrial e esta hipótese está demonstrada esquematicamente na figura 10. Alterações ou a ausência da Nek1 podem prejudicar esse equilíbrio, tornando a célula mais sensível aos danos ao DNA. Entretanto, não existem estudos demonstrando um aumento da morte celular por apoptose na ausência da Nek1, embora tenha sido mostrado que células com a Nek1 mutada ou ausente apresentem maior sensibilidade a agentes genotóxicos (Polci *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008; Pelegrini *et al.* 2010).



**Figura 10: Ilustração esquematizada sobre o papel proposto para a Nek1 na regulação da morte celular mediada pela permeabilidade mitocondrial através da fosforilação de VDAC1.** Em condições normais, Nek1 mantém VDAC1 fosforilada no resíduo ser 193, auxiliando na manutenção da integridade da membrana mitocondrial. Após uma lesão como dano oxidativo ou estresse genotóxico, a expressão e a atividade de Nek1 é aumentada, favorecendo esse mecanismo. No caso da Nek1 estar ausente ou não funcional em uma célula, VDAC1 não é fosforilada de forma adequada e permite a perda do potencial de membrana da mitocôndria, tornando-a permeável. Componentes do interior da membrana, como o citocromo c, passam para o citoplasma ativando a sinalização de morte celular. Imagem modificada de (Chen *et al.* 2009).

### 3 O Ciclo Celular

O ciclo celular compreende o conjunto de processos pelos quais a célula duplica seu material genético e o reparte igualmente entre suas células filhas. Pode ser dividido

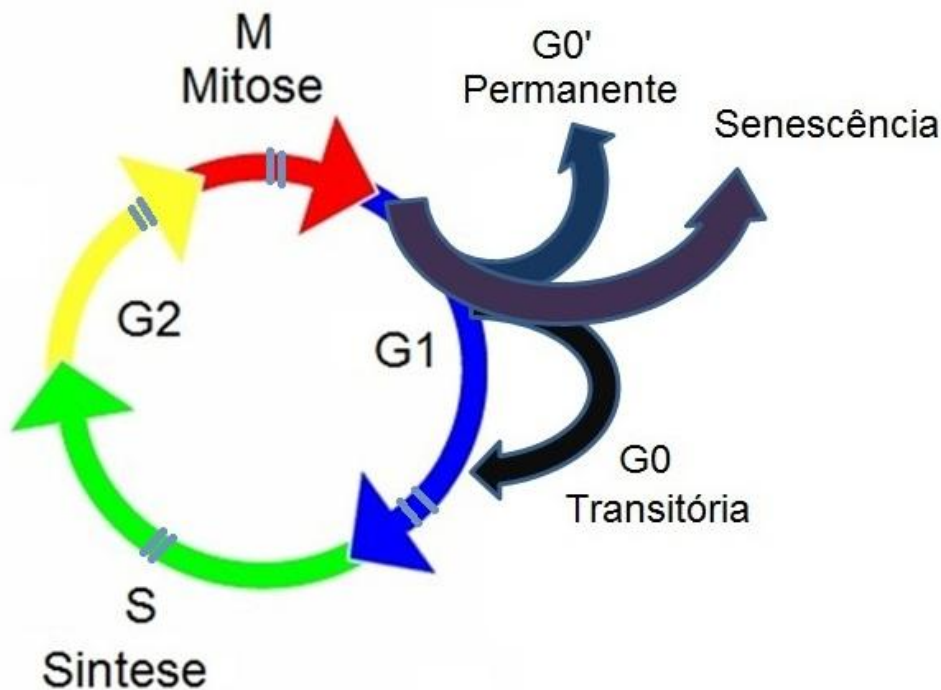
em dois estágios principais: a interfase, na qual ocorre a duplicação do DNA e de organelas, preparando a célula para a fase seguinte; e a mitose, na qual ocorre a divisão propriamente dita. A interfase também pode ser dividida em etapas, sendo que a síntese do DNA ocorre durante uma fase intermediária a fase S, que é intercalada por fases de crescimento e síntese dos outros componentes celulares, as fases G1 e G2 (G – *Gap*). A fase G1 é caracterizada por um período de crescimento celular e produção de enzimas necessárias para a duplicação do DNA e, a fase G2, que ocorre antes da mitose, é o período necessário para a duplicação das organelas e demais estruturas importantes para a formação das células filhas (Figura 11)(Vermeulen *et al.* 2003).

Uma vez iniciado o ciclo, a célula não é capaz de retornar à etapa anterior, embora possa permanecer parada em uma fase por diferentes períodos de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos. Essa característica de unidirecionalidade do ciclo celular é essencial para a manutenção da integridade genômica e se deve a uma sequência de eventos moleculares envolvendo a síntese e a degradação, bem como modificações pos-translacionais, de proteínas específicas fundamentais, que serão ativadas ou inibidas para a progressão do ciclo celular.

Nos organismos multicelulares adultos, grande parte das células se encontram paradas no ciclo celular. Somente células pertencentes a tecidos em constante renovação progridem através do ciclo, como o tecido hematopoiético, as células de mucosas e epitélio, além de uma pequena quantidade de células-tronco existente em quase todos os tecidos. Os demais tipos celulares permanecem em um estado de parada de ciclo conhecido como G0. Este estado pode ser transitório ou permanente (Malumbres & Carnero 2003).

Os casos de parada de ciclo transitórios também são chamados de quiescência celular e são induzidos pela inibição da proliferação por contato com células vizinhas, pela presença de sinais que induzem a parada (como o fator de transformação do crescimento TGF  $\beta$ ) ou ausência de sinais necessários para progressão no ciclo celular (ausência de fatores de crescimento, como PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas, EGF – fator de crescimento epidérmico, VEGF – fator de crescimento vascular endotelial, FGF – fator de crescimento fibroblástico).

Por outro lado, a parada permanente ocorre em células que atingiram um estágio de diferenciação final, como no caso de neurônios e células musculares, ou por alterações em vias de sinalização de controle do ciclo. Os mecanismos responsáveis por manter as células nesta condição ainda não estão claros, mas possivelmente envolvem a reorganização da cromatina. Ainda não foi encontrado um meio de reverter este estado e tal característica também é observada em células que sofrem a parada irreversível do ciclo chamada de senescência, na qual passam a apresentar um aumento considerável do tamanho nuclear. Esse estado pode ocorrer devido à degradação dos telômeros ou indução de dano em DNA e, difere da parada em G0 pelo metabolismo celular, que é fisiologicamente normal nas células em G0, mas pouco ativo em células senescentes (Malumbres *et al.* 2003).



**Figura 11: Esquema ilustrativo demonstrando as fases do ciclo celular e os estados inativos de progressão incluindo senescência.** As barras cinzas indicam as etapas de controle do ciclo celular.

### 3.1 A regulação do ciclo celular

A divisão celular envolve uma série de mecanismos regulatórios que implicam na alteração da expressão gênica, em modificações pós-traducionais de proteínas e no remodelamento da cromatina. Os mecanismos envolvidos na regulação desses processos são conservados em eucariotos. Os organismos multicelulares necessitam de um controle preciso atuando nos processos de divisão e diferenciação celular para favorecer a integridade do genoma e perpetuar as características do grupo celular a qual pertencem originalmente (van den Heuvel 2005).

O sistema de controle da progressão do ciclo celular está baseado em três classes de proteínas cujas funções são chave para seu funcionamento. As ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas, as CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) são proteínas que agem diretamente na regulação do ciclo celular, formando complexos atuantes ao longo do ciclo. Os níveis de ciclinas variam durante o ciclo através da sua síntese e degradação. Essas proteínas são sintetizadas somente em fases específicas, de acordo com a necessidade e, destruídas após a sua utilização. A síntese é controlada principalmente através da modulação da transcrição destes genes, que é mais lenta do que a sua degradação. Geralmente a degradação e a subsequente inativação do complexo ciclina/CDK são necessárias para a mudança de fase do ciclo. Esta degradação ocorre via proteassomo e é dependente da ubiquitinação dessas moléculas. O bloqueio desse processo provoca a parada do ciclo, que permanece nesse estado até que as ciclinas sejam degradadas. Por isso, essas moléculas podem atuar como reguladores positivos e negativos na progressão do ciclo (Arellano & Moreno 1997).

As CDKs estão presentes durante todo o ciclo celular, sendo ativadas apenas em determinadas fases quando ligadas às ciclinas, formando complexos, e sua principal função é fosforilar substratos envolvidos na progressão do ciclo celular. O complexo ciclina/CDK é capaz de controlar o andamento do ciclo celular de modo ordenado e unidirecional. Entretanto, apenas a formação física desse complexo não é suficiente para sua ativação. São necessárias modificações nas CDKs, como



fosforilação, que tanto podem ser inibitórias quanto estimulatórias, promovendo ou não a formação dos complexos com as ciclinas (Barbacid *et al.* 2005).

A terceira classe de moléculas atuantes na regulação do ciclo são os inibidores de CDKs, os CKIs (*CDKs Inhibitors*), que atuam modulando a dinâmica do ciclo em resposta a estímulos externos. As CDKs são reguladas positivamente por ciclinas e negativamente por CKIs e esses inibidores possuem papel importante como supressores tumorais (Malumbres *et al.* 2000).

Existem outras classes de proteínas envolvidas no controle das três classes citadas acima (basicamente quinases, fosfatases e proteínas relacionadas à ubiquitinação), mas que não atuam apenas na regulação do ciclo, possuindo outras funções e, constantemente são descobertos novos membros atuantes nessas vias.

Algumas características do ciclo celular, incluindo o tempo para completar os eventos, variam entre organismos e tipos celulares de um mesmo indivíduo, mas a organização básica do ciclo é semelhante em todas as células eucarióticas, embora muitos mecanismos permaneçam obscuros e pareçam ser dependentes do tipo celular (Malumbres & Barbacid 2009). Basicamente, quando uma célula recebe um estímulo para se dividir, ela é capaz de sair de um estado de repouso como G0 e entrar em G1, que tende a ser a fase mais longa do ciclo e de intensa atividade metabólica. O primeiro passo para o início do ciclo celular ocorre através da ativação da transcrição e tradução de genes específicos (Malumbres & Barbacid 2001). Logo no início dessa fase, ocorre a síntese da ciclina D1, que irá se ligar à CDK4 e à CDK6, formando dois complexos. Posterior a isso, ocorre a síntese de ciclina E, que se liga à CDK2. Estes três complexos são responsáveis pela fosforilação da proteína Rb (proteína do retinoblastoma), inativando-a. A proteína Rb é um importante regulador transcricional que, em sua forma não fosforilada, inibe a transcrição de uma série de genes através de sua ligação ao fator E2F. Ao ser fosforilada pelos complexos ciclina-CDKs, a Rb libera E2F. Esse fator irá ativar a transcrição de vários genes cujos produtos são necessários para que a célula progrida para a fase S. As CKIs p21, p53 e p57 exercem um controle negativo indireto sobre a proteína Rb, bloqueando a atividade quinásica dos três complexos ciclina-CDKs, e assim impedindo a saída de G1. Até a etapa tardia da fase G1, a atuação das proteínas p16, p18 e p15 é muito importante, inibindo a

atividade do complexo ciclina D/CDK4-6. Além disso, p21 parece exercer um papel importante também na fase S, através da inibição da síntese de DNA, via interação PCNA, um regulador da DNA polimerase. A p53 tem inúmeras funções descritas e dentre elas, é capaz de controlar a expressão de p21, regulando a entrada da célula na fase S. Essa proteína pode ainda controlar a fase G2 através da inibição do complexo ciclina B/Cdc2 (Malumbres & Barbacid 2009).

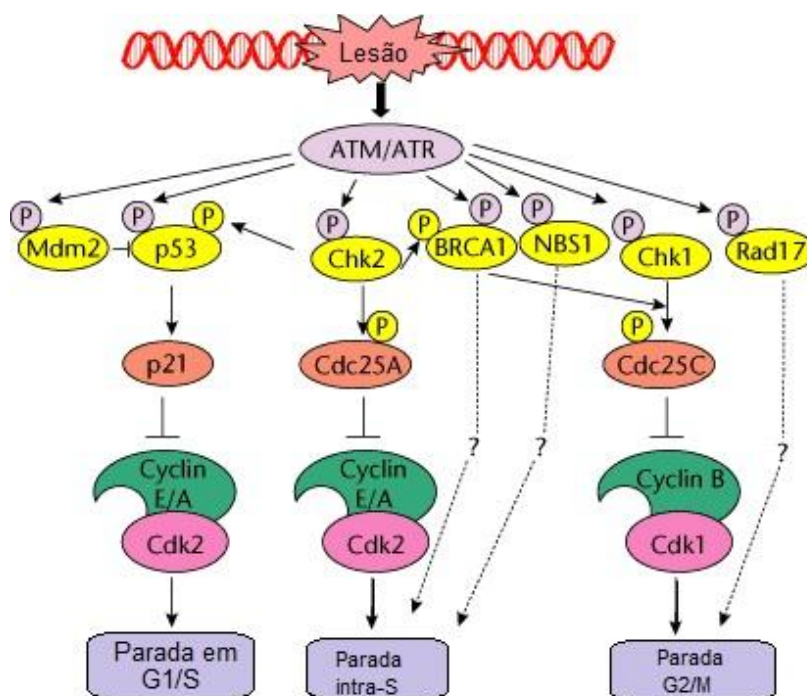
Na fase S ocorre a síntese de DNA e o complexo ciclina A-CDK2 atua anteriormente a esse processo, fosforilando componentes envolvidos no reconhecimento das origens de replicação do DNA (ORCs). Esses fatores acumulam-se durante G1, atuam em S, e são destruídos em G2 para impedir nova replicação antes da mitose. O material genético é duplicado em vários locais simultaneamente e por isso existem várias origens de replicação. Por isso, é necessária a marcação do material já replicado, através da metilação do DNA já replicado, impedindo excesso de material duplicado. Para evitar que ocorra a divisão antes que a célula esteja totalmente pronta para isto, o complexo mitótico ciclina B-Cdc2 ou Fator Promotor da Mitose (MPF) permanece inativo durante toda a fase S (Barbacid *et al.* 2005).

Na fase G2 ocorre basicamente a síntese de RNA, de proteínas e outras estruturas necessárias para o início da divisão celular. Nesta fase, inicia-se a condensação da cromatina, que facilitará as fases de metáfase e anáfase da mitose. Ainda durante a G2, ocorre a migração dos centrossomos, já duplicados, para os polos das células. Outras quinases, que não as CDKs, conduzem a duplicação e maturação dos centrossomos incluindo Aurora, Polo-like quinases e as Neks (Malumbres 2011). O MPF permanece inativo durante quase toda a fase G2, sofrendo fosforilações e desfosforilações, até que uma fosfatase específica remove alguns fosfatos, ativando o complexo e então a célula é encaminhada à mitose, cujas fases não serão detalhadas nesta tese.

### **3.2 Pontos de checagem do ciclo celular (*cell cycle checkpoints*)**

Os pontos de checagem ou etapas de controle do ciclo celular (*cell cycle checkpoints*) são vias de transdução de sinal que monitoram o ciclo celular,

identificando alterações na molécula de DNA e, no caso do material genético estar danificado, permitem um tempo adicional para a sua reparação. Esse mecanismo limita a progressão de células com danos no DNA não reparado em fases críticas do ciclo celular, tais como replicação e mitose, zelando pela correta execução dos eventos e impedindo o início de etapas subsequentes, até que a anterior esteja concluída com sucesso. Por isso, interfere no tempo de duração de cada fase do ciclo celular, interrompendo a progressão do ciclo até que seja feito o reparo e, se o dano for excessivo, até que a célula entre em apoptose. Defeitos nesses mecanismos podem levar ao aumento da instabilidade genômica e predisposição ao surgimento de tumores (Jeggo & Löbrich 2006).



**Figura 12: Representação esquemática das vias de ativação das etapas de controle/pontos de checagem do ciclo em resposta a danos ao DNA.** As quinases ATM/ATR são ativadas em resposta ao dano do DNA. Proteínas alvos envolvidos na parada do ciclo celular e reparação do DNA sinalizam a presença dos danos em resposta a fosforilação por ATM/ATR. A quinase ATM regula esses eventos principalmente em resposta a IR e formação de DSBs e a ATR é atuante após exposição das células à luz UV e em defeitos no andamento da forquilha de replicação. Figura modificada de Khanna, 2006 (Khanna *et al.* 2006).

Na maioria das células eucarióticas, existem três principais etapas de controle do ciclo celular (representadas na Figura 12). Essas etapas estão localizadas nas transições entre G1/S, S e G2/M e podem ser ativadas por danos ao DNA induzidos através de fontes endógenas, tais como perturbações na forquilha de replicação e, através de fontes exógenas, que incluem a radiação ultravioleta (UV) e ionizante (RI), contato com espécies reativas do oxigênio (EROs) e por alguns quimioterápicos e agentes poluentes. Existe ainda uma etapa de controle durante a mitose, o *checkpoint* de fuso mitótico, que monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (Yao & Dai 2012).

A etapa de controle G1/S previne a entrada na fase S em presença de danos ao DNA, através da inibição do início da replicação. O início dessa etapa de controle se dá pela ação das proteínas sensoras de dano ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM and rad3-related*) que fosforilam e ativam as moléculas efetoras Chk1 e Chk2 (*checkpoint kinase 1/2*). Paralela a via Chk1/Chk2, ocorre a ativação de outra via envolvida na parada do ciclo, através de p38 MAPK e a quinase MK2 (*MAPK activated protein kinase 2*). Ambas levam a inativação de CDKs (Reinhardt & Yaffe 2009). Quando ativas, as proteínas Chk1 e Chk2 são capazes de fosforilar a fosfatase Cdc25A, inativando-a. Outras quinases também são capazes de fosforilar a Cdc25, como a Nek11 (Sørensen *et al.* 2010). A ausência da forma ativa da fosfatase Cdc25 resulta no acúmulo da forma inativa de Cdk2, que permanece fosforilada e é incapaz de fosforilar Cdc45, para que ocorra o início da replicação. Além disso, a ativação da cascata ATM/ATR/Chk1/Chk2 leva a estabilização de p53 e o aumento subsequente na atividade de genes antiproliferativos, incluindo p21 (Canman *et al.* 1998).

Danos encontrados durante a fase S ou que escaparam a etapa de controle em G1/S, ativam o ponto de checagem em S, levando à parada do ciclo. Além do estresse genotóxico, perturbações na forquilha de replicação também podem servir como fatores para esse bloqueio. Embora existam evidências sobre o papel do sequestro de PCNA por p21 ou a ubiquitinação de PCNA, o mecanismo predominante para a parada na fase S parece ser a inibição física da forquilha de replicação.

Existem muitos estudos mostrando que tumores humanos apresentam defeitos principalmente no ponto de checagem em G1, devido a mutações no gene do supressor

tumoral p53. Comparado a esse ponto de checagem em G1, pouco se sabe sobre os genes que contribuem para a regulação em G2 e S.

O ponto de checagem em G2/M tem como função principal prevenir as células de entrarem em mitose na presença de danos ao DNA. A parada nessa fase é dependente da ativação das vias sinalizadas por ATM-Chk2-Cdc25 e/ou ATR-Chk1-Cdc25 (Su 2006). Em condições normais, a Cdc25 desfosforila a Cdc2, permitindo que essa proteína, juntamente com a ciclina B atuem na progressão da mitose. Entretanto, a fosforilação da Cdc25 por Chk1 ou Chk2 inativa essa fosfatase, prevenindo a entrada na mitose. A p53 também atua nessa etapa de checagem através da inativação de p21, que é responsável por bloquear a fosforilação de Cdc2.

### 3.3 O ciclo celular e as Neks

O papel da NIMA do fungo *A. nidulans* no controle do ciclo celular está bem caracterizado enquanto que, em mamíferos, apenas recentemente tem se falado sobre a relação entre membros dessa família de quinases com esse evento. Não existe uma proteína que atue da mesma forma que a NIMA em mamíferos, mas algumas Neks vêm se destacando pelo seu papel na regulação do ciclo e, em associação a patologias geradas por alterações na divisão celular (Salaun *et al.* 2008).

Entre todas as Nek identificadas em mamíferos, a Nek2 é a que possui função e estrutura mais próximas à Nima. Sua atividade é absolutamente necessária para a mitose e a expressão dessa quinase é dependente do ciclo, atingindo níveis máximos durante a fase G1 e S. A Nek2 fosforila C-Nap1 (Proteína Centrosomal 1 Associada a Nek2). A sua fosforilação é necessária para a separação dos centrossomos. As células humanas expressam duas isoformas dessa proteína, a Nek2A que é degradada pelo complexo promotor da anáfase (APC – *Anaphase promoting complex*) na entrada mitose; e Nek2B, que permanece estável durante toda a mitose. A proteína NIMA em *Aspergillus nidulans* tem funções estabelecidas nos pontos de checagem durante a transição G2/M, assim como pelo menos um de seus ortólogos em mamíferos, Nek2. Essa quinase fosforila a proteína reguladora da mitose Hec1, que está associada com

os cinetócoros e é crucial para a segregação correta dos cromossomos entre as células filhas (Chen *et al.* 2002).

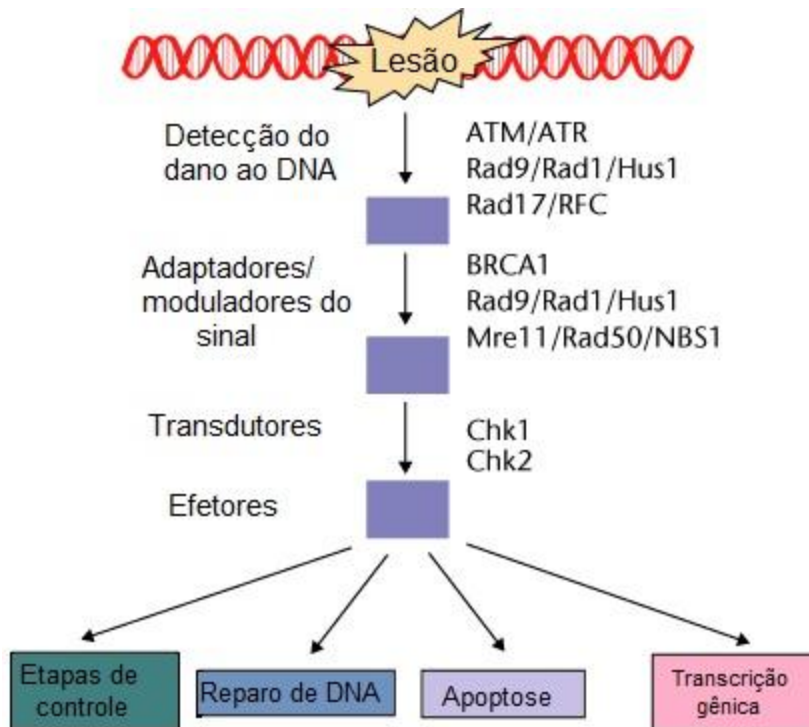
Outros membros dessa família também são atuantes durante a mitose. A Nek6 é altamente expressa durante a mitose, sendo necessária para a sua progressão pois a inibição dessa quinase provoca a parada durante a metáfase (Yin *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008). A Nek9, localizada no centrossomo mitótico, fosforila e ativa Nek6 (Belham *et al.* 2003) e a sua inativação prejudica a formação do fuso mitótico (Tan & Lee 2004).

O sequenciamento de genomas de câncer humano tem identificado mutações e alterações no padrão de expressão de genes pertencentes a família Nek, com maior prevalência destas mutações em tumores de pulmão, ovário e intestino (Moniz *et al.* 2011). Entretanto, o papel dessas quinases na formação desses tumores não ainda está estabelecida.

#### **4 O estresse genotóxico e a indução de danos ao DNA**

O estresse genotóxico é caracterizado como uma situação na qual o material genético de um organismo é atacado por fatores de origem endógena ou exógena, gerando modificações na molécula de DNA. Essas modificações podem trazer consequências desastrosas para a célula, inclusive levando a morte. A manutenção da integridade genômica é de extrema importância para qualquer organismo e o genoma das células eucariotas, por estar constantemente sofrendo ataques, necessita de mecanismos que previnam, protejam e reparem o material genético lesado (Su 2006). Muitos desses mecanismos estão ligados ao processo de divisão celular, no qual ocorre a duplicação da molécula de DNA, através de vias de sinalização que envolvem a transcrição gênica e modificações pós-transcricionais e pós-translacionais (Ljungman 2010). Falhas nesses mecanismos podem promover a transformação neoplásica e caracterizam o início do processo de formação de tumores. Dependendo da dimensão do dano, a célula pode parar seu ciclo para que a maquinaria de reparo atue ou até que inicie a via de morte programada. A célula pode ainda tolerar a lesão e continuar viva. Células deficientes em alguma via de reparo perdem a capacidade de reparar o dano e se tornam mais sensíveis a agentes genotóxicos. Como consequência, há um aumento

dos níveis de morte celular e/ou o acúmulo de danos, acarretando no desenvolvimento de patologias como o câncer, doenças degenerativas, envelhecimento celular e do organismo como um todo, além do envolvimento com malformações e doenças congênitas (Schärer 2003; Hoeijmakers 2009). A integração desses processos é conhecida como respostas a danos ao DNA (DDR – *DNA Damage Response*) e está esquematizada na Figura 13.



**Figura 13: Representação esquemática da via de resposta a danos ao DNA.** Neste modelo a lesão ao material genético é reconhecida por uma molécula sensora, que transmite o sinal para as quinases ATM/ATR. Os sinais são então transduzido pelas quinases Chk1 e Chk2 por uma série de adaptadores e moduladores de sinal. Por fim, a célula irá seguir um dos caminhos indicados nos quadros: transcrição gênica, morte celular por apoptose, ativação das etapas de controle do ciclo ou reparar o DNA. Figura modificada de Khanna, 2006 , (Khanna *et al.* 2006).

Em termos gerais, a DDR pode ser dividida em uma série de vias distintas, mas funcionalmente ligadas, que são definidos em grande parte pelo tipo de lesão de DNA por ela processada. A DDR se inicia pela detecção de danos no DNA, seguida por uma fase de acúmulo de fatores de reparo de DNA no local do dano e, finalmente, a reparação da lesão física.

#### **4.1 Danos ao DNA**

Os danos na molécula de DNA compreendem modificações químicas que podem ocorrer nas bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), na desoxirribose e na ponte fosfodiéster. Essas modificações, em geral, são provenientes da exposição solar (radiação UV) ou à radiação ionizante, da geração de EROs, através de diferentes processos metabólicos e de substâncias químicas de origem natural ou sintética. Além dos insultos genéticos causados pelo ambiente, o próprio processo de replicação do DNA durante a divisão celular é propenso a erros (Hakem 2008). A porcentagem de nucleotídeos incorretos adicionados pela DNA polimerase durante esse processo é um importante fator na determinação da taxa de mutação espontânea de um organismo. Enquanto a própria enzima é capaz de revisar, reconhecer e corrigir normalmente essas falhas, alguns erros podem passar despercebidos gerando mutações. Esse mecanismo, a primeira vista, pode parecer nocivo para o organismo, mas contribui para a variabilidade genética e para o processo evolutivo (Clancy 2008). Outros tipos de lesões sofridas pela molécula de DNA podem ser fruto do próprio metabolismo celular ou de fontes externas e existem diferentes formas de estudar essas lesões, considerando fatores como o agente causador, a região atingida e até mesmo o processo envolvido na reparação.

As modificações das bases são as alterações mais comuns encontradas na molécula de DNA e podem ser muito danosas quando não reparadas corretamente (Schärer 2003). Esse tipo de lesão é originado através de mecanismos complexos pela interação do agente com a molécula de DNA. As bases modificadas mais prevalentes são a O<sup>6</sup>-metilguanina e timina-glicol, além de oxidação, redução e perda de bases, geradas por EROs, radiação ionizante (RI) e compostos químicos. A radiação ultravioleta (UV) também ocasiona estas modificações indiretamente através da



geração de EROs e com o surgimento de produtos específicos, tais como dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e 6-4-fotoprodutos (6-4-PPs). Os CPDs geram uma distorção significativa na dupla hélice, podendo levar a parada nos processos de replicação e transcrição (Ravanat *et al.* 2001; Rastogi *et al.* 2010). Alguns agentes químicos formam ligações covalentes entre diferentes bases (adutos). Os agentes capazes de gerar adutos são compostos eletrofílicos que apresentam afinidade por centros nucleofílicos de macromoléculas orgânicas e muitas vezes são considerados carcinogênicos. Essas lesões podem ser classificadas como adutos monofuncionais, quando o agente interage com apenas um centro nucleofílico no DNA, e bifuncionais (ou multifuncionais) quando os agentes apresentam dois grupamentos reativos capazes de reagir com dois sítios no DNA. Essa reação pode ocorrer na mesma fita, sendo chamada de intracadeia (*intrastrand*) ou em fitas diferentes, recebendo o nome de intercadeia (*interstrand*), formando ligações ou pontes cruzadas conhecidas como *crosslinks* (Schärer 2005). Na classe de agentes monofuncionais se encontram os alquilantes, como o Metil-metanosulfonato (MMS) e poluentes ambientais, inclusive presentes na fumaça do cigarro. Entre os agentes bifuncionais estão compostos de importância médica, como a cisplatina, o psoraleno e a mitomicina C (Fu *et al.* 2012). Os agente alquilantes transferem um grupo alquila de uma molécula para outra, podendo interagir com diferentes moléculas biológicas e modificando sua estrutura e função. Assim, como um único agente alquilante pode causar vários tipos de lesões, os processos de reparação podem se dar por diferentes enzimas e vias com a finalidade de proteger genoma. As diferentes vias de reparo atuam coletivamente modulando a sensibilidade ao alquilantes por meio de uma sobreposição de substratos, vias de compensação, processamento de intermediários, rotas alternativas ou através da interação direta entre vias (Fu *et al.* 2012)

Os agente alquilantes bifuncionais têm a capacidade de gerar uma série de adutos de DNA, incluindo ligações cruzadas intracadeia e intercadeia (ICLs). Embora ambos tipos de lesões interfiram no metabolismo celular, os ICLs são particularmente mais citotóxicos porque impedem a separação da dupla fita, bloqueando processos essenciais como a transcrição e a replicação. Por isso, embora os ICLs representem uma pequena parcela de todos os adutos formados por esses agentes, eles acabam

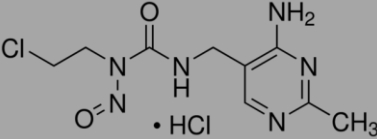
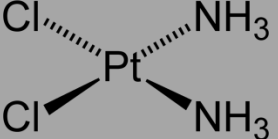
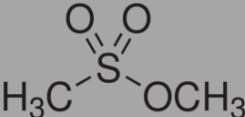
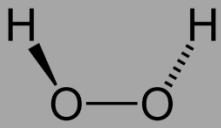
sendo fisiologicamente mais importantes e sua reparação é extremamente necessária para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular. Com base nessas propriedades, agentes como cisplatina e nitrosuréias são amplamente empregadas na terapia antitumoral (McHugh *et al.* 2001; Schärer 2005; Kelland 2007; Carrillo & Munoz 2012). No entanto, níveis significativos de resistência a estes agentes tem sido encontradas em pacientes expostos cronicamente aos quimioterápicos e em células tumorais, em grande parte devido às vias de reparo de adutos de DNA e tolerância a lesões (Siddik 2003; Galluzzi *et al.* 2012).

Danos na estrutura do DNA incluem a formação de sítios abásicos (sítios AP) e quebras simples (SSBs – *single strand breaks*) ou duplas (DSBs – *double strand breaks*) na fita. Os sítios abásicos são gerados espontaneamente, pela formação de adutos instáveis na base ou pelo reparo por excisão. As quebras podem ocorrer através do ataque de agentes químicos ou físicos diretamente à ponte fosfodiéster, pelo bloqueio no processo de replicação ou pela ação de enzimas específicas com funções de reparação ou que atuam no metabolismo geral do DNA (Schärer 2003). As quebras simples são consideradas menos tóxicas para as células e milhares de SSBs são geradas por dia em células de mamíferos como resultado das atividades metabólicas ou da reparação do DNA (Caldecott 2001). Uma das fontes mais comuns de SSBs é o ataque oxidativo por EROs endógenos. No caso de radicais livres gerados a partir do peróxido de hidrogênio, um importante gerador de EROs, as SSBs podem ocorrer em até três ordens de grandeza em relação as DSBs (Caldecott 2008). As SSBs podem ainda ser geradas durante a ação da enzima topoisomerase durante a transcrição e replicação. Essas lesões intermediárias são, normalmente, transitórias e rapidamente resolvidas pela própria enzima. A baixa toxicidade das SSBs se deve pela rápida reparação desses danos. A deficiência no reparo desse tipo de lesão pode levar a ocorrência de patologias, como a ataxia espinocerebelar e outros processos neurodegenerativos (el-Khamisy & Caldecott 2007; Caldecott 2008). As lesões do tipo DSBs são consideradas mais tóxicas para a célula e quando não reparadas corretamente podem originar mutações e rearranjos cromossômicos, características da instabilidade genética, podendo acarretar na perda de cromossomos e na morte celular

(Kaina 2003; Dudás & Chovanec 2004). Além disso, as DSBs podem surgir como intermediários nos processos de reparo de outras lesões.

Neste trabalho foram utilizados os agentes indutores de danos ao DNA Cisplatina, MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Nimustina (ACNU). Na tabela 2 estão descritas as principais características desses agentes.

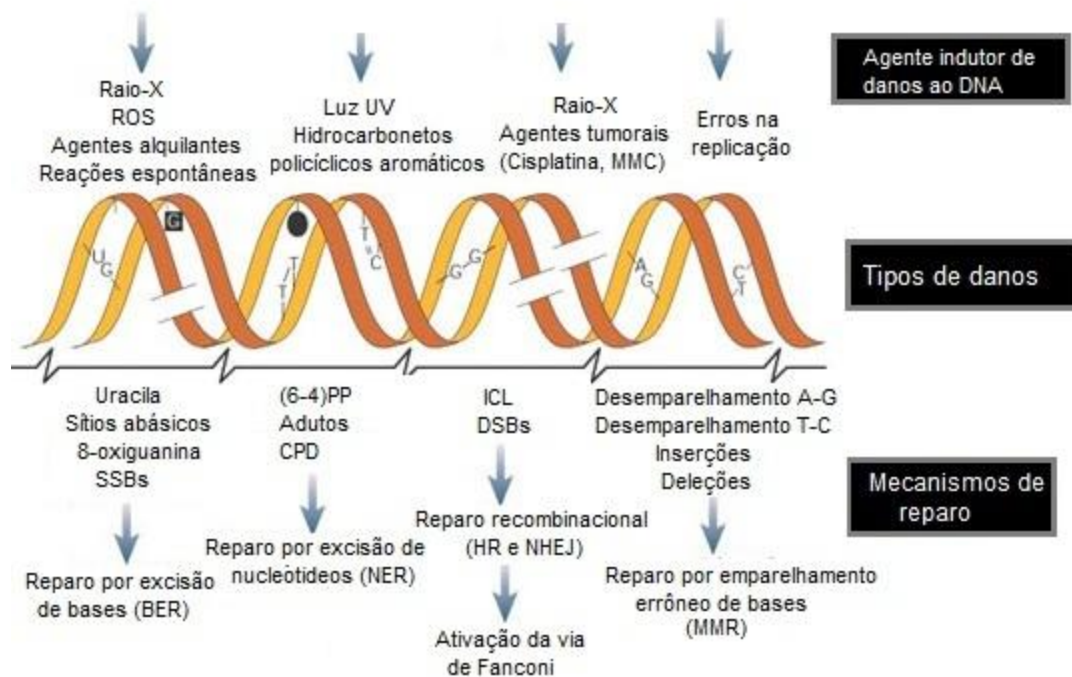
**Tabela 2: Descrição dos agentes indutores de danos ao DNA utilizados neste trabalho.**

Agente indutor de danos	Descrição	Referência
<p><b>ACNU (Nimustine)</b> N'-[4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea hydrochloride</p>  <p><chem>Cc1nc(N)nc(CCN(C(=O)N(N=O)CCl)C1)N</chem></p> <p><math>C_9H_{13}ClN_6O_2</math></p>	<p>Quimioterápico cloroalquilante que ataca o DNA formando primeiramente lesões do tipo O<sup>6</sup>-cloroetilguanina, que posteriormente são revertidas em ICLs. Utilizado no tratamento de gliomas, melanomas e linfomas.</p>	<p>(Kanamaru <i>et al.</i> 1980; He <i>et al.</i> 1990)</p>
<p><b>Cisplatina</b> cis-Diammineplatinum(II) dichloride</p>  <p><chem>ClPt(N)(Cl)N</chem></p> <p><math>Pt(NH_3)_2Cl_2</math></p>	<p>Quimioterápico bifuncional que ataca a molécula de DNA preferencialmente na região 7N das bases purinas, formando adutos do tipo ligação cruzada. Causa o bloqueio da replicação e da transcrição gênica, podendo induzir parada do ciclo celular e morte celular por apoptose.</p>	<p>(Loehrer &amp; Einhorn 1984; Woźniak &amp; Błasiak 2002)</p>
<p><b>MMS</b> Methyl methanesulfonate</p>  <p><chem>COS(=O)(=O)C</chem></p> <p><math>CH_3SO_3CH_3</math></p>	<p>Agente alquilante monofuncional que metila o DNA em N7-Desoxiguanina e N3-deoxiadenine, causando o pareamento incorreto dessas bases e o bloqueio da replicação. Além de modificações nas bases, também causa quebras na fita de DNA. É considerado um agente radiomimético, pois exerce um efeito semelhante à radiação ionizante.</p>	<p>(Beranek 1990; Krogh &amp; Symington 2004)</p>
<p><b>Peróxido de hidrogênio</b></p>  <p><chem>OO</chem></p> <p><math>H_2O_2</math></p>	<p>Atua como uma espécie reativa do oxigênio atacando diferentes moléculas orgânicas. O ataque oxidativo pode resultar em sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP) no DNA e, também, em quebras simples e duplas.</p>	<p>(Barnes &amp; Lindahl 2004)</p>

## 4.2 Processos de Reparação do DNA

A reparação do DNA é um processo bioquimicamente complexo, o qual emprega inúmeras proteínas com funções distintas. Os mecanismos de reparação celular envolvem muitas etapas e são capazes de remover rapidamente os mais variados tipos de lesões da molécula de DNA de acordo com a sua natureza ou extensão. A resposta ao dano é mediada pela ativação de vias de sinalização celular, envolvendo diversas moléculas sinalizadoras, efetoras e também pela ativação da transcrição gênica. Nos eucariotos, principalmente, existe uma sobreposição funcional entre as diferentes vias de reparação, de forma que vários complexos atuam ao mesmo tempo em diferentes tipos de danos (Schärer 2003). A redundância e a interconexão de vias garantem não apenas uma agilidade maior da resolução das lesões como a manutenção da integridade genômica do organismos mesmo em situações nas quais uma via se encontra comprometida (Tell & Wilson 2010).

Assim como ocorrem diferentes tipos de danos ao DNA e estes são agrupados de distintas formas, existem diferentes vias de reparação, estabelecidas de acordo com o tipo de lesão na qual atuam. Algumas lesões podem ser removidas por reversão simples, como é o caso da reparação direta por enzimas. Outro grupo de injúrias como distorções na hélice, modificações e emparelhamento errôneos de bases podem ser reparadas por mecanismos que envolvem excisão da fita de DNA, como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER – *nucleotide excision repair*), o reparo por excisão de bases (BER – *base excision repair*) e o reparo do emparelhamento errôneo de bases (MMR – *mismatch repair*). Danos do tipo quebras no DNA (simples e dupla) são normalmente reparado por recombinação homóloga (HR – *homologous recombination*) ou não homólogas (NHEJ – *non-homologous end joining*) (Moraes *et al.* 2012). Outros tipos de lesões, como as ligações cruzadas intercadeia, necessitam o envolvimento de vias de reparo distintas, incluindo NER, HR e síntese translesão, além da ativação das proteína da via de Fanconi (McCabe *et al.* 2009). Na figura 14 está demonstrado um esquema relacionando tipos de lesões e vias de reparo responsáveis pela resolução dessas e que serão descritas com mais detalhes a seguir.



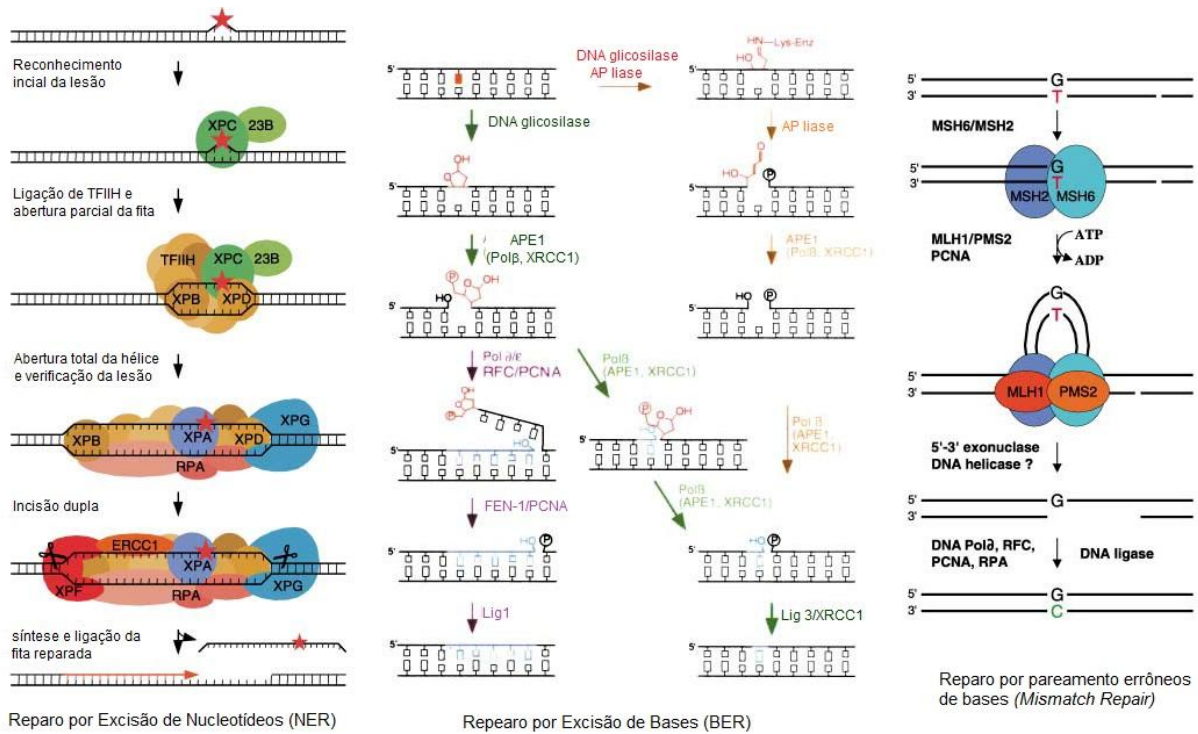
**Figura 14: Representação esquemática dos mecanismos de reparo existentes em relação às lesões causadas ao DNA e os principais agentes indutores.** A figura ilustra os tipos de danos ao DNA mais comuns gerados por diferentes agentes e seus respectivos mecanismos de reparo. Entretanto, sabe-se que o processo envolvido desde o reconhecimento da lesão até a sua reparação abrange mecanismos complexos e, inclusive, com integração de diferentes vias, não sendo possível representar toda a complexidade desse sistema no esquema acima. Figura modificada de Hoeijmakers 2001, (Hoeijmakers 2001).

O primeiro grupo de mecanismos de reparo é representado pelos processos de reparação direta, na qual uma enzima reconhece e reverte a lesão. Esse grupo abrange a fotorreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família de fotoliasas/criptocromos, que são responsáveis pelo reparo direto de lesões causadas pela UV, como os dímeros de pirimidina e 6-4PPs (Thompson & Sancar 2002); e a reversão de bases alquiladas, catalisadas por enzimas DNA-metiltransferases, como a DNA metilguanina metiltransferase (MGMT) (Christmann *et al.* 2003). As fotoliasas são enzimas conservadas nos três domínios de classificação dos organismos vivos, mas

não estão presentes em todas as espécies, incluindo humanos, diferentemente da MGMT, cuja distribuição é quase universal na natureza. Os mamíferos placentários, embora não apresentem fotolases, possuem duas proteínas com semelhança de sequência e estrutura, mas sem função de reparo. Estas proteínas são denominadas de criptocromos e funcionam como fotorreceptores para regular o ciclo circadiano nesses animais (Rastogi *et al.* 2010). A enzima fotoliase liga-se especificamente as lesões CPDs ou 6-4PPs e diretamente monomeriza o anel ciclobutano da pirimidina, utilizando a energia da luz visível e, por isso, protege o genoma dos efeitos deletérios da radiação UV (Essen & Klar 2006). A enzima MGMT possui um papel crucial no metabolismo de agentes alquilantes, sendo responsável por resolver lesões no DNA intermediárias do metabolismo desses agentes (Kaina *et al.* 2007). Muitos alquilantes são utilizados como quimioterápicos para o tratamento de diferentes tipos de câncer e a atividade e a expressão alterada de MGMT, em tumores, tem sido associada à resistência a essas drogas (Kawai *et al.* 2006; Johannessen & Bjerkvig 2012).

O segundo grupo abrange os mecanismos de reparo baseados no processo de excisão da fita como o reparo por excisão de nucleotídeos, que atua no reconhecimento e na remoção de lesões que provocam distorções na hélice (Rouillon & White 2011). Dentro desse grupo, existe ainda o reparo por excisão de bases, que remove bases alteradas; e o reparo do emparelhamento errôneo de bases, que age monitorado e removendo bases pareadas defeituosamente. Essas vias estão esquematicamente representadas na Figura 15.

O reparo por excisão de nucleotídeos é uma via bastante versátil, capaz de atuar em diferentes tipos de dano ao DNA (Hanawalt 2003). Mais de 30 proteínas, dentre elas às pertencentes ao grupo XP, atuam nessa via que ocorre basicamente através de cinco etapas. Primeiramente, ocorre o reconhecimento da lesão na fita dupla de DNA, que será desenrolada e aberta para a ação de nucleases, que removem a região danificada. O próximo passo é a síntese do novo DNA, utilizando como molde a fita não danificada. O reparo é finalizado pela ação de DNA ligases, que restauram a configuração da fita lesada (De Boer *et al.*, 2000).



**Figura 15: Representação esquemática das vias de reparo por excisão.**

(A) O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) se inicia pelo reconhecimento da lesão pelo XPC/hHR23B, que causa uma distorção na dupla hélice (estrela vermelha). XPC/hHR23B recruta TFIIH à lesão e o complexo TFIIH, XPB, e XPD causa a abertura parcial do DNA em torno da lesão. TFIIH recruta XPG e XPA/RPA, formando uma bolha de cerca de 25 pares de bases. XPA e RPA verificam os danos e garantem o bom posicionamento das endonucleases e XPG e ERCC1/XPF. XPG faz a incisão 3' e ERCC1/XPF faz a 5' liberando os nucleotídeos da região danificada. A maquinaria de replicação preenche a lacuna e a DNA ligase I veda as fendas. (B) O reparo por excisão de bases (BER) se inicia pela excisão de bases danificadas gerando sítios abásicos. A APE1 hidrolisa a ligação do fosfato 5' no sítio abásico. A pol-β introduz os nucleotídeos e, em seguida, extirpa o sítio abásico, em virtude da sua actividade liase AP. A DNA ligase III finalmente sela o as fendas e restaura a seqüência de DNA original. BER pode ser iniciada por uma glicosilase bifuncional, com atividade AP-liase. Nesse caso, após excisão da base, a AP liase hidrolisa a ligação 3' do sítio abásico. APE1, pol-β e a DNA ligase III concluem a reparação. (C) O reparo por

emparelhamento errôneo de bases se dá por uma incompatibilidade de base/base resultante de defeitos da replicação e é reconhecido pelo heterodímero MSH6-MSH2 (MutSa). O ATP impulsiona o encadeamento bidirecional de DNA através MutSa. O recrutamento de MLH1/PMS2 (MutLa) e PCNA conduz à formação de uma estrutura em alça com as proteínas MMR na base. Exonucleases e helicases são então recrutadas para degradar a fita contendo o erro. A maquinaria de replicação termina a reação e uma DNA-ligase I e veda a fenda. Ilustração modificada de Scharer 2003 (Schärer 2003).

---

A via NER é dividida em Reparo do Genoma Global (GGR – *Global Genomic Repair*), que remove lesões presentes em regiões não transcritas do genoma, e o Reparo Acoplado à Transcrição (TCR – *Transcription Coupled Repair*), que atua em regiões lesadas do DNA que possuem genes ativos transcricionalmente. A principal diferença entre essas vias ocorre no processo de reconhecimento da lesão. Na via GGR, o reconhecimento da lesão é feito pelo complexo XPC-hHR23B, aliado à ação da XPE-DDB2. Na via TCR, esse reconhecimento é feito através do bloqueio da RNA polimerase II ao encontrar a lesão, e pela ação das proteínas CSA e CSB, que parecem atuar reconhecendo a distorção na molécula de DNA e dissociando a RNAPol II da região do dano para em seguida recrutar outras moléculas da via NER. Após essa etapa inicial, ocorre o recrutamento de outras proteínas para o local do dano, entre elas a XPA, XPG, TFIIH e RPA, que formam o complexo pré-incisão. As proteínas XPD e XPB também se unem a esse complexo, atuando como helicases na abertura das fitas. A próxima etapa envolve a excisão das fitas pelas endonucleases ERCC1-XPF (direção 5'- 3') e XPG (3'- 5'). A síntese do DNA excisado utilizando a outra fita como molde ocorre em seguida e depende da atividade de RPA, RFC, PCNA e das DNA polimerases  $\delta$  e  $\epsilon$  e a ligação das fitas pela ação da DNA ligase I (Vermeulen 2011).

O reparo por excisão de bases é iniciado por uma glicosilase que remove a base modificada formando um sítio abásico no DNA ( AP - apurínicos/apirimídicos). Esses sítios também podem ser produtos diretos do dano. As glicosilases são específicas para o reconhecimento de bases oxidadas ou reduzidas, alquiladas (geralmente pelo grupo metila), bases desaminadas, pareadas erroneamente ou ausentes. Essas



enzimas podem ser monofuncionais e remover apenas uma base modificada, deixando um sítio AP ou podem ser bifuncionais, possuindo a atividade liase, além da ação glicosilase. Após a remoção da base, uma enzima AP endonuclease reconhece essa região e cliva a cadeia em locais adjacentes à base perdida. Uma DNA-polimerase é recrutada para preencher a região clivada, de acordo com a informação fornecida pela fita complementar não-danificada. Finalmente, a integridade da fita corrigida é restaurada por uma DNA-ligase (Slupphaug *et al.* 2003; Robertson *et al.* 2009).

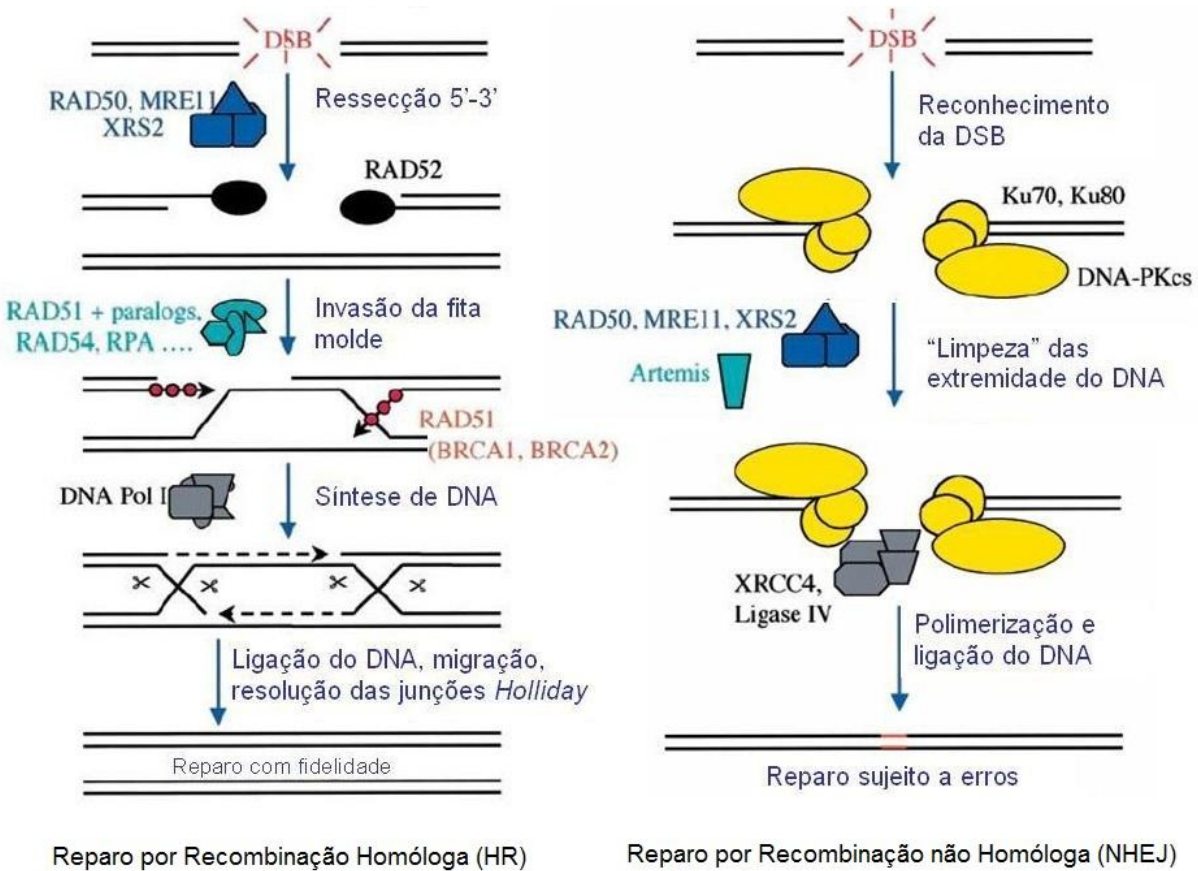
O reparo do emparelhamento errôneo de bases (MMR) corrige bases mal-pareadas eventualmente introduzidas por erros de replicação do DNA. Tanto as vias de reparação direta quanto a de excisão são essenciais para a remoção de bases modificadas e adutos formados por agentes alquilantes, de forma que respondem por grande parte da atividade de reparação do DNA na célula (Huang *et al.* 1994; Reardon *et al.* 1997; Memisoglu & Samson 2000).

O último grupo de vias de reparo é composto por mecanismos recombinacionais e atua na resolução de quebras na fita de DNA, sendo representado pelo reparo por recombinação homóloga e o reparo por recombinação não homóloga ou por junção das extremidades não-homólogas. Ambos os mecanismos são importantes para todos os eucariotos e podem ter funções sobrepostas. A escolha sobre qual via irá atuar está relacionada com o tipo de dano e com o a fase do ciclo celular na qual a célula se encontra. Essas vias estão esquematizadas na figura 16.

Na HR, a molécula de DNA da cromátide irmã intacta é utilizada como molde para reparar com fidelidade as DSBs que se formam nas células mitóticas, em consequência do colapso da forquilha de replicação de DNA, ou resultante de mecanismos de reparação de bases modificadas ou adutos (Krogh & Symington 2004). A HR também é necessária para a manutenção dos telômeros e na meiose, sendo essencial para o estabelecimento da conexão física entre cromossomos homólogos, assegurando a disjunção correta dos mesmos na primeira divisão meiótica. Adicionalmente, contribui para a geração de diversidade genética observada nos gametas, através da alta frequência de recombinação meiótica nessas células (Krogh & Symington 2004). A via HR atua preferencialmente nas fases S e G2 do ciclo, quando uma fita molde está disponível, no entanto, a via NHEJ é atuante em todas as fases do

ciclo, principalmente em G1, quando a cromátide irmã não está disponível para HR (Hakem 2008).

A primeira etapa do reparo por HR ocorre pelo reconhecimento da lesão, provavelmente pela proteína sensora de danos ATM e pelo complexo Rad50/Mre11/Nbs1. Há o recrutamento de moléculas para o local da lesão e a ATM fosforila a histona H2AX e outros substratos incluindo a Mdc1, Nbs1, p53, Chk2 e a quinase DNA-PK. Proteínas envolvidas nas etapas de controle do ciclo celular são ativadas gerando a parada no ciclo. A próxima etapa envolve o processamento da extremidade 3' pela ressecção de alguns nucleotídeos da fita na direção 5' – 3', promovida pelo complexo protéico Rad50/Mre11/Nbs1. Ocorre a formação de extremidades livres invasivas, que serão usadas na procura de uma molécula homóloga molde. Uma vez que as extremidades de fita simples 3' estejam disponíveis, a proteína Rad51 liga-se a estas e inicia-se o evento de invasão a uma fita homóloga, mediada por Rad54 e RPA, as quais são responsáveis pela eliminação de estruturas secundárias na região terminal 3'. Uma DNA-polimerase adiciona nucleotídeos, com base nas informações da fita intacta, à região 3' terminal da fita danificada. Após a extensão, as extremidades livres são novamente reunidas pela DNA-ligase I. Entretanto, esse processo gera junções, chamadas de *Holliday junction* que necessitam ser clivadas para o reparo completo (Jackson 2002; Schärer 2003; Krogh & Symington 2004). A resolução das junções *Holliday* é realizada pelas endonucleases Mus81 e Mms4, que clivam essas regiões e posteriormente ocorre a ligação das fitas para a restauração completa da molécula de DNA (Heyer 2004). O resultado final da resolução dessas junções pode ser ou não a permuta de fitas (*crossover*), especialmente durante o processo de recombinação meiótica (Krogh & Symington 2004). As proteínas BRCA1 e BRCA2 também atuam em HR, mas o papel dessas proteínas ainda é discutido. Em resposta as DSBs, a BRCA1 é ativada através da fosforilação por ATM, ATR e Chk2 e atua sobre outras proteínas de reparo. BRCA2 se liga a Rad51, possivelmente auxiliando na atividade dessa proteína (Lomonosov *et al.* 2003).



**Figura 16: Representação esquemática das vias de reparo de DSBs por recombinação homóloga e não homóloga em eucariotos superiores.**

Na recombinação homóloga a lesão é reconhecida e a extremidade 3' sofre ressecção pelo complexo Rad50/Mre11/XRS2. Ocorre então o pareamento com uma molécula de DNA homóloga que é invadida pela ação da Rad51, que interage com a BRCA1 e 2. O próximo passo é a síntese e a ligação do DNA ocorrendo a formação de junções *Holliday*, que serão resolvidas através da ação de Mus81. A recombinação não homóloga inicia pelo reconhecimento das extremidades pelas proteínas Kus, que se ligam a elas e recrutam as quinases DNA-PKs. Em seguida, a Xrcc4, juntamente com a DNA-ligase IV, se reúne ao complexo proteína-DNA e a Xrcc4 é fosforilada pelas DNA-PKs. Então a DNA-ligase IV promove a religação entre as extremidades do DNA livre. O complexo Mre11/Rad50/Nbs1 pode atuar no processamento após a ligação.

Figura adaptada de (Jackson 2002).

A recombinação não homóloga, em contraste com a HR, não necessita de um molde homólogo e parece ser a via predominante para o reparo de DSBs em mamíferos (Schärer 2003). Além de atuar no reparo de DSBs, essa via é importante para o mecanismo de recombinação V(D)J em linfócitos, contribuindo no aumento de variabilidade do sistema imune.

A NHEJ é iniciada pelo heterodímero Ku70/Ku80, que seletivamente se liga à extremidade do DNA e recruta a proteína quinase DNA-PK. Essa proteína é capaz de fosforilar a si mesma e a outros substratos, incluindo Ku70/Ku80, Xrcc4 e p53. O heterodímero Ku70/Ku80 protege as extremidades do DNA contra a degradação e sinaliza a região de dano para os demais componentes da via (Milne *et al.* 1996; Siede *et al.* 1996). A ligação entre as duas extremidades do DNA requer a presença dos complexos Rad50/Mre11/Nbs1 e Xrcc4/DNA-ligase IV e, conseqüentemente, ambos podem interagir com o complexo Ku70/ku80. O reparo é finalizado pelo processamento da fita e pela ligação das extremidades, através da ação das proteínas Flap endonuclease 1, Artemis, Xrcc4 e a DNA ligase IV (Jackson 2002).

Existe ainda uma via adjacente responsável pelo reparo de lesões do tipo ligações cruzadas intercadeia, os ICLs, que envolve a combinação de diferentes mecanismos de reparo (NER, HR e síntese translesão) e a ativação de membros da via de Fanconi (Muniandy *et al.* 2010; Deans & West 2011). O mecanismo de atuação dessas vias no reparo de ICLs está ilustrado na figura 17. Inúmeros estudos apontam a fase S como momento crucial do reparo dessas lesões (Pichierri & Rosselli 2004a). É na fase S que ocorre a replicação do DNA e, a passagem da maquinaria de replicação pelo local da lesão, parece ser o mecanismo inicial de reconhecimento dos ICLs (Akkari *et al.* 2001). Esse evento gera um sítio de alta instabilidade genética, levando a formação de DSBs através de um processo que não está bem definido. Ocorre a excisão das fitas pela ação das enzimas XPF/Ercc1 e, possivelmente, outras nucleases podem atuar nessa etapa, como a Mus81-Eme1. Após a etapa de reconhecimento e incisão, ocorre a formação de DSBs, que podem ser reparadas por diferentes processos, envolvendo reparo por recombinação ou a síntese translesão. O recrutamento dessas vias parece ser dependente da atuação de componentes da via de Fanconi (Crossan & Patel 2012), que são ativados paralelamente, e existem

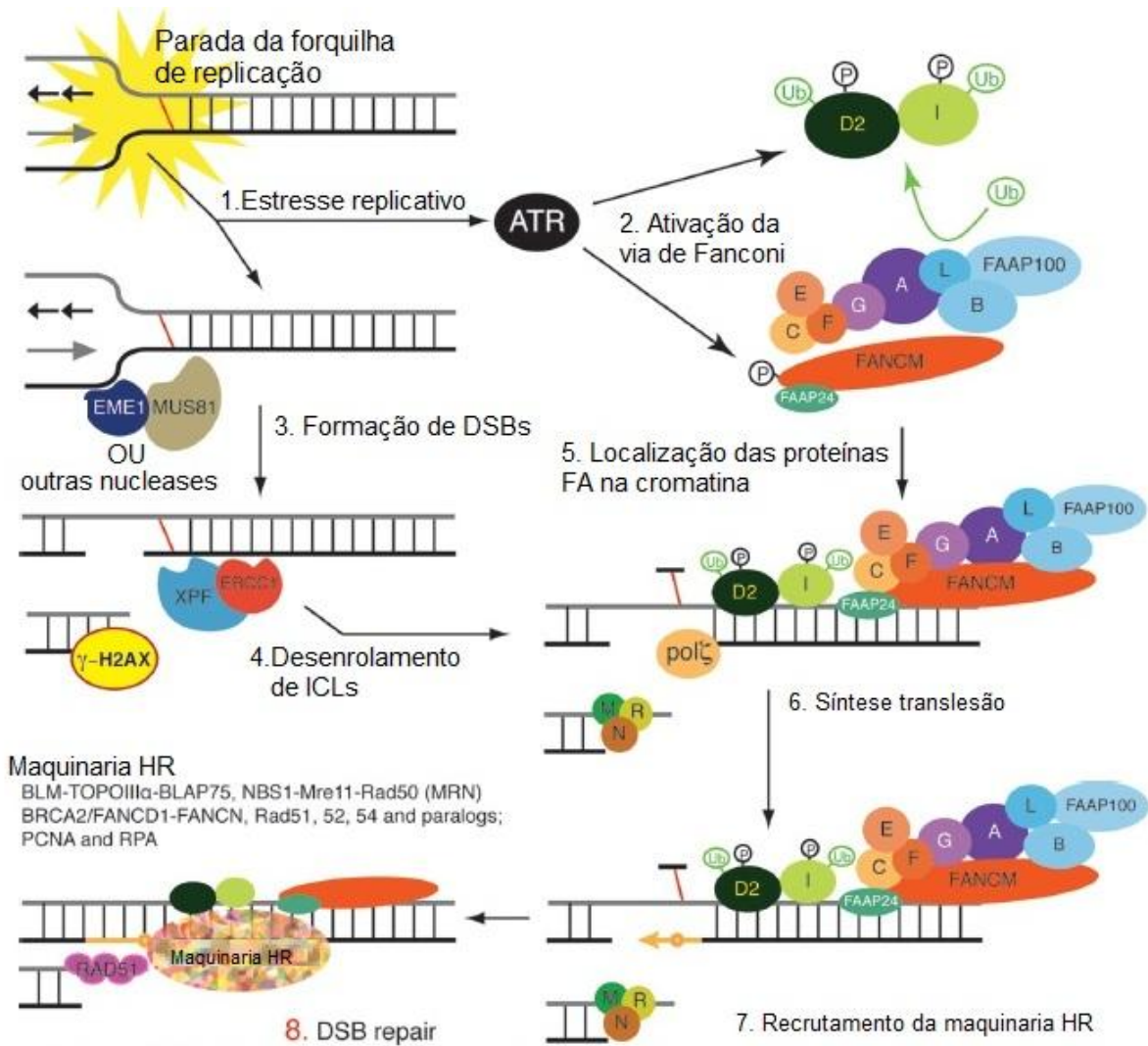
evidências sobre o papel do complexo MRN durante esse evento (Nakanishi *et al.* 2002). Adicionalmente, a proteína FANCC parece auxiliar na montagem correta do complexo MRN por interação com a proteína Mre11 (Pichierri *et al.* 2002).

A via de Fanconi é composta por diversas proteínas e pode ser dividida em três complexos. O primeiro grupo é formado por oito proteínas, FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM, sendo todas subunidades do complexo chamado núcleo de Fanconi (*FA core*). As proteínas do núcleo de Fanconi interagem entre si e esta interação é necessária para manutenção da estabilidade deste complexo (Garcia-Higuera *et al.* 2000; Pace *et al.* 2002; Meetei *et al.* 2004). As proteínas FANCA, FANCE, FANCG e FANCM são fosforiladas em resposta a dano no DNA e esta fosforilação é dependente de ATR (Matsuoka *et al.* 2007; Smogorzewska *et al.* 2007). Uma das principais funções deste complexo é monoubiquitinar as proteínas do segundo complexo, FANCD2 e FANCI, sendo este o passo principal da via de Fanconi (Kennedy & D'Andrea 2005). O segundo grupo é representado pelas proteínas FANCD2 e FANCI, as quais interagem entre si para formar o complexo FA-ID. Além disso, elas são ubiquitinadas em resposta a danos no DNA e desubiquitinadas pela mesma enzima USP1 (protease ubiquitina específica 1). Quando as células são expostas a um agente indutor de danos ao DNA, FANCD2 e FANCI fosforiladas e monoubiquitinadas são redistribuídas na cromatina e no núcleo, próximo a locais do dano (Sims *et al.* 2007). Acredita-se que a proteína FANCD2 ubiquitinada atue no recrutamento de outras proteínas envolvidas em processos de reparação de DNA para o local da lesão (Garcia-Higuera *et al.* 2001; Bogliolo *et al.* 2007). Entre as proteínas de reparo que são recrutadas após a ubiquitinação de FANCD2, estão RAD51, NBS1 e RPA, envolvidas em mecanismos de recombinação homóloga, e REV1, envolvida em mecanismos de síntese translesão (Wang & D'Andrea 2004).

O terceiro grupo é formado pelas proteínas FANCD1 (BRCA2), FANCN (PALB2) e FANCI (BRIP1). Após o processamento dos ICLs por nucleases, ocorre a formação de DSBs no DNA. As proteínas FANCD1 e FANCN parecem atuar no processo de recombinação homóloga em função da sua interação com a proteína RAD51, induzindo a formação de oligômeros de RAD51 sobre a fita simples de DNA, sendo essa uma etapa essencial para HR (Pellegrini *et al.* 2002). Entretanto, o mecanismo exato do

envolvimento destas proteínas neste passo subsequente à resolução das pontes intercadeias, ainda não é conhecido, assim como, a relação entre os membros deste terceiro grupo e as proteínas FANCD2 e FANCI.

Além dos mecanismos de reparo mencionados acima, existe uma via de tolerância a danos chamada de síntese translesão (TLS – *translesion synthesis*), na qual ocorre um desvio das lesões que não são reparadas, permitindo o processo de replicação. Durante a divisão celular, a replicação do DNA genômico é realizada por DNA polimerases de alta fidelidade, mas que possuem a limitação de não replicar locais onde a fita se encontra lesada. Polimerases especializadas pertencentes a via de síntese translesão são capazes de sintetizar o DNA nessas regiões, impedindo a parada e o colapso da forquilha de replicação e prevenindo a instabilidade cromossômica (Knobel & Marti 2011).



**Figura 17: Modelo de reparo de ICLs envolvendo as vias de reparo NER, HR, TLS e ativação da via de Fanconi.**

Ilustração modificada de Bhagwat, 2009 (Bhagwat *et al.* 2009)

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo Geral:**

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar o envolvimento da quinase humana Nek1 nas vias de respostas induzidas por danos ao DNA, principalmente gerados por agentes alquilantes, indutores de lesões do tipo ligações cruzadas intercadeia de DNA (ICLs), buscando localizar a Nek1 nas vias de sinalização conhecidas e identificar proteínas que interagem com essa quinase .

### **1.2 Objetivos Específicos:**

1. Avaliar o efeito do silenciamento da Nek1 no reparo de células expostas a diferentes indutores de dano ao DNA;
2. Buscar entender o papel da Nek1 no reparo de ICLs, avaliando a interferência dessa quinase na velocidade de reparo e na sinalização desse dano;
3. Verificar a influência da Nek1 em etapas de controle do ciclo celular após a indução de danos ao DNA, buscando entender o seu papel na regulação da progressão ciclo;
4. Analisar o efeito da ausência da Nek1 em vias conhecidas de sinalização de dano e reparo do tipo ICLs;
5. Buscar possíveis moléculas que interagem com a Nek1 em situação fisiológica e de estresses genotóxico, a fim de elucidar o papel e a localização dessa quinase nas vias de reparo de DNA;



### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Cultivo Celular

Células de epitélio renal humano, Hek293t, selvagens e silenciadas por RNAi foram cultivadas em condições padrões em DMEM *high* glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco™), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e com os antibióticos penicilina/estreptomicina e fungizona (Gibco). As células de glioma humano U87 foram mantidas nas mesmas condições em meio DMEM *low* glicose. Ambas as linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e foram colhidas por tratamento com tripsina (Gibco) 0,15% e EDTA 0,08%. Ambas linhagens foram obtidas originalmente da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA).

#### 2. Obtenção das linhagens silenciadas

As linhagens silenciadas foram obtidas pela transdução de vetores lentivirais contendo a sequência de shRNAi específica para Nek1. Os vetores lentivirais foram produzidos pela co-transfecção do plasmídeo de pLL3.7 GFP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA); contendo a sequência específica para a Nek1 humana (G[2127]CGAGAAATACTTCGTAGA; iniciador A[1]TG), juntamente com os vetores auxiliares de empacotamento viral CMV-VSVG, RSV-REV e pMDLg/pRRE em células HEK293t com o reagente de transfecção Superfect (Qiagen). Após 48 h, o sobrenadante foi coletado e filtrado através de uma membrana de 45 µm e adicionado a culturas de células U87 e Hek293t com 50% de confluência na presença de 8 µg/ml de polibreno (Lopez *et al.* 2012). A seleção de células expressando GFP foi realizada por plaqueamento em baixa densidade e seleção de colônias GFP positivas. A confirmação do silenciamento foi realizada através de RT-PCR e *Western-Blot*.

#### 3. Agentes genotóxicos

O metil-metanosulfonato (MMS), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a cisplatina (*cis*-Diammineplatinum(II) dichloride) e o ACNU (Nimustine hydrochloride ou N'-[(4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea hydrochloride)

foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). A cisplatina fora diluída em PBS concentrado 10x e mantido sob refrigeração até o momento do uso. O ACNU é diluído em água apenas no momento do uso.

#### 4. Contagem de células

Para cada tipo de ensaio, as células foram contadas e plaqueadas de acordo com a demanda específica para o ensaio. Para isso, foi utilizado a técnica de contagem em câmara de Neubauer, que consiste no seguinte procedimento: as células são coletadas dos frascos de cultura com tripsina e neutralizadas com meio completo, diluídas e colocadas sobre a Câmara de Neubauer. Contam-se os 4 quadrantes das extremidades (em aumento de 10x na objetiva do microscópio óptico) e faz-se a média, sendo que apenas as células que estavam em cima das linhas mais fortes são consideradas. Quando a diferença é superior a 10 células entre os quadrantes, a contagem é repetida. Multiplica-se a média encontrada pelo volume usado na diluição e divide-se por 0,1, encontrando assim a quantidade de células total no volume utilizado.

#### 5. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram realizados de acordo com os ensaios. As concentrações e tempos dos agentes utilizados estão indicados nas legendas e figuras na sessão de resultados. Basicamente, as concentrações utilizadas nos ensaios estão listadas na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3: Tratamentos indutores de danos ao DNA utilizados para os diferentes ensaios com as linhagens silenciadas para Nek1 e selvagem.**

Ensaio	Agente	Concentração	Tempo de ação	Tempo de Recuperação
Ensaio cometa	Cisplatina	2.5 - 5 - 10 µg/ml	1h	0h até 24h
	MMS	200 - 400 - 800 µM	2h	0h até 12h
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 - 50 - 100 µM	0,5h	0h até 4h
<i>Western Blot</i>	Cisplatina	7.5 - 15 µM	10' até 12h	-
HCR	Cisplatina	0 a 500 nM	24h	48h
	ACNU	0 a 300 µM	24h	72h
Ciclo celular	Cisplatina	5 µg/ml (16 µM)	24 e 48 h	-
	MMS	400 µM	24 e 48 h	-
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µM	24 e 48 h	-

## 6. Preparo das células e Eletroforese

As células previamente tratadas foram lavadas com PBS e lisadas em tampão contendo 50 mM de Tris pH 7.5, 20 mM de NaCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, Benzonase (Novagen) coquetel inibidor de protease (Calbiochem) por 10 minutos a 4° C. Então o lisado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e utilizado para aferição da concentração proteica através do método de Bradford. Para a corrida eletroforética foi adicionada ao lisado o tampão de amostra contendo 250 mM de Tris-HCl pH 6.8, 1% de SDS, 0.25% de azul de bromofenol, 50% de glicerol e 2% de β-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 95° C por 5 minutos e aplicadas no gel SDS-PAGE (variando a concentração de acrilamida entre 6% até 12%, de acordo com o peso molecular da proteína de estudo). A eletroforese foi realizada em cubas verticais contendo tampão de corrida (25 mM Tris, 0,25 M de glicina e 0,1% de SDS), utilizando 120 V.

## 7. Ensaio de Imunodeteção

As proteínas separadas pela eletroforese foram transferidas em aparato de transferência *semi-dry* para uma membrana de nitrocelulose, sob 140 mA por um período de até 2h, em tampão contendo 20% de metanol, para o ensaio de imunodeteção. Após a transferência, a membrana foi corada com corante *Ponceau rouge* e posteriormente descorada em tampão salino, para bloqueio com proteínas do leite. Após o bloqueio, procedeu-se a incubação com anticorpo primário de interesse, diluído em tampão salino com Tween-20 e leite. Geralmente essa incubação é feita overnight a 4° C sob leve agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada e procedeu-se a segunda incubação com o anticorpo conjugado à peroxidase, por no mínimo 2 h sob refrigeração e agitação. Passado o tempo de incubação, a membrana foi lavada com tampão salino e em seguida, procedeu-se a reação de quimioluminescência, que consiste na exposição da membrana de nitrocelulose a uma mistura contendo partes iguais da solução A (100mM de glicina pH 10, 0,4mM Luminol e 8mM de 4-iodofenol) e da solução B (0,12% de peróxido de hidrogênio). A membrana foi fotografada em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

Os anticorpos utilizados foram anti-pChk1, anti-pChk2, anti-pBRCA1, anti-tubulina (obtidos de Cell signalling Technology); anti-Nek1 (obtidos de Santa Cruz Biotechnology e Sigma); anti-Fancd2, anti- $\gamma$ -H2AX (obtido da Millipore); anti-GAPDH (obtido de Santa Cruz Biotechnology) anticorpos secundários anti-mouse e anti-habbit (obtidos da sigma). As diluições foram realizadas conforme especificações do fabricante e testes posteriores.

## **8. RT-PCR**

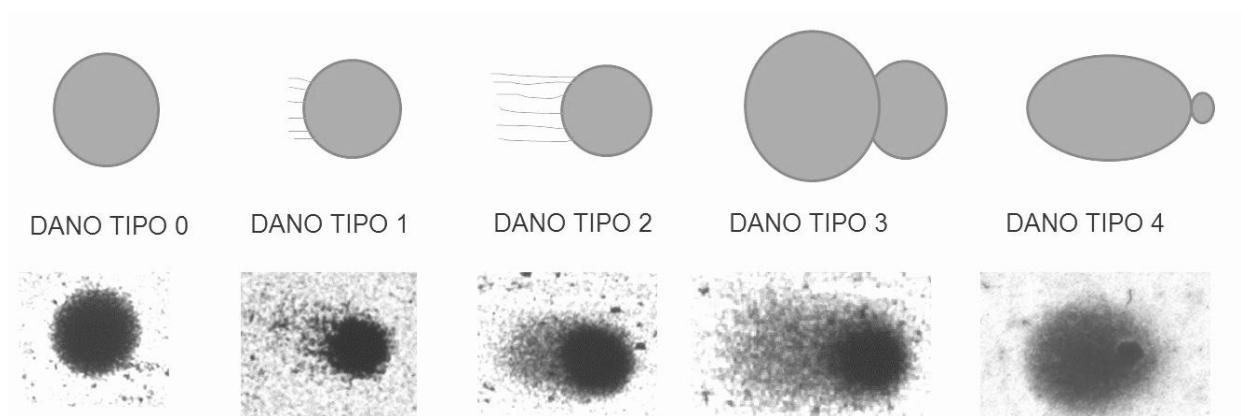
Para aferir o silenciamento das linhagens, o RNA total foi extraído das células com 80% de confluência em cultura utilizando o reagente Trizol LS® (Gibco) conforme especificações do fabricante. O cDNA foi sintetizado pela reação de RT-PCR utilizando a enzima transcriptase reversa MMLV-RT® (Promega) e primers sintetizados especificamente para Nek1. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% corados com Sybr Green (Molecular Probe).

## **9. Ensaio Cometa alcalino e neutro**

O ensaio cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi utilizado em sua versão alcalina e neutra para aferir danos ao DNA de células tratadas com diferentes agentes indutores de danos. Esse método permite estimar danos do tipo quebras simples e duplas, modificações de bases e até lesões mais complexas como ligações intercadeias (Olive & Banáth 2006).

Após os diferentes tratamentos (indicados na sessão de resultados), as células são coletadas, misturadas em 0,7% agarose de baixo ponto de fusão (*low-melting point*) e espalhadas sobre uma lâmina de microscopia pré-coberta com 1,5% de agarose comum. As lâminas são feitas em duplicata para cada tratamento, que deve ser feito pelo menos três vezes independentes. A próxima etapa é a lise das células em solução 2.5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO em pH 10, por um período de no mínimo 1 h a 4°C. Após a lise, as lâminas são incubadas em tampão que varia de acordo com o ensaio. No caso do cometa alcalino, as lâminas ficam incubadas por 20 minutos a 4°C em tampão com pH entre 13 e 13.5 contendo 300 mM NaOH e 1 mM EDTA, que permite o desenrolamento do DNA

e o surgimento de quebras para as diferentes lesões apresentadas com o tratamento prévio. Após esse período, é realizada a eletroforese a 300 mA e 25 V por 20 minutos a 4°C em cuba horizontal. No cometa neutro, a incubação é feita por 1h em tampão contendo 300 mM de acetato de sódio e 100mM de Tris pH 8.5 a 4°C. Após é realizada a eletroforese a 12 mA e 14 V por 1 h, também a 4°C. Em ambos ensaios as amostras são neutralizadas com 0,4 M de Tris, pH 7.5 e fixadas em 15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco e 5% de glicerol. A coloração é feita com carbonato de sódio 5%, nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilicico 0,25% e formaldeído 0,15% e neutralizada com ácido acético 1%. A análise é feita em microscópio óptico a partir da classificação de pelo menos 100 núcleos corados por lâmina. A classificação utilizada é baseada na análise visual do tamanho das caudas apresentadas pelos núcleos indicadas na figura 18 e que será empregado no calculo do índice de dano, como forma de quantificar as lesões induzidas por cada tratamento (Collins 2004).



**Figura 18: Classificação visual de danos utilizada na análise do ensaio cometa.** Para cada núcleo analisado é atribuído uma das categorias visuais que vão de zero (sem dano) até 4 (dano máximo). O número de células com esse dano é multiplicado pelo valor do dano e a soma desses valores é considerado o índice de dano, o qual será usado em uma média entre os valores das duplicatas das lâminas e as triplicatas experimentais e biológicas(Collins 2004).

## 10. Citometria de Fluxo

As células previamente tratadas foram coletadas e fixadas em etanol 70% a 4° C por 24h. Posteriormente foram lavadas com PBS e incubadas em solução contendo PBS, 0.2 mg/ml de RNase (Sigma) e o 20 µg/ml Iodeto de Propídeo (Sigma) e 0.1% Triton X-100. A coleta de dados foi feita em citômetro Guava Easy Cyte Plus cell e análise através do software cytosoft (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Aproximadamente 10 mil células foram analisadas por experimentos e estes foram realizados em triplicatas.

## 11. *Host Cell Reactivation* (HCR)

A análise da reativação pela célula hospedeira (*Host Cell Reactivation*) foi feita através da transfecção do plasmídeo pShuttle contendo luciferase (*luc*) previamente tratado com diferentes doses ACNU (0 a 300 µM) ou cisplatina (0 a 500 nM), concomitante com a transfecção de outro plasmídeo expressando a luciferase de renilla (*RL*), que possui luminescência em outro comprimento de onda, empregado como controle interno nas linhagens a serem testadas, nas linhagens a serem testadas. As células foram transfectadas com reagente lipofectamine (Invitrogen) conforme especificações do fabricante e após 2 ou 4 dias o ensaio de luminescência kit Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, EUA) foi realizado (Valdiglesias *et al.* 2011) .

## 12. Análise Estatística

Toda análise estatística foi feita utilizando ANOVA seguido de One-way Tukey's Multiple Comparison Test. O software utilizado foi o GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 13. Imunoprecipitação

Células Hek293t foram transfectadas com plasmídeo contendo a sequência da Nek1 fusionada a sequência do peptídeo Flag. Após 48h as células foram lisadas em 50 mM de Tris pH 7.4, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de B-glicerolfosfato, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 % Triton X-100 e coquetel inibidor de protease (Calbiochem). O lisado foi incubado com anticorpo anti-Nek1 ou anti-Flag (Sigma)

ligado a proteína A agarose *beads* (Amersham). As *beads* ligadas ao anticorpo e à Nek1 foram lavadas com tampão de lise duas vezes e então foram preparadas para a análise em espectrômetro conforme descrito na sessão a seguir.

#### **14. Espectrometria de Massas**

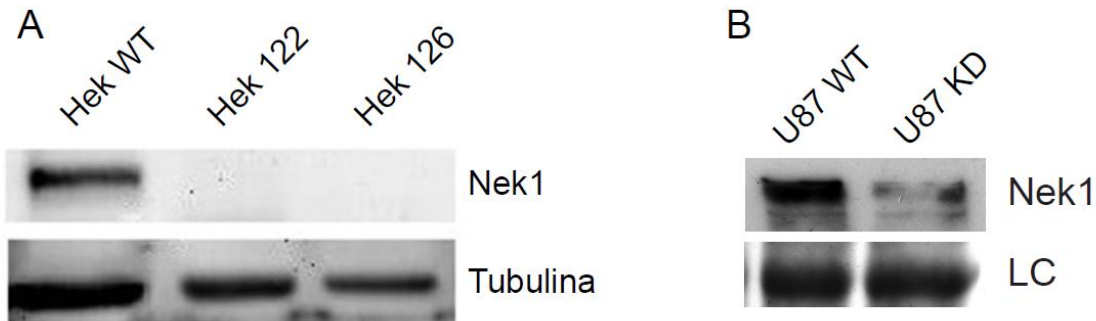
O imunoprecipitado da Nek1 (Nek1 fusionada as *beads*) foi reduzido com DTT (10 mM de DTT em 25 mM de bicarbonato de amônia) e alquilado com Iodoacetamida (55 mM de iodoacetamida em 25 mM de bicarbonato de amônia). Os peptídeos foram digeridos com tripsina (20 ng/μl em 25 mM de bicarbonato de amônia) por 12 h (*overnight*) a 37°. C. Após a digestão, o sobrenadante foi separado das *beads* e o líquido coletado foi liofilizado e ressuspensão em 1% de ácido fórmico para aplicação no espectrômetro do tipo eletrospray Q Tof modo positivo. Os arquivos gerados pelo *masslynx* foram processados utilizando o software *Proteinlynx Global Server* disponível no LNLS e a análise foi feita utilizando o MASCOT e o swiss prot como banco de dados, disponível na internet (<http://www.matrixscience.com/home.html>). Como modificações variáveis foram adicionadas na análise a oxidação da metionina, carbamidometilação e fosforilação da tirosina, serina e treonina.

## VI. RESULTADOS

Parte dos resultados obtidos nesta tese foram publicados no artigo intitulado “Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle Arrest” na revista *Mutagenesis*, anexado a essa tese.

### 1. Obtenção de linhagens silenciadas para Nek1

Células Hek293t e U87 foram silenciadas através da técnica de shRNA como descrito na sessão de materiais e métodos. As linhagens para estudo foram selecionadas através da presença de GFP e o silenciamento da Nek1 foi confirmado através da técnica de *western blot* com anticorpo específico (Figura 19 A e B). Duas linhagens *knockdown* de Hek293t (Hek 122\* e 126) foram utilizadas nos ensaios posteriores e uma linhagem de U87 parcialmente silenciada para Nek1 (U87 KD).



**Figura 19: Confirmação do silenciamento por shRNA da quinase humana Nek1 através da técnica de *western blot* com anticorpo específico anti-Nek1.** Células Hek293t (A) e U87 (B) foram silenciadas por RNA de interferência e selecionadas a partir da expressão de GFP. Como controle de carregamento foi utilizada a proteína tubulina (A) e a membrana foi corada por *Coomasie* (B).

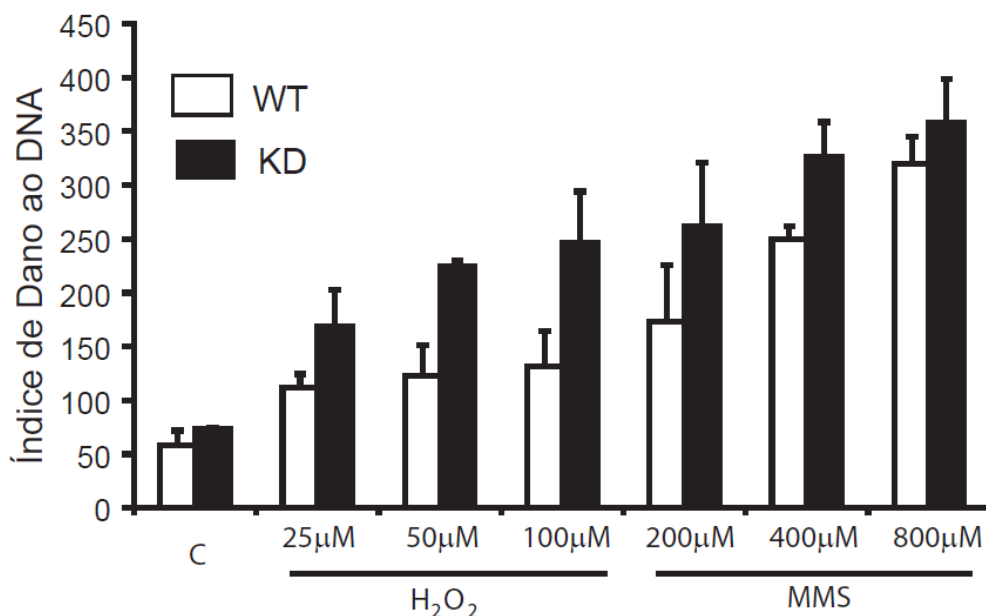
\*A maioria dos experimentos foi realizada com a linhagem silenciada Hek 122 (obtida primeiramente nas seleções) e por isso, nesse trabalho, as legendas trazem Hek WT como a linhagem controle expressando Nek1 e Hek KD como a linhagem 122



silenciada para Nek1. Nos ensaios utilizando as duas linhagens, essas estão denominadas de acordo com o código apresentado na figura 1.

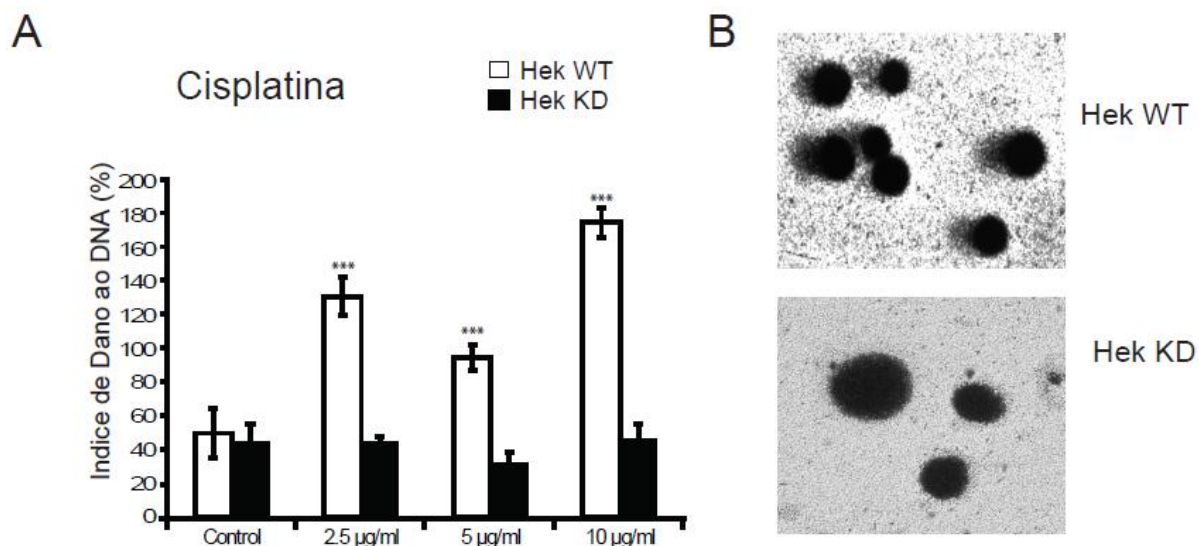
## 2. O silenciamento da Nek1 altera a capacidade de reparo do DNA

Inicialmente, investigou-se o papel do silenciamento da Nek1 no reparo de DNA induzido por diferentes agentes. Através do ensaio cometa foi demonstrado que células silenciadas para Nek1 possuem um reparo mais lento para lesões ao DNA causadas por metil-metanosulfonato (MMS) e peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , mas que a ausência dessa proteína não altera a quantidade dos danos iniciais presentes nas células Hek293t (Pelegri *et al.* 2010). Optou-se por utilizar outra linhagem para confirmar o resultado obtido. Utilizando a linhagem U87 parcialmente silenciada também se encontrou resultados semelhantes (figura 20).



**Figura 20: Quantificação gráfica do ensaio cometa alcalino realizado em células U87 expostas a diferentes doses de  $H_2O_2$  e MMS.** As células U87 selvagens (WT) e parcialmente silenciadas para Nek1 (KD) foram tratadas com diferentes doses de MMS por 2 h (A) e  $H_2O_2$  por 30 min. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Entretanto, a exposição ao agente quimioterápico cisplatina foi capaz de induzir alterações nos índices de dano ao DNA entre as linhagens, logo após o tratamento (Figura 21), e não apenas na cinética de reparo, como observado com outros agentes testados. Nos tratamentos com MMS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferença no índice de dano ao DNA entre as linhagens surge ao longo do tempo (Pelegri *et al.* 2010), indicando um reparo defeituoso da linhagem silenciada. Porém, no tratamento com cisplatina, essa diferença é demonstrada inicialmente no ensaio cometa pela ausência de caudas nas silenciadas, e presença de quebras no DNA na selvagem, indicando que o silenciamento da Nek1 pode ter aumentando o dano causado por cisplatina, ou o reparo, que deveria iniciar rapidamente após a indução de dano, se tornou mais lento nessa linhagem em relação a selvagem (Figura 21 B).

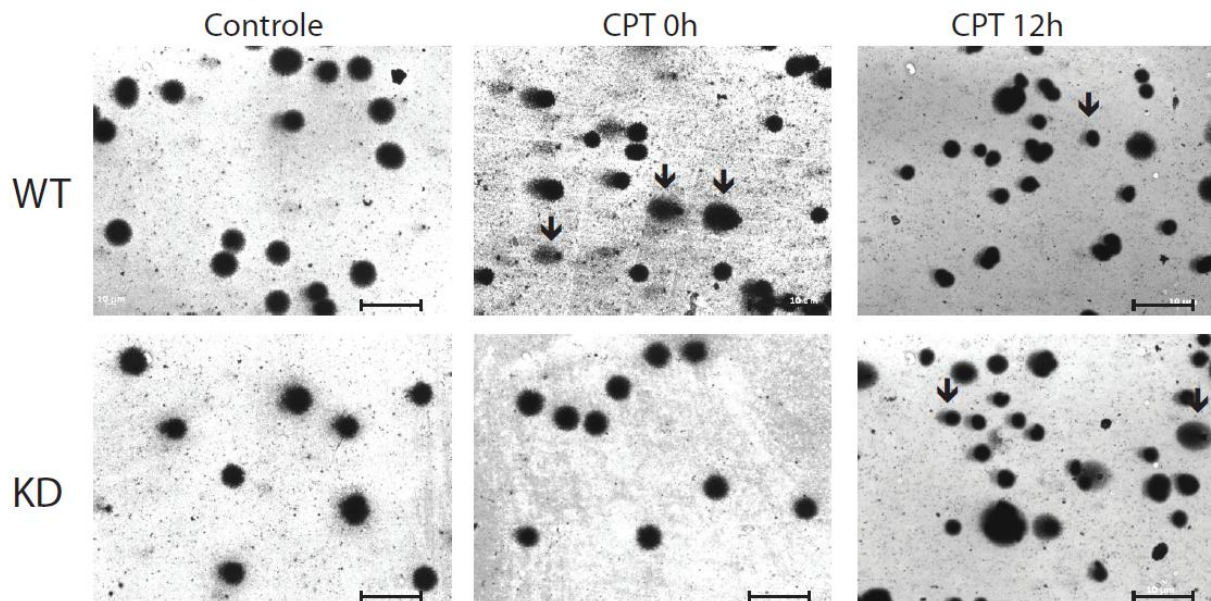


**Figura 21: O silenciamento da Nek1 induz alterações nos índices de dano ao DNA de células tratadas com cisplatina.** (A) Quantificação do índice de dano ao DNA de células tratadas com diferentes doses de cisplatina por 1 h, avaliado através do ensaio cometa alcalino; (B) imagem representativa de células tratadas com 5 µg/ml (16 µM) de cisplatina, demonstrando a presença de caudas na linhagem WT e a ausência na silenciada (KD). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. Os asteriscos correspondem aos tratamentos que diferiram estatisticamente entre as duas linhagens. (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).

O ensaio cometa alcalino é utilizado para detectar lesões do tipo quebra simples e de dupla fita além, de sítios álcali-lábeis, que serão expressos posteriormente como quebras na molécula de DNA, sob condições alcalinas durante este ensaio. Através da eletroforese, o DNA quebrado migra por uma matriz de gel formando caudas que podem ser quantificadas como Índice de dano ao DNA. Alguns tipos de lesões, como as ligações cruzadas intercadeias (ICLs) interferem no desenrolamento e na migração do DNA, impedindo ou retardando a formação dessas caudas (Cheng *et al.* 2006; Olive & Banáth 2006). No experimento anterior ocorreram alterações no padrão de migração do DNA das células silenciadas tratadas com diferentes concentrações de cisplatina, acarretando em caudas menores e, conseqüentemente, um menor índice de dano quando comparado à linhagem selvagem. Entretanto, essa diferença não significa que a linhagem silenciada apresenta menos danos em relação a selvagem, na verdade, o que pode estar ocorrendo é o não processamento correto de lesões do tipo ICL nessas células. Para reparar essas lesões a célula deve ser capaz de desenrolar o material genético e quebrar as cadeias de DNA e, isso ocorre momentos após a indução do dano, através da detecção da lesão por moléculas específicas. Para verificar esta hipótese e se está ocorrendo uma alteração no reparo dessas lesões, um estudo da cinética de reparo foi realizado em ambas as linhagens, utilizando o ensaio cometa alcalino e sua versão em pH neutro, que é capaz de detectar apenas quebras de dupla fita (Figura 22 e 23). As células foram tratadas por 1 h com 5 µg/ml de cisplatina e após esse período, o meio foi substituído por um meio completo sem cisplatina. Em diferentes períodos posteriores ao tratamento, as células foram coletadas para o ensaio cometa versão neutra ou alcalina, conforme descrito na sessão de material e métodos.

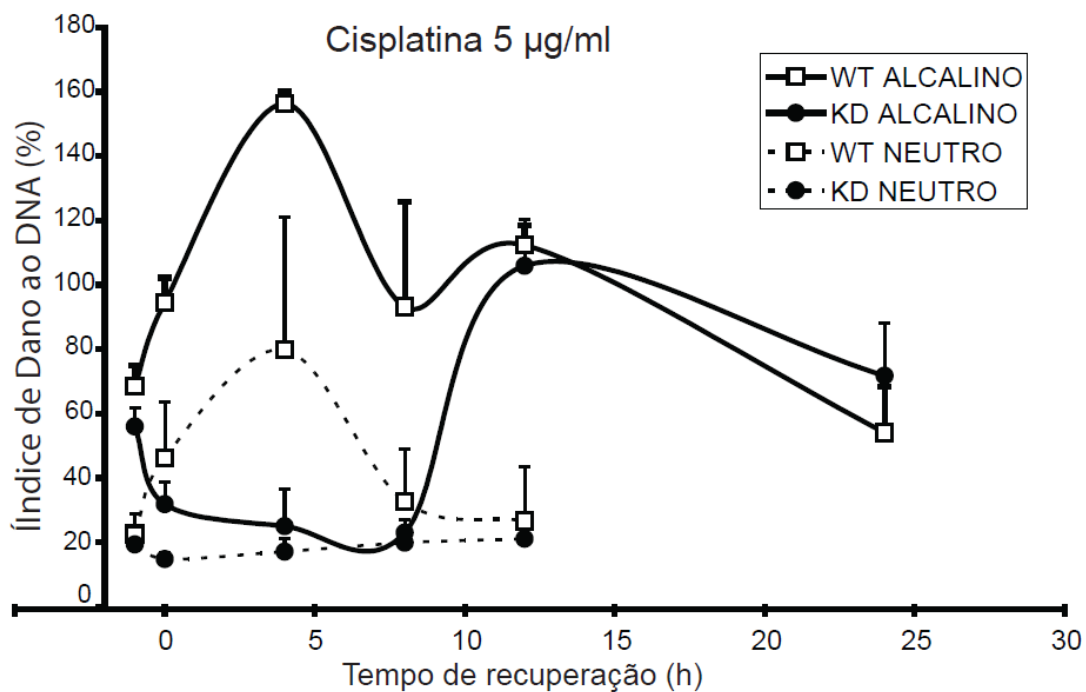
A expressão do reparo se dá pela diminuição do índice dano ao longo do tempo, mas, nesse caso, não se pode considerar o índice de dano como uma medida direta de reparo, uma vez que os ICLs estão reprimindo a migração do DNA lesado. Por isso, levou-se em consideração a migração do DNA e a formação de caudas. Na linhagem controle foi observado o aparecimento de caudas após 1h de tratamento com cisplatina e sem período de recuperação (Figura 22). Na linhagem silenciada para Nek1 as caudas apenas se tornaram visíveis após 12h do período de recuperação.

Cisplatina 5  $\mu\text{g/ml}$



**Figura 22: O silenciamento da Nek1 altera o reparo de lesões induzidas por cisplatina em células Hek293t.** Imagens representativas comparando o núcleo de células silenciadas e selvagens tratadas com 5  $\mu\text{g/ml}$  (16  $\mu\text{M}$ ) de cisplatina por 1h e analisadas após 0 e 12h de recuperação em meio sem o agente. As flechas indicam núcleos com caudas, referentes à migração significativa do DNA.

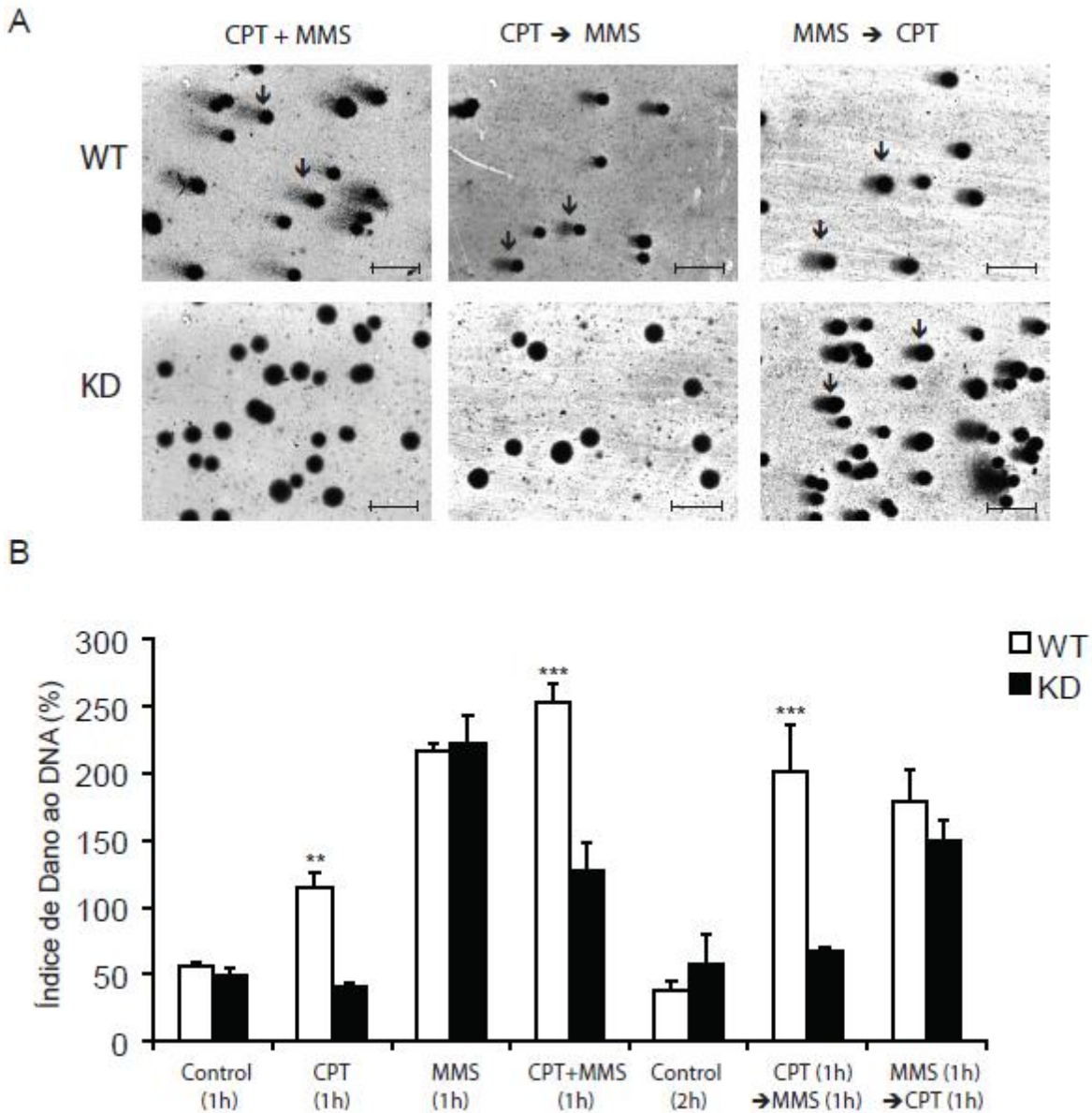
Ao analisar as células em diferentes momentos após o tratamento com cisplatina, através de uma cinética de recuperação com o ensaio cometa, observa-se que a linhagem selvagem apresentou uma considerável migração do DNA, com pico em quatro horas após a exposição ao quimioterápico. Esse efeito pode ser uma indicação do início da reparação dessas lesões, que se dá através da excisão dos *crosslinks* nas fitas lesadas, e que não está ocorrendo na linhagem silenciada. Em contraste com as selvagens, essas células começam a apresentar caudas a partir de 12 h do dano, e não exibiram DSBs durante o período de estudo, avaliado através do cometa neutro (Figura 23), demonstrando claramente que o mecanismo de reparo está prejudicado.



**Figura 23: O silenciamento da Nek1 altera o reparo de lesões causadas por cisplatina em Hek293t.** Quantificação da cinética de dano ao DNA induzido pelo tratamento com 5 µg/ml (16 µM) de cisplatina por 1 h, avaliado através do ensaio cometa alcalino e neutro, após diferentes períodos de recuperação com meio sem o agente causador de dano. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

A fim de comprovar que a ausência de caudas observada nas células silenciadas se deve à formação de ICLs e a falha no seu mecanismo de reparo, e não como resultado da reparação completa dos danos, utilizou-se um agente indutor de quebras, o MMS, concomitante a cisplatina (Figura 24 A e 24B). Três estratégias foram empregadas para avaliar o efeito do silenciamento da Nek1 e a presença dos ICLs de cisplatina na migração do DNA quebrado pelo MMS. Primeiramente, as linhagens foram pré-tratadas com MMS para a indução de quebras no DNA, seguido pelo tratamento com cisplatina. Neste caso, não houve diferença no tamanho das caudas apresentadas nas duas linhagens (Figura 24 A e 24 B). Quando o tratamento com cisplatina foi realizado antes da exposição ao MMS ou juntamente a esse indutor de

quebras, houve alteração na migração do DNA das células silenciadas, indicando que essa inibição é devido o efeito da cisplatina, e, portanto, se deve à presença dos ICLs.



**Figura 24: A ausência da Nek1 altera a migração do DNA lesado por MMS e cisplatina no ensaio cometa.** (A) Imagens representativas comparando as estratégias utilizadas para avaliar o envolvimento da Nek1 no reparo de *crosslinks*. (B) Quantificação do ensaio cometa utilizando 5 µg/ml (16 µM ) de cisplatina e 400 µM de MMS. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. Os asteriscos correspondem aos tratamentos que diferiram estatisticamente entre as duas linhagens. (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).

### **3. A Nek1 está envolvida diretamente no reparo de lesões induzidas por cisplatina, mas não por ACNU**

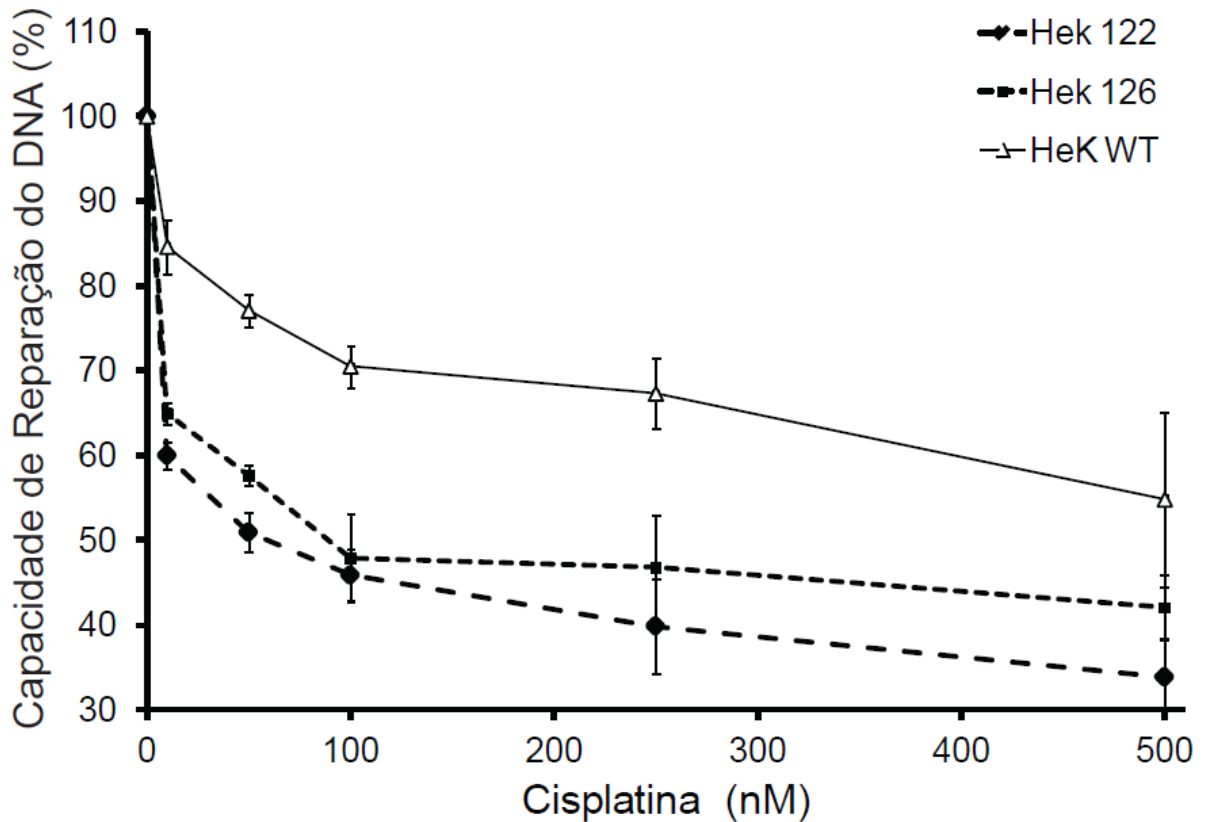
Uma vez que a Nek1 mostrou-se importante no processo da cinética de dano causado por cisplatina e surgiram evidências sobre o seu envolvimento no reparo de lesões do tipo *crosslinks* intercadeia (ICLs), optou-se por seguir investigando o papel dessa quinase em resposta a esse quimioterápico.

Para avaliar o envolvimento direto da Nek1 no reparo dos ICLs, utilizou-se a técnica de *Host Cell Reactivation* (HCR). A técnica consiste em transfectar as linhagens de estudo com plasmídeo contendo um gene repórter, tratado previamente com um indutor de dano ao DNA, e medir a capacidade dessas células em recuperar a atividade desse gene, comparando a um plasmídeo não tratado como controle da transfecção. Para este ensaio, foram utilizadas as duas linhagens de Hek293t silenciadas para Nek1 descritas anteriormente, a Hek126 e 122 e uma selvagem. As linhagens foram transfectadas com o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase, tratado previamente com diferentes concentrações de cisplatina (Figura 25).

Ambas as linhagens silenciadas, 122 e 126, apresentaram uma capacidade inferior em restabelecer a atividade da luciferase contida no plasmídeo tratado com cisplatina, quando comparadas à linhagem selvagem, indicando que a Nek1 pode estar envolvida diretamente no reparo de lesões induzidas por esse agente.

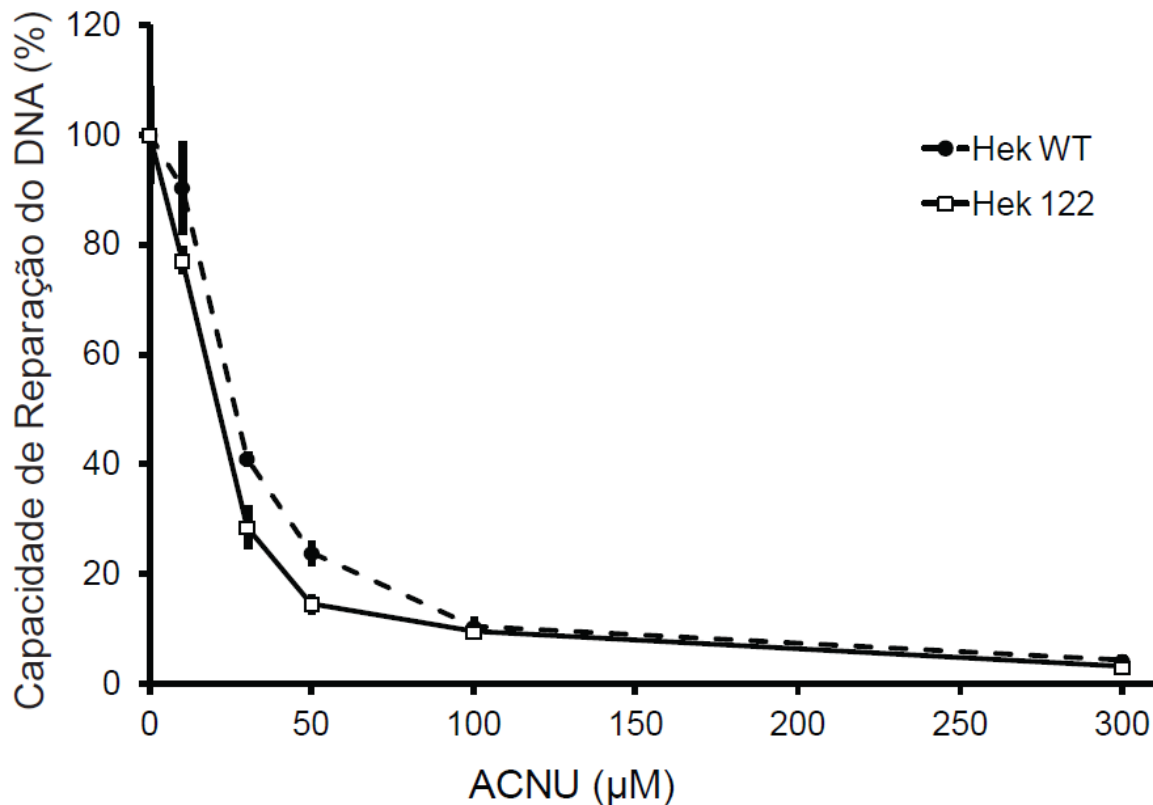
A fim de investigar o papel da Nek1 no reparo de ICLs, utilizou-se outro agente indutor de crosslinks para este ensaio, o ACNU, um agente alquilante que induz lesões do tipo O<sup>6</sup>-cloroetilguanina (Figura 26). Lesões desse tipo podem sofrer rearranjo quando não removidas corretamente do DNA, levando a formação de adutos intercadeia que serão reparados por vias semelhantes aos danos induzidos pela cisplatina.

Neste caso, a recuperação da atividade da luciferase foi semelhante entre as linhagens testadas, indicando que a Nek1 não tem um papel no reparo das lesões induzidas por esse agente (Figura 26).



**Figura 25: Quantificação do ensaio HCR demonstrando o envolvimento direto da Nek1 no reparo de lesões provocadas por Cisplatina.** Células Hek293t selvagem (WT) e silenciadas para Nek1 (122 e 126) foram transfectadas com plasmídeo (pShuttle-Luc) contendo o gene da Luciferase, tratado previamente com diferentes doses de cisplatina, e com plasmídeo (pShuttle-RL), contendo o gene da Luciferase de renilla não tratado, como controle de transfecção. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.





**Figura 26: Quantificação do ensaio HCR de lesões provocadas por ACNU..** Células Hek293t selvagem (WT) e silenciadas para Nek1 (122) foram transfectadas com plasmídeo (pShuttle-Luc) contendo o gene da Luciferase, tratado previamente com diferentes doses de ACNU, e com plasmídeo (pShuttle-RL), contendo o gene da Luciferase de renilla não tratado, como controle de transfecção. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

#### **4. O silenciamento da Nek1 altera a parada no ciclo celular induzida por danos ao DNA**

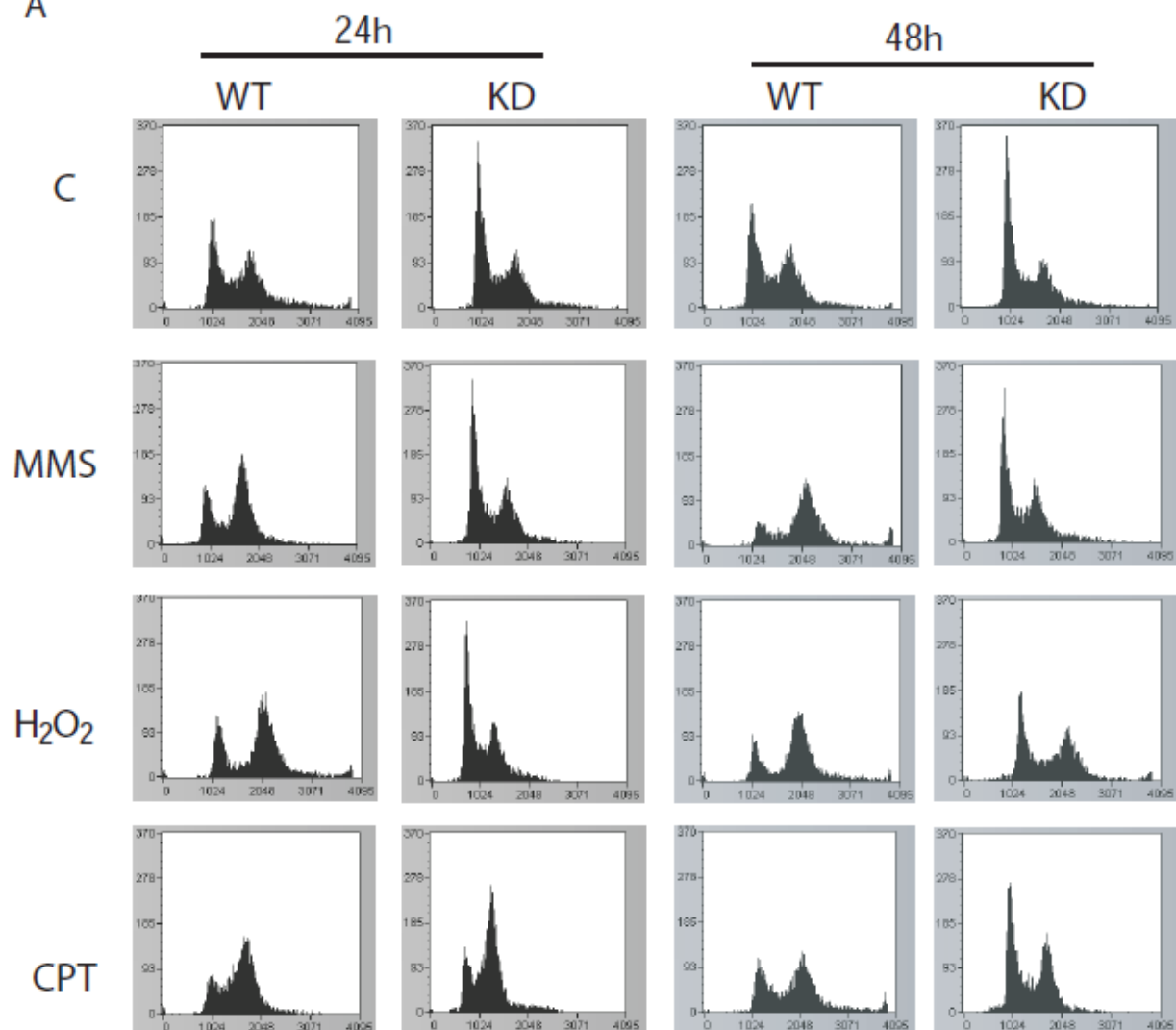
O reparo do DNA está intimamente relacionado à progressão do ciclo celular. Células expostas a danos ao material genético podem sofrer paradas ao longo do ciclo, até que ocorra o início da resposta a danos ao DNA. Defeitos nessa resposta comprometem a integridade do funcionamento celular, acarretando uma série de

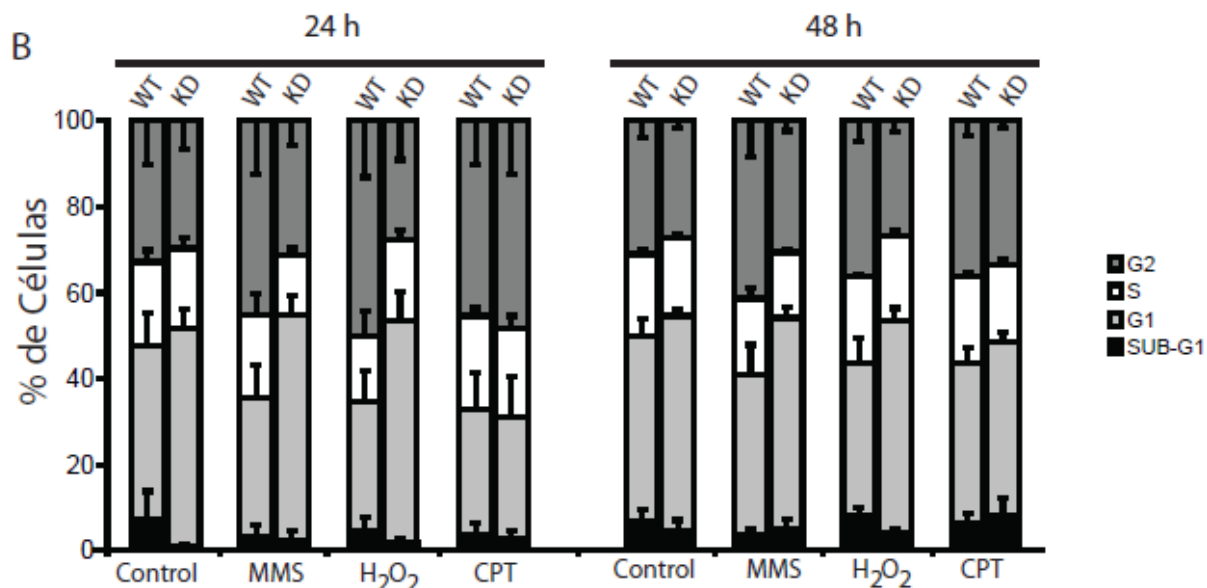
eventos que incluem um acúmulo de mutações, o início do processo tumoral e até a morte celular. Muitas quinases estão relacionadas à regulação do ciclo celular, e ao reparo de danos ao DNA em resposta a diferentes estímulos. Para determinar a participação da Nek1 na progressão do ciclo celular utilizou-se células Hek 293t, não sincronizadas selvagens e silenciadas para Nek1, tratadas com os diferentes indutores de dano ao DNA, MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cisplatina por 24 e 48h. O ciclo celular foi avaliado através de citometria de fluxo, com marcação do DNA por iodeto de propídeo (Figura 27).

Células de mamífero quando tratadas com MMS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem apresentar parada na fase G2/M (Trucco *et al.* 1998; Kim *et al.* 2008), entretanto, as células silenciadas para Nek1 praticamente não apresentaram parada no ciclo, quando tratadas com esses agentes, em contraste com as selvagens, que apresentaram parada significativa em G2/M com 24 h de tratamento e permaneceram até 48h (Figura 27 A e 27 B).

Agente indutores de ICL são capazes de provocar parada do ciclo em S durante a passagem da forquilha de replicação pela molécula de DNA (Cruet-Hennequart *et al.* 2009). Nesse caso, ambas as linhagens aparentemente apresentaram parada em S (Figura 27 A e 27 B).

A





**Figura 27: Efeito do silenciamento da Nek1 na progressão do ciclo celular de células Hek293t, tratadas com agentes indutores de dano ao DNA.** (A) Histograma representativo das linhagens selvagem (WT) e silenciada para Nek1 (KD) tratadas por 24 e 48 h com 400  $\mu$ M de MMS, 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5  $\mu$ g/ml (16  $\mu$ M) de cisplatina. O ciclo celular foi avaliado através de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo. (B) quantificação da distribuição do conteúdo de DNA por fase do ciclo (%). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

## 5. O silenciamento da Nek1 altera a sinalização de danos ao DNA induzidos por cisplatina

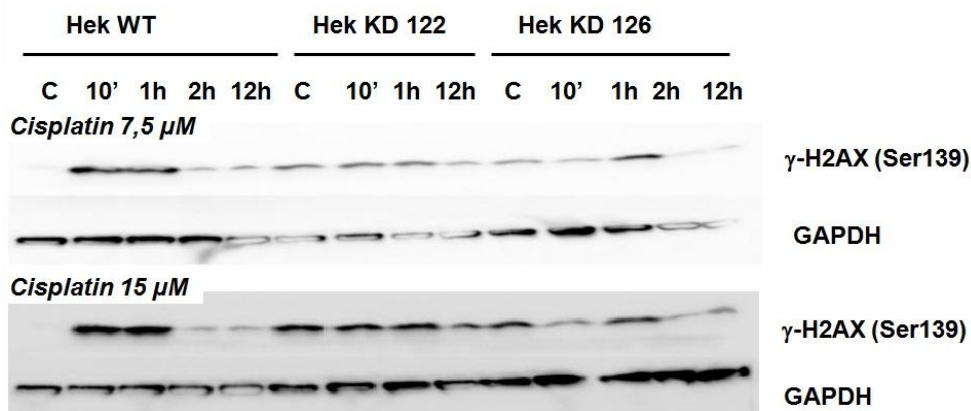
Danos ao DNA iniciam uma rede complexa de sinalização que rapidamente recruta moléculas para o local da lesão, ativando uma maquinaria de reparação específica. Sistemas de controle do ciclo celular também são ativados para fornecer a célula mais tempo para reparar as lesões, antes de completar o processo de divisão. As etapas de checagem (*checkpoints*) ocorrem em todas as fases do ciclo e impedem que erros sejam passados para as células filhas. Existe uma ligação forte entre as vias sensoras de danos e reparo, e os mecanismos regulatórios do ciclo. Sabe-se que

essas vias atuam em paralelo e muitas moléculas participam de ambas, de acordo com o estímulo desencadeador. A partir disso, a próxima etapa do trabalho foi estudar o efeito do silenciamento da Nek1 na sinalização de moléculas que possuem papel chave na sinalização de danos e nas etapas de checagem do ciclo, visando entender a localização da Nek1 nas vias de reparo.

### **5.1 A fosforilação rápida de H2AX é alterada na ausência da Nek1 em resposta à cisplatina**

A fosforilação da histona H2AX faz parte do início de uma rede de reconhecimento de lesões do tipo DSBs e ativação de vias de reparo, além de estar envolvida no remodelamento da cromatina. Embora não existam evidências que a cisplatina produza esse tipo de lesão diretamente, durante o reparo dos *crosslinks* as fitas do DNA precisam ser excisadas e este mecanismo parece estimular o surgimento de foci de  $\gamma$ -H2AX, a forma fosforilada dessa histona (Mogi & Oh 2006).

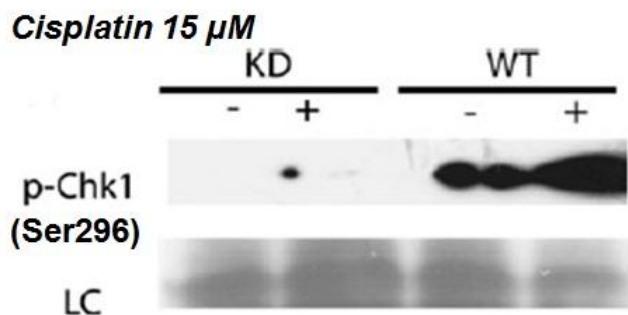
Através do ensaio cometa neutro, mostrou-se que a células silenciadas para Nek1 não apresentam DSBs após a exposição à cisplatina, e possuem reparo deficiente dessas lesões, além de serem mais sensíveis a esse agente quando comparadas a linhagem selvagem. Para confirmar a ausência de DSBs nessas células, realizou-se um ensaio de imunodeteção da forma fosforilada dessa histona em diferentes períodos após a exposição à cisplatina (figura 28). A fosforilação de H2AX ocorreu rapidamente após a exposição a 7,5 e 15  $\mu$ M de cisplatina na linhagem selvagem, mas o mesmo não é observado nas células silenciada, nas quais a fosforilação de H2AX parece se dar mais tardiamente.



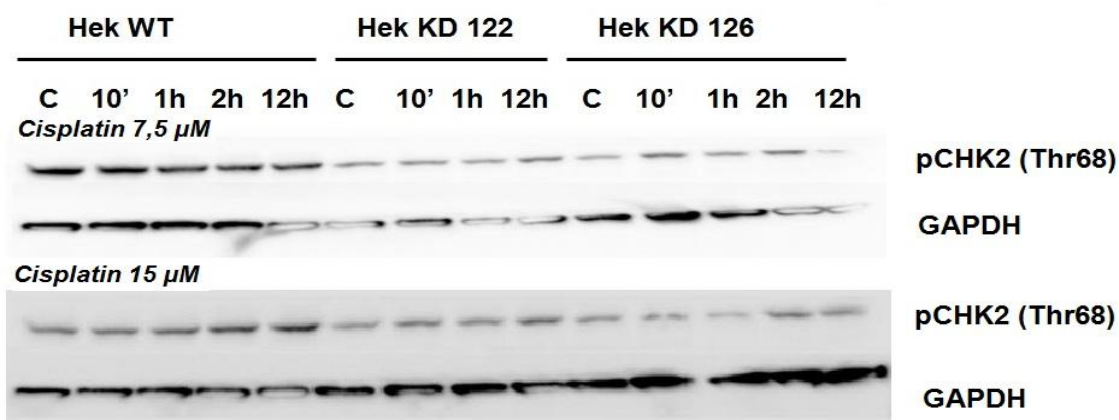
**Figura 28: Nek1 é importante para a rápida fosforilação de H2AX após indução de dano ao DNA por cisplatina.** Células Hek293t selvagens (WT) e silenciadas para Nek1 (122 e 126) foram tratadas com 7,5 e 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina por diferentes períodos e coletadas para realização de ensaio de imunodeteção, a fim de identificar a forma fosforilada da histona H2AX. A proteína GAPDAH foi utilizada como controle de carregamento. A imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes.

## 5.2 Nek1 é importante para a ativação de Chk2 e Chk1 em resposta à cisplatina

Nos experimentos anteriores foi visto que o silenciamento da Nek1 causa um retardo no reparo de lesões ao DNA causado por diferentes agentes, e essas células também apresentam alterações no ciclo celular. A fim de entender o papel da Nek1 na regulação do ciclo celular em resposta ao dano ao DNA, o próximo passo foi avaliar a relação da Nek1 com as principais quinases de fase de controle, analisando o perfil de fosforilação da Chk1 e Chk2 após a exposição à cisplatina, nas linhagens selvagem e silenciada para Nek1. Através da técnica de imunodeteção, encontrou-se que tanto a Chk1 quanto a Chk2 não foram ativadas adequadamente nas células silenciadas através da fosforilação em sítios específicos sensíveis a resposta a dano, após a exposição a cisplatina (Figura 29 e 30).



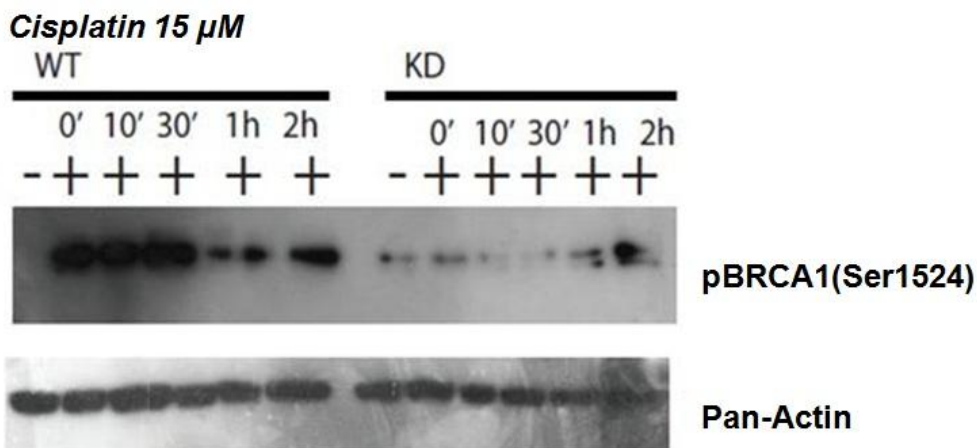
**Figura 29: A Nek1 é importante para a ativação de Chk1 em resposta a cisplatina.** Células Hek293t selvagens (WT) e silenciada (KD) foram tratadas com 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 1 h e então coletadas para análise da fosforilação da Chk1 na Ser296 através da técnica de imunodeteccção. A coloração da membrana com Coomassie blue foi utilizada como controle de carregamento. A imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes.



**Figura 30: O silenciamento da Nek1 altera a ativação de Chk2 em resposta a cisplatina.** Células Hek293t selvagens (WT) e silenciadas (122 e 126) foram tratadas com 7,5 e 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina por diferentes períodos, e então coletadas para análise da fosforilação da Chk2 no sítio Thr68, através da técnica de *western blot*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento. A imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes.

### 5.3 O silenciamento da Nek1 afeta a sinalização de danos induzidos por cisplatina via Fanconi/BRCA1

A próxima etapa do estudo foi avaliar a interação da quinase Nek1 com proteínas envolvidas diretamente no reparo das ligações cruzadas intercadeia. Primeiramente estudou-se a BRCA1, um supressor tumoral que atua na sinalização de dano ao DNA e conecta diferentes vias de reparo, sendo essencial para mecanismos de reparo por recombinação homóloga. Também é encontrada interagindo com a FANCD2, e sua ausência é associada à redução da ubiquitinação da FANCD2, um passo essencial para ativação da via de Fanconi e para o reparo das ICLs. Para este estudo, células silenciadas e selvagens foram expostas a cisplatinas e a fosforilação dessa proteína foi avaliada por imunodeteccção. Observou-se a rápida fosforilação dessa proteína na linhagem selvagem após o tratamento com 15  $\mu$ M de cisplatina em contraste com a silenciada (figura 31).



**Figura 31: A Nek1 é importante para a rápida ativação de BRCA1 após a exposição a cisplatina.** Células Hek293t selvagens (WT) e silenciada (KD) foram tratadas com 15  $\mu$ M de cisplatina por diferentes períodos e então coletadas para análise da fosforilação da BRCA1 no sítio Ser1524, através da técnica de imunodeteccção. Como controle de carregamento do experimento foi utilizada a pan-actina. A imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes.



A fim de investigar a relação da Nek1 com a via de Fanconi, as células foram tratadas com 7,5  $\mu$ M de cisplatina por 2h e em seguida o meio foi substituído por novo, sem o quimioterápico. Em tempos posteriores, as células foram coletadas, lisadas e o extrato proteico foi testado quanto ao estado de ubiquitinação da FANCD2, que é um passo chave para o reparo dos *crosslinks* pela via de Fanconi (Figura 32). A linhagem silenciada apresentou um atraso no aparecimento na forma mono-ubiquitinada da proteína (FANCD2-L), indicando que está ocorrendo um impedimento desse mecanismo nessas células. A monoubiquitinação da FANCD2 ocorre durante a progressão da fase S, ou em resposta a danos ao DNA, e depende da sinalização de outras moléculas que participam da via de Fanconi e de outras vias de reparo, além de processos envolvidos na progressão do ciclo celular.



**Figura 32: Perfil de ubiquitinação de FANCD2 de linhagens KD e WT expostas a cisplatina.** As células foram tratadas por 2h com 7,5  $\mu$ M de cisplatina e em diferentes períodos foram coletadas para verificar a perfil de ubiquitinação da proteína FANCD2. (*FANCD2-L*- forma mono-ubiquitinada; *FANCD2-S* forma não-ubiquitinada).

## 6. Estudo de interação proteica da Nek1

O estudo de moléculas que interagem com uma proteína pode ser fundamental para a compreensão da sua função. Através da proteômica, muitos avanços tem sido feitos em diferentes áreas. As ferramentas utilizadas para a análise de um proteoma geralmente incluem a extração do material proteico de um modelo biológico que pode ter sofrido uma condição diferente da normal, como privação de nutrientes e alteração térmica. As proteínas de interesse são geralmente separadas através de eletroforese e/ou cromatografia e em seguida identificadas através de técnicas bastante precisas, como a espectrometria de massas.

Estudos anteriores foram realizados utilizando a Nek1 como molécula alvo, mas até hoje não se obteve resultados a partir de uma situação fisiológica ou induzindo estresse genotóxico. Com esse intuito, foram realizados estudos de interação proteica da Nek1 através de ensaios de co-imunoprecipitação, seguida por análises de espectrometria de massas. Foram utilizados anticorpos anti-Nek1 e anti-Flag para imunoprecipitar a Nek1 endógena, ou a Nek1 fusionada ao peptídeo Flag, transfectada em células Hek293t selvagem. Os imunoprecipitados obtidos foram digeridos com tripsina e avaliados em espectrômetro de massa do tipo *Eletrospray Q-ToF*, no modo positivo, para a obtenção de espectros do tipo MS-MS. A análise dos dados foi feita utilizando o software MASCOT e o Swiss prot como banco de dados, disponível na internet, considerando apenas sequências humanas.

Inicialmente foram utilizadas células Hek293t transfectadas com a Nek1 fusionada a Flag. Como resultado, foram encontrados poucos peptídeos dessa quinase. Grande parte dos dados obtidos pertence a proteínas identificadas a partir de poucos peptídeos e com pouca cobertura, mas que podem apresentar alguma relação com a possível função da Nek1 (Tabela 4).

**Tabela 4: Identificação de possíveis proteínas que interagem com a Nek1**

**Identificação de proteínas co-imunoprecipitadas com anti-Flag**

**Proteínas relacionadas à ubiquitinação**

HECD1\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1  
HERC2\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase HERC2  
HUWE1\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1  
K0614\_HUMAN Probable E3 ubiquitin-protein ligase C12orf51  
MIB1\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase MIB1  
MYCB2\_HUMAN Probable E3 ubiquitin-protein ligase  
NSE2\_HUMAN E3 SUMO-protein ligase NSE2  
TRI33\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33  
TRI37\_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase TRIM37  
U2QL1\_HUMAN Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q-like protein 1  
UBP1\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1  
UBP11\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11  
UBP24\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24  
UBP27\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 27  
UBP31\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31  
UBP33\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33  
UBP36\_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36

**Quinesinas e proteínas motoras**

KI13A\_HUMAN Kinesin-like protein KIF13A  
KI20B\_HUMAN Kinesin-like protein KIF20B  
KI26B\_HUMAN Kinesin-like protein KIF26B  
KIF24\_HUMAN Kinesin-like protein KIF24

**Dano e reparo de DNA**

ATRX\_HUMAN Transcriptional regulator ATRX  
BRCA2\_HUMAN Breast cancer type 2 susceptibility protein  
FANCB\_HUMAN Fanconi anemia group B protein  
FANCG\_HUMAN Fanconi anemia group G protein  
G45IP\_HUMAN Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1  
PAF\_HUMAN PCNA-associated factor  
PRKDC\_HUMAN DNA-dependent protein kinase catalytic subunit  
RAD9A\_HUMAN Cell cycle checkpoint control protein RAD9A  
XRCC3\_HUMAN DNA repair protein XRCC3

**Sinalização e ciclo celular**

APC\_HUMAN Adenomatous polyposis coli protein  
APC2\_HUMAN Adenomatous polyposis coli protein 2  
CD5R1\_HUMAN Cyclin-dependent kinase 5 activator 1  
LATS2\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase LATS2 OS=Homo sapiens GN=LATS2 PE=1 SV=2  
MACF1\_HUMAN Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5  
MACF4\_HUMAN Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoform 4  
MDM4\_HUMAN Protein Mdm4  
NEK9\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase Nek9  
NUMA1\_HUMAN Nuclear mitotic apparatus protein 1  
PKD1\_HUMAN Polycystin-1  
PLK4\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase PLK4  
RFC1\_HUMAN Replication factor C subunit 1  
SCAPE\_HUMAN S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum  
SMC3\_HUMAN Structural maintenance of chromosomes protein 3  
SMC6\_HUMAN Structural maintenance of chromosomes protein 6

Os experimentos posteriores foram realizados através da co-imunoprecipitação da Nek1 endógena com diferentes anticorpos anti-Nek1, em extratos celulares de Hek293t, em situação fisiológica e após indução de dano pelo tratamento com cisplatina. Não foram obtidos peptídeos da Nek1, embora algumas proteínas encontradas anteriormente tenham aparecido novamente entre os peptídeos identificados (dados não mostrados). Estes ensaios serão refinados e realizados novamente para confirmação.

## V. DISCUSSÃO

### ***O Início do estudo da Nek1 em resposta a danos***

O gene da Nek1 em mamíferos foi inicialmente identificado a partir da clonagem de uma biblioteca de cDNA de sangue de camundongo em 1992 (Letwin *et al.* 1992) mas as primeiras evidências sobre seu envolvimento em reparo de DNA surgiram apenas em 2004, quando foi demonstrado que fibroblastos deficientes em Nek1 são mais sensíveis à radiação ionizante (Polci *et al.* 2004). Até então, a Nek1 era apenas associada à doença policística do rim (Upadhyia *et al.* 2000) e especulava-se sobre um possível papel na regulação do ciclo celular (Arama *et al.* 1998; Moniz *et al.* 2011), função que já era descrita em outros membros da família das Neks (Moniz *et al.* 2011). A suspeita sobre o seu envolvimento em resposta a danos ao DNA surgiu através de um ensaio de duplo híbrido que identificou entre possíveis moléculas de interação com a Nek1, proteínas de reparo como ATRX, Mre11 e 53BP1. (Surpili *et al.* 2003). A partir disso, outro grupo estudou a resposta da Nek1 à danos ao DNA por radiação ionizante (RI) e encontrou o rápido aumento da sua atividade quinásica e expressão proteica e concomitantemente redistribuição da Nek1 do citoplasma para o núcleo, onde ela se localiza com as proteínas sensoras de danos  $\gamma$ -H2AX e Mdc1/Nfbd1 (Polci *et al.* 2004).

A fosforilação da histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX) é estimulada em resposta a lesões do tipo quebra de dupla fita de DNA (DSBs) que ocorrem após a exposição a RI. A fosforilação dessa histona ocorre via ATM, sendo um passo essencial para o recrutamento de outras moléculas sensoras de danos e de reparo de DNA, como a MDC1, que interage com as proteínas do complexo MRN (Mre11/Rad50/ NBS1), e com outras proteínas importantes para o reparo dessas lesões, como 53BP1 e BRCA1 (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Além de DSBs, a RI também provoca outros tipos de lesões, como modificações de bases e quebras simples (SSBs) e, em menor escala, as ligações cruzadas entre as fitas de DNA (Dextraze *et al.* 2010). Entre os tipos de lesões ao DNA atribuídas à radiação ionizante, as DSBs são consideradas biologicamente mais importantes, pois quando não reparadas devidamente, podem levar a instabilidade genômica e a morte celular. O reparo dessas lesões requer um

mecanismo complexo que abrange as vias de recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ), altamente dependentes da progressão do ciclo celular. A NHEJ representa a principal via de reparação de DSBs em mamíferos e atua ao longo do ciclo celular. Muitas vezes, pode envolver a perda de sequências de DNA no local da ruptura e, portanto, é mais propensa a erros. Por outro lado, a via de reparo por HR é restrita principalmente a fase S e G2, quando uma cromátide irmã está disponível como molde, embora NHEJ permaneça funcional nessas fases. A importância de NHEJ no reparo de DSBs induzidas por RI pode ser demonstrada pela radiosensibilidade aumentada dos mutantes dessa via em todas as fases do ciclo celular, em relação aos mutantes de RH, que são tipicamente menos sensíveis do que mutantes NHEJ, devido à restrição de RH para fases do ciclo celular (Jeggo *et al.* 2011). As células deficientes em Nek1 também se mostraram mais sensíveis a radiação ionizante, indicando um possível envolvimento da Nek1 no reparo das lesões causados por esse agente, e como quinase sensora envolvida na resposta inicial ao dano, mas, nesse primeiro momento, não haviam evidências diretas do papel da Nek1 em mecanismos de reparo.

A partir desses indícios, o objetivo desse trabalho foi avaliar a participação dessa quinase em mecanismos de dano e reparo de DNA, buscando situar a Nek1 nas vias sensoras de dano e de sinalização de reparo, atribuindo uma função dentro da resposta a danos ao DNA (DDR) após a exposição a diferentes agentes. Para isso foi desenvolvido um modelo estável de linhagens celulares silenciadas para Nek1 por shRNA. Essas células foram utilizadas em diferentes ensaios para avaliação do fenótipo da linhagem sem a quinase atuante, em relação à linhagem selvagem expressando a proteína funcional Nek1.

### ***O reparo induzido por diferentes agentes é alterado pela ausência da Nek1***

Inicialmente testou-se a capacidade de reparo dessas células, por ensaio cometa versão alcalina, após indução de danos com o agente alquilante monofuncional MMS, com o indutor de estresse oxidativo peróxido de hidrogênio, e com o quimioterápico indutor de adutos covalentes intercadeia e intracadeia, cisplatina. Os tratamentos provocaram lesões ao DNA em ambas as linhagens, mas a silenciada demonstrou um reparo mais lento para todos os agentes testados. Entretanto, o

tratamento com cisplatina gerou danos iniciais mais evidentes em relação a selvagem, sugerindo que a Nek1 tem um papel importante no reparo das lesões induzidas por esse agente, e sua ausência torna as células mais sensíveis. Um experimento semelhante foi realizado por outro grupo avaliando a capacidade de reparo de células deficientes em Nek1 expostas a baixas doses de RI. As células deficientes apresentaram caudas maiores após 24h da exposição, indicando um reparo defectivo das lesões induzidas por esse agente. O mesmo ocorreu na análise de manutenção de foci de  $\gamma$ -H2AX nuclear, as linhagens deficientes mantiveram mais foci da histona fosforiladas após 24h da indução de dano por RI (Chen *et al.* 2008). A manutenção dos foci de  $\gamma$ -H2AX representa a persistência da lesão que não foi reparada devidamente, pois o complexo formado pela histona H2AX é desmontado logo após o reparo. Além disso, a permanência desses foci parecem ser indicativo de lesões letais (Banáth *et al.* 2010).

Aparentemente, as células silenciadas para Nek1 utilizadas no ensaio cometa se revelaram mais sensíveis à cisplatina, apresentando núcleos com caudas ausentes, que ao longo da cinética de reparo apresentaram mais caudas/caudas maiores, em contraste com a selvagem, cujo perfil se mostrou o oposto. A razão dessa alteração no perfil de migração dos núcleos seria o surgimento das lesões do tipo *crosslinks* intercadeia (ICLs), que são ligações cruzadas covalentes entre as fitas de DNA formadas após a exposição à cisplatina. Essas lesões são capazes de bloquear a transcrição e a replicação e por isso, altamente letais para a célula (Dronkert & Kanaar 2001).

O ensaio cometa é utilizado para avaliar os danos ao DNA de acordo com o tamanho das caudas, após a migração do conteúdo nuclear na eletroforese. Essa avaliação é proporcional ao desenrolamento e a quebra do DNA, descritos como etapas iniciais para a reparação de ICLs. Sob condições alcalinas, a desnaturação do DNA contendo ICLs é reprimida e a sua migração é retardada na eletroforese. Portanto, o DNA contendo muitos ICLs não forma caudas no cometa alcalino (Cheng *et al.* 2006). Para o reparo correto dessas lesões, inicialmente deve haver o reconhecimento dos ICLs pela forquilha de replicação e as fitas lesadas devem ser incisadas em seguida. Esse processo envolve a via por excisão de nucleotídeos (NER)

e a formação de DSBs, que posteriormente são reparadas por vias recombinacionais e de síntese translesão (TLS). Estruturalmente, essas quebras não são as mesmas causadas pela RI, mas a maquinaria utilizada no reparo dessas lesões é semelhante (McCabe *et al.* 2009).

Para comprovar se o efeito observado no cometa alcalino se deve ao reparo incorreto dos ICLs, e não a resolução total das lesões na linhagem silenciada, foi utilizado como estratégia o acréscimo de um agente indutor de quebras ao tratamento com cisplatina. Modificações no ensaio cometa envolvendo o uso de enzimas ou outros agentes indutores de dano ao DNA podem ser utilizadas para detectar *crosslinks* ou outros tipos de lesões (Almeida *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2006; Olive & Banáth 2009). Para esse ensaio foi utilizado o MMS antes, depois e concomitantemente ao tratamento com cisplatina. Observaram-se alterações no padrão de migração do DNA na linhagem silenciada quando tratada simultaneamente com as duas drogas, ou quando o tratamento com cisplatina foi feito anterior ao MMS. Isso ocorre porque ao tratar as células silenciadas com cisplatina, a formação dos ICLs surge rapidamente impedindo a migração das fitas quebradas posteriormente pelo MMS, mantendo o material genético enrolado durante ensaio. Quando o MMS é adicionado antes da cisplatina, as quebras que ocorrem na fita permitem que a molécula se desenrole e os ICLs formados posteriormente, pela cisplatina, não são suficientes para retardar a migração do DNA. Na linhagem selvagem o reparo dos ICLs é mais eficiente, então, não se observa alterações nos padrões de migração, e o número maior de caudas se deve à etapa de reparo referente à excisão das fitas. Esses resultados indicam que a Nek1 é importante para o reparo das lesões induzidas por cisplatina e parece que a presença dessa quinase é necessária para o processo de excisão das fitas de DNA.

### ***O mecanismo de reparo de ICLs depende da presença da Nek1***

A próxima etapa do trabalho foi avaliar a presença de DSBs após a indução de danos por cisplatina, como parte do processo de reparo. Para isso foi utilizada a versão neutra do ensaio cometa, que apenas detecta esse tipo de dano. Como esperado, as células silenciadas não apresentaram caudas no período de estudo, ao contrário da linhagem selvagem, que exibiu um pico de quebra na molécula de DNA 4h após a



exposição ao agente, indicando que existe a formação de DSBs nas selvagens, como parte do processo de reparo das lesões induzidas pela cisplatina, mas não na linhagem silenciada. Na versão alcalina do ensaio cometa, observa-se que eventualmente as células silenciadas apresentam quebras ao longo da cinética de reparo, o que poderiam representar a formação de DSBs tardias como resolução dos ICLs. Nesse caso, outras proteínas, incluindo diferentes isoformas de Nek, podem eventualmente ocupar a função da Nek1, mas parece que essa resposta é mais lenta, assim como nas lesões induzidas por MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e RI (Chen *et al.* 2008; Pelegriani *et al.* 2010).

Para confirmar os resultados obtidos pelo ensaio cometa, utilizou-se a técnica de *Host Cell Reactivation* (HCR) para avaliar o envolvimento direto da Nek1 no reparo dos ICLs. O ensaio de HCR é uma técnica usada para estimar a capacidade de reparo de uma célula frente a uma lesão no DNA. Neste método, a célula hospedeira é transfectada com um plasmídeo, ou transduzida com vírus recombinante, contendo um gene repórter cuja expressão é alterada através de lesões induzidas por agentes genotóxicos. A habilidade da célula em reparar as lesões do plasmídeo, ou do vírus transfectados/transduzidos, permite que o gene repórter tenha sua expressão reativada, com o conseqüente aumento de sua atividade proteica. Assim, o uso de genes repórteres, como o que expressa a proteína luciferase utilizada nesse ensaio, permite a avaliação do reparo de DNA celular a partir da determinação da atividade do gene transcrito, que é reduzida na presença de lesões. Dessa forma, é possível comparar linhagens e avaliar sua capacidade de reparo (Johnson & Latimer 2005). Nesse ensaio foram utilizados os quimioterápicos cisplatina e ACNU como agentes indutores de ICLs, e observou-se que as células silenciadas para Nek1 obtiveram uma capacidade inferior em restabelecer a atividade do gene repórter no tratamento com cisplatina em relação as células selvagem, mas o mesmo não aconteceu com o tratamento para ACNU.

Apesar de ambos quimioterápicos produzirem lesões do tipo ICLs, seus mecanismos de ação na molécula de DNA são diferentes. A cisplatina forma adutos bifuncionais, preferencialmente na posição N7 da guanina, que distorcem a molécula de DNA, e existem mais de 20 proteínas descritas no reconhecimento dessas lesões, entre elas a hMSH2 ou hMutS, HMG1 e HMG2, TBP e a RNAPolII (Jamieson & Lippard

1999; Woźniak & Błasiak 2002). O ACNU é um agente cloroalquilante cuja primeira lesão formada na célula é a  $O^6$ -cloroetilguanina, um aduto instável que leva a formação de intermediários tóxicos que se não forem reparados, resultam em ICLs. Esses adutos são reparados através da ação da  $O^6$ -metilG-DNA metiltransferase (MGMT). Cloroetilnitrosureias, como o ACNU, geram ICLs entre a posição  $N^3$  da citosina com a posição  $N^1$  da guanina da fita oposta (Ludlum 1997). Uma explicação para o resultado observado pode estar no fato desses compostos gerarem lesões distintas, reconhecidas por mecanismos independentes, embora compartilhem vias de reparo semelhantes. Entretanto, não se pode ignorar o fato da técnica de HCR utilizar um plasmídeo não replicativo, e talvez o papel desempenhado pela Nek1 no reparo das lesões induzidas por cisplatina seja dependente da replicação. Nesse caso, para descartar o envolvimento dessa quinase no reparo das lesões induzidas por ACNU, um estudo mais detalhado utilizando esse agente deve ser feito, como um ensaio de cinética de reparo utilizando o ensaio cometa, feito anteriormente com cisplatina. Além disso, seria interessante usar outro agente indutor de ICLs para confirmar os resultados obtidos até então.

### ***A Nek1 pode estar envolvida no reparo ou na formação de DSBs?***

Previamente, foi sugerido que a Nek1 estava envolvida no reconhecimento e reparo de lesões do tipo quebras de dupla fita (Polci *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008) e, através desses ensaios utilizando cisplatina, observou-se a incapacidade da linhagem silenciada para Nek1 em formar DSBs. Entretanto, ambos eventos não são excludentes, pois as DSBs induzidas por RI e UV, mencionadas nos estudos anteriores, são formadas por mecanismos distintos daquelas geradas no reparo de ICLs. As quebras induzidas por RI e UV são provocadas pelo ataque dos agentes à molécula de DNA, e mutantes radiosensíveis geralmente possuem defeitos relacionados ao reparo de DSBs. No caso do tratamento com indutores de ICLs, esse tipo de lesão é gerado como resultado do processamento do dano, e não pelo ataque direto do agente à molécula de DNA. Mutações em genes envolvidos no reparo de *crosslinks* podem alterar a formação e a resolução das DSBs, tornando as células mais sensíveis a diferentes agentes. Em mamíferos, sabe-se que parte da via NER participa

do reparo dos *crosslinks* sendo responsável pela clivagem das fitas. Estudos demonstram a importância das endonucleases XPF-ERCC1, Mus81-Eme1 e SLX4, e da exonuclease SNM1A na clivagem das fitas lesadas e na formação de DSBs em resposta a ICLs. Entretanto, algumas questões sobre esse processo permanecem em aberto. Uma questão fundamental a ser respondida é se todas as diferentes endonucleases estão envolvidas na etapa de incisão, atuando ao mesmo tempo, ou são recrutadas especificamente e sequencialmente para os sítios de ICL dependendo do contexto em que estas lesões são reconhecidas ao longo das fases do ciclo celular. Um segundo ponto que ainda precisa ser esclarecido trata-se de como as nucleases são reguladas, no tempo e no espaço, durante o reparo dos ICLs. Atualmente, a ideia mais aceita implica que as nucleases atuam dependendo do contexto pelo qual o ICL é detectado pela forquilha de replicação e de acordo com a fase do ciclo na qual a célula se encontra. Por isso existem tantas contradições na literatura sobre o papel dessas enzimas (Sengerová *et al.* 2011).

Um dos motivos pelos quais as células silenciadas para Nek1 não apresentam DSBs no cometa neutro, e possuem um reparo mais lento após a indução de danos por cisplatina, pode ser o comprometimento do ciclo celular apresentado por essas células. Além disso, a Nek1 mostrou-se envolvida na resposta rápida a diferentes agentes genotóxicos e proteínas envolvidas no início da rota de reparo ao DNA, como a ATR e a ATM, são encontradas ativas logo após a indução de dano ao material genético, e participam das etapas de checagem para a parada do ciclo e reparo, pois alguns tipos de lesão, como as DSBs, são mais letais e requerem uma resposta rápida da célula (Shiloh 2003). A indução dos pontos de checagem de ciclo representa um mecanismo amplamente distribuído na natureza, que tem como objetivo fornecer tempo adicional para a reparação, limitando a progressão de células com danos no DNA não reparado em fases críticas do ciclo celular, tais como replicação e mitose. Embora seja uma estratégia eficiente em limitar e propagar a instabilidade genômica, esses mecanismos abrigam limitações intrínsecas. (Löbrich & Jeggo 2007; Deckbar *et al.* 2010; Deckbar *et al.* 2011). Nem todos os tipos de dano ao DNA são capazes de iniciar um processo de sinalização e, portanto, a indução da etapa de checagem. Além disso, mutações em

componentes dessas vias permitem a propagação e acúmulo de danos, contribuindo para a oncogênese (Jeggo & Löbrich 2006).

Outras Neks já se mostraram envolvidas na regulação do ciclo celular e nas etapas de checagem (Moniz *et al.* 2011). O primeiro membro estudado, a proteína Nima, foi identificada devido sua importância na regulação do ciclo celular do fungo *Aspergillus nidulans*. A superexpressão de NIMA em células de vertebrados causa entrada prematura na mitose e mutantes na qual essa proteína é inativada apresentam parada em G2 (Lu & Hunter 1995b, a). Outras Neks de mamíferos, como a Nek2, 6, 7 e 9 parecem desempenhar papel na regulação do ciclo celular, atuando na separação do centrôssomo durante a mitose e na formação do fuso mitótico (Moniz *et al.* 2011).

### ***O silenciamento da Nek1 altera as etapas de controle do ciclo celular após indução de dano***

Um estudo avaliando o efeito do silenciamento da Nek1 na progressão do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizado utilizando os agentes MMS, peróxido de hidrogênio e cisplatina. As células silenciadas falharam em parar o ciclo quando tratadas com MMS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em contraste com as selvagens, que apresentaram parada significativa em G2/M com 24 h e 48h de tratamento. A Nek1 parece ser importante para a etapa de controle em G2/M induzidos por MMS e peróxido com grande perda da parada após esses tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados em células deficientes em Nek1 que após exposição a RI, falharam em parar em G1/S e G2/M (Chen *et al.* 2008).

Em contraste, o tratamento com cisplatina parece provocar uma parada na fase S em ambas as linhagens que apresentaram um aumento da população de células 4N, apesar do retardo marcante na reparação de ICLs observado nas células silenciadas. Uma provável hipótese é que enquanto as células selvagens param devido a ativação de um ponto de checagem em G2/M, células Nek1 silenciadas ficam presas no final de S, com um conteúdo de DNA 4N devido à ICLs não resolvidas. Isto é corroborado pela ausência de DSBs nas silenciadas logo após o tratamento com CPT, sugerindo que Nek1 é importante para a formação das DSBs como uma etapa crucial para a resolução de ICLs que ocorre predominantemente na fase S do ciclo.

Esses dados demonstram que a Nek1 é importante para a ativação adequada das etapas de controle do ciclo e do reparo do DNA. Células deficientes em Nek1 não conseguem parar em G1/S ou G2/M. Esse controle defeituoso pode estar associado a falhas em ativar efetivamente as principais quinases Chk1 e Chk2. Por isso foi realizado um estudo de imunodeteção dessas quinases após a indução de danos por cisplatina. Tanto a Chk1 quanto a Chk2 não foram ativadas adequadamente através da fosforilação na linhagem silenciada em sítios específicos. Sob indução de dano por IR e UV, células negativas para Nek1 também falharam em ativar Chk1 e Chk2 através da fosforilação (Chen *et al.* 2008).

### ***A importância da fase S para o reparo de lesões ICLs***

Alguns estudos demonstram que o reparo das ICLs está acoplado a replicação do DNA que ocorre na fase S. Geralmente agentes indutores desse tipo de lesão provocam paradas nessa fase (Banáth *et al.* 2010). É nesse momento que o material genético está sendo duplicado e a forquilha de replicação está avançando na molécula de DNA. Provavelmente, componentes da forquilha servem como sensores para esse tipo de dano e sinalizam recrutando moléculas responsáveis no reparo dessas lesões, uma vez que é principalmente na fase S que ocorre excisão dos ICLs e a ativação da via de Fanconi (Akkari *et al.* 2001). Mutantes para essa via apresentam parada prolongada em S, indicando a importância dessas proteínas para o reparo de ICLs nessa fase. Somado a isso, quebras cromossômicas e a formação de DSBs ocorrem também ao longo da fase S (Akkari *et al.* 2001; Pichierri & Rosselli 2004b). A H2AX é fosforilada em S quando as células são tratadas com cisplatina, pois no reparo dos ICLs, a etapa de corte das fitas via NER (XPF/ERCC1) ocorre durante a replicação, então, essa fase é crucial para o reparo desses adutos (Olive & Banáth 2009).

### ***A ausência da Nek1 pode comprometer a sinalização em resposta a danos induzidos por cisplatina?***

Células silenciadas para Nek1 possuem reparo deficiente de lesões induzidas por cisplatina e a etapa de desenrolamento e excisão das fitas parece estar prejudicada. Uma vez que o reparo de ICLs estimula o surgimento de foci de  $\gamma$ -H2AX

através do surgimento de DSBs durante a fase S, realizou-se um ensaio de imunodeteção da forma fosforilada dessa histona para confirmar a ausência de DSBs nessas células em diferentes períodos após a exposição à cisplatina. Células selvagens apresentaram a fosforilação rápida de H2AX, mas o mesmo não é observado nas células silenciadas, confirmando o resultado obtido anteriormente no ensaio cometa.

Uma vez que o reparo dos ICLs se mostrou comprometido na etapa de formação de DSBs, buscou-se efeito da Nek1 em outros componentes da via de reparação. Através de ensaios de imunodeteção, foi demonstrado que células silenciadas para Nek1 apresentam um atraso no aparecimento da forma mono-ubiquitinada de FANCD2 e na fosforilação de BRCA1 em comparação a selvagem quando tratadas com cisplatina. Não existe um consenso na literatura se ressecção das fitas lesadas é necessária para a monoubiquitinação da FANCD2 ou o contrário. Mais recentemente tem se atribuído a componentes da via de Fanconi a regulação do processo de excisão das fitas lesadas e não apenas aos componentes de NER (Crossan & Patel 2012). Segundo o modelo clássico, FANCD2 é monoubiquitinada por componentes do complexo 1 da via de Fanconi durante a fase S do ciclo, após o encontro da forquilha de replicação com o ICL. A FANCD2-ub interage com BRCA2 formando o complexo 2 com outras moléculas e possibilita a continuidade do processo de reparo através da recombinação homóloga (HR) ou síntese translesão (TLS). As DSBs geradas na fase S podem ser reparadas por HR. A função de BRCA1 ainda não está totalmente estabelecida, mas ela faz parte da via de reparo por HR e colocaliza com Rad51 em sítios de síntese de DNA após parada da replicação reforçando a ação desse complexo (Long & Walter 2012). A FANCD2 monoubiquitinada é encontrada associada com BRCA1, BRCA2, Rad51, PCNA e NBS1, proteínas da via de HR (Moldovan & D'Andrea 2009). Esses achados são fortes indícios de que a Nek1 pode estar atuando não apenas como uma quinase sensora no início da resposta a danos ao DNA em geral, mas faz parte de uma rede de sinalização mais específica de reparo de lesões induzidas por cisplatina, como as ICLs.

Contudo, não se pode descartar a idéia de que a Nek1 participe como uma quinase indutora de pontos de checagem de ciclo dependente de danos, uma vez que

sua ausência parece alterar a parada em G1/S e G2/M na presença de danos ao DNA induzidos por alguns agentes. Lesões tipo ICL formam distorções na molécula de DNA que bloqueiam processos vitais para a célula como a transcrição e a replicação e por isso são muito tóxicas. O principal ponto de checagem dessas lesões acontecem na fase S, durante o andamento da forquilha de replicação e a continuidade do ciclo frente a não resolução dessas pode ser fatal para a célula. Então, mesmo que um componente da maquinaria de sinalização de dano ou reparo esteja ausente, o que poderia ser o caso da Nek1, o progresso do ciclo fica comprometido fisicamente. Enquanto que para outros agentes existem diferentes tipos de mecanismo de resistência descritos envolvendo genes de reparo e supressores tumorais, os agentes indutores de *crosslinks* como a cisplatina estão relacionados principalmente com a captação do agente pela célula (Kartalou & Essigmann 2001).

Células eucariotas encontraram uma alternativa para esse tipo de problema, desenvolvendo vias sinalizadoras interligadas e redundantes e por esse motivo encontramos na natureza organismos deficientes para um gene sem apresentar um fenótipo letal. Ao mesmo tempo que mais de uma molécula é encontrada realizando a mesma função, pode-se encontrar uma proteína realizando muitas funções.

As quinases sensoras de dano ATM e ATR são exemplos bem caracterizados de proteínas que desempenham muitas funções como integradoras de diferentes vias de reparação. ATM atua principalmente em resposta a DSBs e ATR é acionada durante a fase S pela replicação do DNA (Cimprich & Cortez 2008). Sendo a Nek1 uma quinase envolvida em DDR, é de se esperar que exista uma interação entre essas proteínas. Um trabalho realizado recentemente caracterizou as consequências da inativação de ATM e ATR na função de Nek1 e vice-versa em resposta a danos induzidos por RI (Chen *et al.* 2011b). A expressão e a atividade quinásica de Nek1 bem como sua localização em foci de dano ao DNA permaneceram intactos em células deficientes para ATM ou ATR. As principais atividades de ATM e ATR também se conservaram em células deficientes para Nek1, indicando que a via de atuação da Nek1, nesse caso, não é diretamente dependente das atividades de ATM ou ATR.

***A Nek1 é uma proteína citoplasmática capaz de circular pelo núcleo celular***

Outro ponto importante a ser discutido a respeito do papel da Nek1 é sobre a sua localização celular. A Nek1 apresenta em sua sequência dois domínios clássicos de localização nuclear (*Nuclear Localization Signals- NLS*) embora ela pareça ser predominantemente citoplasmática. Estudos mostram que ela circula entre o núcleo e o citoplasma (Feige *et al.* 2006; Hilton *et al.* 2009) e a exposição de células humanas a diferentes agentes indutores de dano ao DNA incluindo RI, UV, MMS, Peróxido de Hidrogênio, Cislplatina, Mitomicina C, inibidores de Topoisomerase e Andriamicina provoca a redistribuição da Nek1 citoplasmática para o núcleo das células (Chen *et al.* 2008), indicando que a Nek1 pode atuar em diferentes compartimentos celulares em situações fisiológicas distintas. Existe a possibilidade dessa quinase ser uma molécula circulante entre os compartimentos celulares e, a partir da relação com outras proteínas, estabelecer interações que possibilitem permanecer em um determinado local ou trafegar através da célula.

### ***Mutações em Nek1 são associadas a patologias em humanos***

Modificações pos-translacionais, além das interações proteicas, também são importantes fatores regulatórios na localização e função de uma proteína. A análise fosfoproteômica realizada a partir de cérebros em desenvolvimento de camundongo identificou três resíduos capazes de serem fosforilados de Nek1 (Ballif *et al.* 2004). Esses achados são muito promissores e merecem uma atenção maior uma vez que camundongos deficientes em Nek1 apresentam defeitos de desenvolvimento que incluem má formação, anemia, anormalidades neurológicas, esterilidade no macho e doença policística renal progressiva, semelhante a PKD de humanos (Upadhyya *et al.* 2000). Em humanos, por outro lado, mutações da Nek1 foram encontradas em biopsias de pacientes com diferentes tipos de tumores que estão apresentados na Tabela 5 (Davies *et al.* 2005).

Por se tratar de uma quinase pouco conhecida e que apenas na última década teve sua função estudada, é de se esperar poucos estudos associando mutações da Nek1 a tumores em humanos, como apresentado na tabela 5. Porém, isso não significa que essa proteína não esteja envolvida com predisposições ou surgimento de tumores. Ao contrário, espera-se cada vez mais associações visto que células deficientes para



Nek1 sofrem mitose desordenada, apresentam aberrações cromossômicas e tornam-se aneuplóides após múltiplas divisões celulares, adquirindo atividade de células transformadas (Chen *et al.* 2011a). A aneuploidia é uma característica comum em tumores humanos e tem sido relacionada ao processo de tumorigênese, contribuindo para a progressão do tumor. Em animais idosos é observado a ocorrência de aneuploidia espontânea associada ao surgimento de tumores, mas apenas em frequências modestas de aneuploidias, indicando que esse processo pode atuar tanto a favor da progressão tumoral quanto como um tipo de supressor, uma vez que uma maior instabilidade genética pode levar as células a outros eventos como morte celular e senescência, além de um aumento a sensibilidade a agentes anti-tumorais (Weaver *et al.* 2007). Estas células deficientes, para Nek1 e anormais, obtêm a capacidade de crescer independente da inibição por densidade e de ancoragem, sendo capazes de formar tumores quando inoculadas em camundongos. Nek1 também parece funcionar como um supressor tumoral, visto que camundongos heterozigotos Nek1/kat2j desenvolvem tumores, especialmente linfomas, com maior incidência quando comparados com animais selvagens. Através desses estudos, observa-se a importância da Nek1 para a preservação da informação genética, através da regulação e fidelidade da segregação cromossomal.

A Nek1, como outras quinases e Nrks, pode não ser essencial para a entrada ou para a progressão da mitose, mas ao invés disso, talvez ela seja importante para a regulação e fidelidade da segregação cromossomal. Em linhagem de epitélio de rim de camundongo, transcritos de Nek1 se localizam no centrossomo na interfase associados com o polo do fuso mitótico durante a mitose (Mahjoub *et al.* 2005) e células deficientes em Nek1 desenvolvem aberrações cromossômicas durante a mitose, tornando-se aneuplóides depois de muitas divisões celulares (Chen *et al.* 2011a). Além disso, a exposição de células deficientes em Nek1 a RI provoca mais quebras cromossômicas como resultado de um reparo defeituoso (Chen *et al.* 2008). Somando ao seu envolvimento na resposta a danos ao DNA, a Nek1 parece ser um importante protetor do genoma.

**Tabela 5: Mutações de Nek1 encontradas em amostra tumores de diferentes tecidos de humanos.**

Tecido Primário	Histologia	Subtipo Histológico	Fonte da amostra	Zigosidade	Mutação AA	Mutação PB
Estômago	carcinoma	adenocarcinoma	biópsia de tumor	heterozigoto	E752G	2255A>G
Pulmão	carcinoma	Carcin. de cels. não pequenas	cultura de células	desconhecido	A294P	2255A>G
Pulmão	carcinoma	Carcin. de cels. Grande	biópsia de tumor	heterozigoto	E25K	73G>A
Intest. Grosso	carcinoma	adenocarcinoma	biópsia de tumor	heterozigoto	N181N	543T>C
Ovário	carcinoma	carcinoma seroso	biópsia de tumor	heterozigoto	C191F	572G>T
Ovário	carcinoma	carcinoma seroso	biópsia de tumor	heterozigoto	K779N	2337A>T
Intest. Grosso	carcinoma	adenocarcinoma	desconhecido	desconhecido	S1047S	3141G>A
Intest. Grosso	carcinoma	adenocarcinoma	desconhecido	desconhecido	F1230L	3690C>A
Intest. Grosso	carcinoma	adenocarcinoma	desconhecido	desconhecido	R608C	1822C>T
Intest. Grosso	carcinoma	adenocarcinoma	desconhecido	desconhecido	L943V	2827T>G

Adaptado de *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* disponível em <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>.

Além de associada a tumores, mais recentemente, mutações no gene da Nek1 foram encontradas em neonatos diagnosticados com a Síndrome de Costela Curta e Polidactilia tipo Majewski (SCCPM), uma osteocondrodisplasia autosomal-recessiva letal, que é classificada em quatro tipos principais de acordo com as características e mutações apresentadas pelos portadores (Thiel *et al.* 2011). Mutações em Nek1 foi encontrada no tipo II, cujas características principais são ossos tubulares curtos com extremidades lisas, polidactilia pré e pós-axial e osso tibial curto ou ausente. Outras características incluem lábio leporino e fenda palatina, malformações da epiglote e laringe, hipoplásia torácica, policistos renais, anormalidades intestinais e de múltiplos órgãos (Naki *et al.* 2005). A SCCPM está associada a mutações em genes que codificam proteínas envolvidas na manutenção, na formação e na função correta dos cílios e por isso, é considerada uma ciliopatia de desenvolvimento. Foi demonstrado anteriormente que a Nek1 é importante para a manutenção do centrosomo e para a ciliogênese, regulando a montagem e a desmontagem dos cílios ao longo da mitose (Shalom *et al.* 2008; White & Quarmby 2008). Alterações nessa proteína, associadas a outras mutações, podem levar a um fenótipo severo, como o observado na SCCPM. Em animais deficientes em Nek1, observam-se algumas características semelhantes às

encontradas nos pacientes humanos, como problema de desenvolvimento e policistos renais, entretanto, essas características apresentam-se mais severas em humanos portadores da SCCPM por esses apresentarem mutações associadas, geralmente aparecendo em homozigose e fruto de casamentos/relações consanguíneas (o que favorece o surgimento de mutações em homozigose).

### ***Estudos de interação proteica***

Em vista de todos os dados apresentados, não resta dúvidas sobre o envolvimento da Nek1 na resposta a danos ao DNA. No entanto, os estudos realizados até então, mesmo aqueles buscando o efeito da Nek1 na sinalização de vias de reparo, parecem ensaios de tentativa e erro, nos quais se busca o efeito da presença da Nek1 (e muitas vezes, da ausência) em uma determinada situação e se compara com o estado oposto. Esse tipo de abordagem é muito importante para o início de um estudo, para se estabelecer um nicho de atuação e adquirir experiência no assunto. Mas para entender a função biológica de uma molécula é necessário passar para uma nova etapa, investindo em outro tipo de abordagem.

O comentário sobre a regulação das proteínas envolvidas na PKD feito por Dutcher & Lin evocando o conto infantil “cachinhos dourados e os três ursos ” ilustra perfeitamente este ponto de vista (Dutcher & Lin 2011). No conto infantil, a menina procura por itens na casa dos ursos, através da tentativa e erro, que lhe encaixem melhor e os autores afirmam que a regulação dessas proteínas não pode ser feita dessa forma.

No estudo da função da Nek1 alguns nichos de atuação já foram estabelecidos e agora é preciso avançar através de ensaios mais específicos para estabelecer, de fato, a via de ação dessa quinase. Em meio a isso, estudos de interação proteica emergem como uma transição entre duas fases de um trabalho. Ao mesmo tempo que os dados de um ensaio de interação podem significar o começo de uma abordagem, inclusive baseada em dados de “tentativa e erro”, por outro lado, esse tipo de estudo pode fornecer ferramentas necessárias para desvendar o papel de uma molécula em determinado mecanismo biológico.

Um estudo anterior buscando proteínas que interagissem com a Nek1 fora realizado através de um ensaio de duplo híbrido em leveduras (Surpili *et al.* 2003). Foram encontradas 11 proteínas funcionalmente divididas em três grupos: no primeiro foram destacadas proteínas de transporte e montagem celular, incluindo a proteína de transporte motor KIF3A; a proteína sinalizadora tuberina e uma homóloga a  $\alpha$ -catulina; o segundo grupo inclui as proteínas relacionadas a resposta a danos ao DNA, destacando-se uma homóloga da Rad54, a ATRX, a 53BP1, a Mre11A, a subunidade regulatória B56 da PP2A e a YWHAH; e o terceiro grupo é formado por proteínas que atuam no desenvolvimento de prolongamentos neuronais, a Fez-1 e a Fez-2 (Bloom & Horvitz 1997).

Posteriormente, foi mostrado o envolvimento da Nek1 com uma proteína da membrana mitocondrial, a VDAC1, através da sua fosforilação. A relação entre essas proteínas pode alterar a permeabilidade mitocondrial e provocar a morte celular. A partir desses achados foi montado um possível modelo de atuação da Nek1 frente a danos, na qual a ausência da Nek1 tornaria a célula mais suscetível a morte pela instabilidade do potencial da membrana mitocondrial (Chen *et al.* 2009). Mais recentemente, foi proposto a interação da Nek1 com a proteína TAZ, uma E3 ubiquitina ligase, atuando em um sistema de regulação dos níveis de policistina 2 (PKD2) através da fosforilação e ubiquitinação dessas moléculas (Yim *et al.* 2011). Essa interação explicaria o papel da Nek1 na cilogênese e no surgimento das patologias associadas a cílios, como a PKD e SCCPM.

### ***A Nek1 pode estar participando de diferentes eventos celulares através da interação com moléculas dinâmicas, como as ubiquitinas ligases***

Os ensaios realizados em situação de indução de lesão ao DNA não mostraram a interação direta de proteínas com a Nek1, embora observaram-se alterações na sinalização da resposta a danos na ausência dessa quinase. Com o objetivo de tentar localizar a Nek1 dentro de uma via de sinalização e encontrar proteínas que interajam com ela, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação seguida da análise por espectrometria de massas. A vantagem do ensaio em células eucarióticas em relação aos realizados anteriormente utilizando o duplo híbrido em modelo de levedura é que,

nesse caso, as condições do modelo estudado podem ser manipuladas, induzindo uma situação de estresse genotóxico que poderá ser comparada posteriormente à fisiológica. Entre as proteínas encontradas nesse estudo se destacam as quinesinas e as enzimas relacionadas a ubiquitinas e proteínas relacionadas a essas, além de algumas relacionadas a resposta a dano e sinalização celular.

Um estudo anterior já havia mostrado a possível interação da Nek1 com a KIF3A, demonstrando a ligação dessas proteínas com o transporte motor. As quinesinas (também conhecidas como KIFs) são importantes motores moleculares que transportam diversas cargas dentro das células, incluindo organelas membranosas, complexos de proteínas e mRNAs. Essas proteínas são reguladas através de sua fosforilação, que promove a formação de complexos entre as KIFs e as moléculas cargas, e também entre outras proteínas acopladoras. Diferentes membros dessa família podem ter uma função sobreposta, garantido a manutenção da fisiologia celular. Defeitos nos mecanismos de transporte nas células podem acarretar em alterações no desenvolvimento e predisposição a tumores (Hirokawa *et al.* 2009).

As proteínas relacionadas a ubiquitinação encontradas no ensaio foram bastantes numerosas e se destacam por participarem de diferentes processos dentro das células. O principal papel associado a ubiquitinação está na degradação de proteínas, entretanto, é igualmente importante na regulação de diversos eventos celulares que incluem a apoptose, a progressão do ciclo celular, a transcrição gênica, o transporte celular, a infecção viral e o reparo do DNA. Esse processo envolve três etapas sequenciais dependente de enzimas diferentes: a enzima ativadora da ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e a enzima ubiquitina-ligase (E3). A região C-terminal da ubiquitina é ativada através da formação de uma ligação tioéster dependente de ATP com a enzima E1. A ubiquitina é transferida para a enzima E2, podendo liberar a enzima E1. O passo final catalisa adição covalente da ubiquitina a um resíduo de lisina no substrato alvo. Isto pode ocorrer através da transferência direta da enzima E2 em uma reação facilitada por E3, ou através da transferência da ubiquitina para a E3, formando um intermediário antes da conjugação com o substrato. A especificidade ao substrato é determinada pelo recrutamento de cerca de 40 enzimas E2 diferentes e das mais de 500 diferentes tipos de ligases E3. Uma proteína alvo pode

receber uma molécula de ubiquitina (mono-ubiquitinada) ou muitas (poli-ubiquitinada) por reação. A desubiquitinação também é um processo controlado e importante na regulação de diferentes mecanismos celulares (Ramaekers & Wouters 2011).

O papel da ubiquitinação em vias de reparo de DNA está bem estabelecido para alguns mecanismos, como na via de tolerância a danos (síntese translesão) através da ubiquitinação de PCNA, uma proteína que atua juntamente com as enzimas polimerases aumentando a sua processividade. Quando ubiquitinada, essa proteína é capaz de promover a dissociação da polimerase de replicação e recrutar outras capazes de ultrapassar as lesões (Gan *et al.* 2008). Esse mecanismo é recrutado em danos do tipo ICL e parecem atuar em paralelo à via de Fanconi (Ho & Schärer 2010). Entre as proteínas identificadas no ensaio de interação proteica estão, além de ubiquitinas, a PAF, um fator associado ao PCNA, que parece interagir com BRCA1 e se localiza no centrossomo (Kais *et al.* 2011). A ubiquitinação de proteínas também é um fenômeno importante para a sinalização de DSBs e para o recrutamento de moléculas efetoras para o local da lesão. Uma ubiquitina E3 ligase encontrada nos ensaios, HERC2, é fosforilada após a indução de danos do tipo DSB e interage com RNF8, outra E3 ligase, sendo importante para o recrutamento de 53BP1 e BRCA1 para o local da lesão (Bekker-Jensen *et al.* 2010).

Entre outras proteínas encontradas estão as proteínas da via de Fanconi FancB e FancG. Essas proteínas fazem parte de um complexo de moléculas que promove a mono-ubiquitinação da FancD2 e da FancI, os quais são processos chave para o reconhecimento das ICLs (Moldovan & D'Andrea 2009).

Esses achados sugerem que a Nek1 pode estar atuando em diferentes mecanismos celulares direta ou indiretamente, através principalmente de processos envolvendo a ubiquitinação. Em vista de todos esses dados, essa quinase se destaca como objeto de futuros estudos nas diferentes funções evidenciadas aqui, devido seu papel multi-tarefa. A Nek1 parece ser uma quinase integradora de diferentes processos celulares, sendo ativada a partir de estímulos distintos e de acordo com o tipo celular, o que a torna um importante alvo para terapias, através da modulação de sua atividade, principalmente durante o desenvolvimento do organismo e durante o processo de formação de tumores.

## VI. CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados contidos nesta tese é possível concluir:

1. A Nek1 é uma quinase que atua em resposta a danos ao DNA induzidos por diferentes agentes;
2. Células silenciadas para Nek1 apresentam um reparo mais lento de danos ao DNA, induzidos por diferentes tipos de agentes lesantes do material genético;
3. Esse defeito nos mecanismos de reparo se deve a alteração na sinalização em resposta ao dano que se mostrou incompleta, inclusive envolvendo as etapas de checagem do ciclo celular;
4. O somatório de erros na resposta de danos ao DNA nas células com a Nek1 ausente pode levar a instabilidade genômica e eventos que culminam na transformação celular e tumorigênese ou na morte celular, e por isso as células silenciadas apresentam maior sensibilidade aos agentes genotóxicos;
5. A ativação de vias de reparo de ICLs via Fanconi/BRCA1 está prejudicada nas linhagens silenciadas após exposição à cisplatina, e resultados preliminares sugerem que a Nek1 pode estar atuando nesse processo através de alguns membros da própria via de Fanconi, e pela interação com proteínas ubiquitina ligase;

## VII. PERSPECTIVAS

Embora o conjunto de dados obtidos nesse trabalho tenha resultado em diferentes conclusões sobre o papel da Nek1 na resposta a indução de danos ao DNA, restam algumas questões que implicam nas seguintes perspectivas de trabalho:

1. Estudar a localização da Nek1 na via de reparo de ICL através de modelos celulares deficientes em XPF e componentes da via de Fanconi, avaliar a atividade da Nek1 nessas células;
2. Realizar ensaio de localização celular com células tranfectadas com Nek1 fusionada a GFP após o tratamento com agentes indutores de *crosslink*, pois proteínas que atuam no reparo de danos ao DNA são capazes de migrar para o núcleo em situações de estresse genotóxico;
3. Comprovar o efeito visto no HCR com ACNU através do ensaio cometa e verificar o efeito do silenciamento da Nek1 na sinalização de diferentes proteínas envolvidas na resposta a dano de DNA, após a exposição a esse agente;
4. Estudar a colocalização da Nek1 com proteínas envolvidas no reparo de ICLs através de imunocitoquímica;
5. Avaliar o efeito do silenciamento da Nek1 no ciclo celular após a exposição a outros agente indutores de ICL, e ver simultaneamente o perfil de outras proteínas, como a fosforilação de H2AX e a ubiquitinação de FANCD2;
6. Estudos de interação proteica.



## VIII. REFERÊNCIAS

- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A., D'Andrea A.D., Olson S.B. & Grompe M. (2001). The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol Genet Metab*, 74, 403-12.
- Almeida G.M., Duarte T.L., Steward W.P. & Jones G.D. (2006). Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. *DNA Repair (Amst)*, 5, 219-25.
- Anderson L., Henderson C. & Adachi Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*, 21, 1719-29.
- Arama E., Yanai A., Kilfin G., Bernstein A. & Motro B. (1998). Murine NIMA-related kinases are expressed in patterns suggesting distinct functions in gametogenesis and a role in the nervous system. *Oncogene*, 16, 1813-23.
- Arellano M. & Moreno S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 559-73.
- Ballif B.A., Villén J., Beausoleil S.A., Schwartz D. & Gygi S.P. (2004). Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol Cell Proteomics*, 3, 1093-101.
- Bannister L.A. & Schimenti J.C. (2004). Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res*, 107, 191-200.
- Banáth J.P., Klovov D., MacPhail S.H., Banuelos C.A. & Olive P.L. (2010). Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 10, 4.
- Barbacid M., Ortega S., Sotillo R., Odajima J., Martín A., Santamaría D., Dubus P. & Malumbres M. (2005). Cell cycle and cancer: genetic analysis of the role of cyclin-dependent kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 233-40.
- Barnes D.E. & Lindahl T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*, 38, 445-76.
- Bekker-Jensen S., Rendtlew Danielsen J., Fugger K., Gromova I., Nerstedt A., Lukas C., Bartek J., Lukas J. & Mailand N. (2010). HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol*, 12, 80-6; sup pp 1-12.
- Belham C., Roig J., Caldwell J.A., Aoyama Y., Kemp B.E., Comb M. & Avruch J. (2003). A mitotic cascade of NIMA family kinases. Ncc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem*, 278, 34897-909.
- Ben-David Y., Letwin K., Tannock L., Bernstein A. & Pawson T. (1991). A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J*, 10, 317-25.
- Beranek D.T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*, 231, 11-30.
- Bertran M.T., Sdelci S., Regué L., Avruch J., Caelles C. & Roig J. (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J*, 30, 2634-47.
- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T., Hanada K., Stuckert P., Kanaar R., D'Andrea A., Niedernhofer L.J. & McHugh P.J. (2009). XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair. *Mol Cell Biol*, 29, 6427-37.
- Bloom L. & Horvitz H.R. (1997). The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3414-9.
- Bogliolo M., Lyakhovich A., Callén E., Castellà M., Cappelli E., Ramírez M.J., Creus A., Marcos R., Kalb R., Neveling K., Schindler D. & Surrallés J. (2007). Histone H2AX and Fanconi

- anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J*, 26, 1340-51.
- Boly R., Gras T., Lamkami T., Guissou P., SerTEyn D., Kiss R. & Dubois J. (2011). Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol*, 38, 833-42.
- Bowers A.J. & Boylan J.F. (2004). Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*, 328, 135-42.
- Bressan D.A., Baxter B.K. & Petrini J.H. (1999). The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19, 7681-7.
- Caldecott K.W. (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*, 23, 447-55.
- Caldecott K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 9, 619-31.
- Canman C.E., Lim D.S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B. & Siliciano J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281, 1677-9.
- Carrillo J.A. & Munoz C.A. (2012). Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan. *Neurosurg Clin N Am*, 23, 297-306, ix.
- Chang J., Baloh R.H. & Milbrandt J. (2009). The NIMA-family kinase Nek3 regulates microtubule acetylation in neurons. *J Cell Sci*, 122, 2274-82.
- Chen C.P., Chang T.Y., Chen C.Y., Wang T.Y., Tsai F.J., Wu P.C., Chern S.R. & Wang W. (2012). Short rib-polydactyly syndrome type II (Majewski): Prenatal diagnosis, perinatal imaging findings and molecular analysis of the NEK1 gene. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 51, 100-5.
- Chen Y., Chen C.F., Chiang H.C., Pena M., Polci R., Wei R.L., Edwards R.A., Hansel D.E., Chen P.L. & Riley D.J. (2011a). Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability. *Mol Cancer*, 10, 5.
- Chen Y., Chen C.F., Riley D.J. & Chen P.L. (2011b). Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR. *Cell Cycle*, 10, 655-63.
- Chen Y., Chen P.L., Chen C.F., Jiang X. & Riley D.J. (2008). Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle*, 7, 3194-201.
- Chen Y., Craigen W.J. & Riley D.J. (2009). Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle*, 8, 257-67.
- Chen Y., Gaczynska M., Osmulski P., Polci R. & Riley D.J. (2010). Phosphorylation by Nek1 regulates opening and closing of voltage dependent anion channel 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 798-803.
- Chen Y., Riley D.J., Zheng L., Chen P.L. & Lee W.H. (2002). Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem*, 277, 49408-16.
- Cheng W.H., Kusumoto R., Opresko P.L., Sui X., Huang S., Nicolette M.L., Paull T.T., Campisi J., Seidman M. & Bohr V.A. (2006). Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Res*, 34, 2751-60.
- Christmann M., Tomicic M.T., Roos W.P. & Kaina B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193, 3-34.
- Cimprich K.A. & Cortez D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 616-27.
- Clancy S. (2008). DNA Damage & Repair: Mechanisms for Maintaining DNA Integrity. In: Nature Education.

- Collins A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26, 249-61.
- Crossan G.P. & Patel K.J. (2012). The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *J Pathol*, 226, 326-37.
- Cruet-Hennequart S., Villalan S., Kaczmarczyk A., O'Meara E., Sokol A.M. & Carty M.P. (2009). Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell Cycle*, 8, 3039-50.
- Davies H., Hunter C., Smith R., Stephens P., Greenman C., Bignell G., Teague J., Butler A., Edkins S., Stevens C., Parker A., O'Meara S., Avis T., Barthorpe S., Brackenbury L., Buck G., Clements J., Cole J., Dicks E., Edwards K., Forbes S., Gorton M., Gray K., Halliday K., Harrison R., Hills K., Hinton J., Jones D., Kosmidou V., Laman R., Lugg R., Menzies A., Perry J., Petty R., Raine K., Shepherd R., Small A., Solomon H., Stephens Y., Tofts C., Varian J., Webb A., West S., Widaa S., Yates A., Bresseur F., Cooper C.S., Flanagan A.M., Green A., Knowles M., Leung S.Y., Looijenga L.H., Malkowicz B., Pierotti M.A., Teh B.T., Yuen S.T., Lakhani S.R., Easton D.F., Weber B.L., Goldstraw P., Nicholson A.G., Wooster R., Stratton M.R. & Futreal P.A. (2005). Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res*, 65, 7591-5.
- Davies J.R., Osmani A.H., De Souza C.P., Bachewich C. & Osmani S.A. (2004). Potential link between the NIMA mitotic kinase and nuclear membrane fission during mitotic exit in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 3, 1433-44.
- Deans A.J. & West S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11, 467-80.
- Deckbar D., Jeggo P.A. & Löbrich M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46, 271-83.
- Deckbar D., Stiff T., Koch B., Reis C., Löbrich M. & Jeggo P.A. (2010). The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res*, 70, 4412-21.
- Dextraze M.E., Gantchev T., Girouard S. & Hunting D. (2010). DNA interstrand cross-links induced by ionizing radiation: an unsung lesion. *Mutat Res*, 704, 101-7.
- Doles J. & Hemann M.T. (2010). Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. *Cancer Res*, 70, 1033-41.
- Dronkert M.L., Beverloo H.B., Johnson R.D., Hoeijmakers J.H., Jasin M. & Kanaar R. (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, 20, 3147-56.
- Dronkert M.L. & Kanaar R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res*, 486, 217-47.
- Dudás A. & Chovanec M. (2004). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res*, 566, 131-67.
- Dutcher S.K. & Lin H. (2011). Tying TAZ and Nek1 into polycystic kidney disease through polycystin 2 levels. *J Am Soc Nephrol*, 22, 791-3.
- El Hokayem J., Huber C., Couvé A., Aziza J., Baujat G., Bouvier R., Cavalcanti D.P., Collins F.A., Cordier M.P., Delezoide A.L., Gonzales M., Johnson D., Le Merrer M., Levy-Mozziconacci A., Loget P., Martin-Coignard D., Martinovic J., Mortier G.R., Perez M.J., Roume J., Scarano G., Munnich A. & Cormier-Daire V. (2012). NEK1 and DYNC2H1 are both involved in short rib polydactyly Majewski type but not in Beemer Langer cases. *J Med Genet*, 49, 227-33.
- el-Khamisy S.F. & Caldecott K.W. (2007). DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Neuroscience*, 145, 1260-6.
- Essen L.O. & Klar T. (2006). Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1266-77.

- Feige E., Chen A. & Motro B. (2002). Nurit, a novel leucine-zipper protein, expressed uniquely in the spermatid flower-like structure. *Mech Dev*, 117, 369-77.
- Feige E., Shalom O., Tsuriel S., Yissachar N. & Motro B. (2006). Nek1 shares structural and functional similarities with NIMA kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 272-81.
- Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M. & Nussenzweig A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3, 959-67.
- Finst R.J., Kim P.J. & Quarmby L.M. (1998). Genetics of the deflagellation pathway in *Chlamydomonas*. *Genetics*, 149, 927-36.
- Fry A.M., Mayor T., Meraldi P., Stierhof Y.D., Tanaka K. & Nigg E.A. (1998a). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*, 141, 1563-74.
- Fry A.M., Meraldi P. & Nigg E.A. (1998b). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *EMBO J*, 17, 470-81.
- Fu D., Calvo J.A. & Samson L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, 12, 104-20.
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M. & Kroemer G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-83.
- Gan G.N., Wittschieben J.P., Wittschieben B. & Wood R.D. (2008). DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Res*, 18, 174-83.
- Garcia-Higuera I., Kuang Y., Denham J. & D'Andrea A.D. (2000). The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood*, 96, 3224-30.
- Garcia-Higuera I., Taniguchi T., Ganesan S., Meyn M.S., Timmers C., Hejna J., Grompe M. & D'Andrea A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*, 7, 249-62.
- Hakem R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J*, 27, 589-605.
- Hayward D.G., Newbatt Y., Pickard L., Byrne E., Mao G., Burns S., Sahota N.K., Workman P., Collins I., Aherne W. & Fry A.M. (2010). Identification by high-throughput screening of viridin analogs as biochemical and cell-based inhibitors of the cell cycle-regulated nek2 kinase. *J Biomol Screen*, 15, 918-27.
- He T., Xia S.X. & Zhang Y.P. (1990). [Application of DNA interstrand cross-link assay to estimate the sensitivity of tumor cells to alkylating agents]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 11, 553-5.
- Heyer W.D. (2004). Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Curr Biol*, 14, R56-8.
- Hildebrandt F., Benzing T. & Katsanis N. (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med*, 364, 1533-43.
- Hilton L.K., White M.C. & Quarmby L.M. (2009). The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 389, 52-6.
- Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y. & Niwa S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 682-96.
- Ho T.V. & Schärer O.D. (2010). Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen*, 51, 552-66.
- Hoeijmakers J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-74.
- Hoeijmakers J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 361, 1475-85.
- Holland P.M., Milne A., Garka K., Johnson R.S., Willis C., Sims J.E., Rauch C.T., Bird T.A. & Virca G.D. (2002). Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. *J Biol Chem*, 277, 16229-40.
- Holloway K., Roberson E.C., Corbett K.L., Kolas N.K., Nieves E. & Cohen P.E. (2011). NEK1 Facilitates Cohesin Removal during Mammalian Spermatogenesis. *Genes (Basel)*, 2, 260-279.

- Huan Y. & van Adelsberg J. (1999). Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest*, 104, 1459-68.
- Huang J. & Dynan W.S. (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res*, 30, 667-74.
- Huang J.C., Hsu D.S., Kazantsev A. & Sancar A. (1994). Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12213-7.
- Huangfu D., Liu A., Rakeman A.S., Murcia N.S., Niswander L. & Anderson K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426, 83-7.
- Huber C. & Cormier-Daire V. (2012). Ciliary disorder of the skeleton. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160C, 165-74.
- Huse M. & Kuriyan J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 109, 275-82.
- Innocenti P., Cheung K.M., Solanki S., Mas-Droux C., Rowan F., Yeoh S., Boxall K., Westlake M., Pickard L., Hardy T., Baxter J.E., Aherne G.W., Bayliss R., Fry A.M. & Hoelder S. (2012). Design of potent and selective hybrid inhibitors of the mitotic kinase Nek2: structure-activity relationship, structural biology, and cellular activity. *J Med Chem*, 55, 3228-41.
- Islaih M., Halstead B.W., Kadura I.A., Li B., Reid-Hubbard J.L., Flick L., Altizer J.L., Thom Deahl J., Monteith D.K., Newton R.K. & Watson D.E. (2005). Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res*, 578, 100-16.
- Jackson S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23, 687-96.
- Jamieson E.R. & Lippard S.J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, 99, 2467-98.
- Jee H.J., Kim A.J., Song N., Kim H.J., Kim M., Koh H. & Yun J. (2010). Nek6 overexpression antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. *Cell Cycle*, 9, 4703-10.
- Jeggo P.A., Geuting V. & Löbrich M. (2011). The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol*, 101, 7-12.
- Jeggo P.A. & Löbrich M. (2006). Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)*, 5, 1192-8.
- Johannessen T.C. & Bjerkvig R. (2012). Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12, 635-42.
- Johnson J.M. & Latimer J.J. (2005). Analysis of DNA repair using transfection-based host cell reactivation. *Methods Mol Biol*, 291, 321-35.
- Kaina B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*, 66, 1547-54.
- Kaina B., Christmann M., Naumann S. & Roos W.P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 6, 1079-99.
- Kais Z., Barsky S.H., Mathsyaraja H., Zha A., Ransburgh D.J., He G., Pilarski R.T., Shapiro C.L., Huang K. & Parvin J.D. (2011). KIAA0101 interacts with BRCA1 and regulates centrosome number. *Mol Cancer Res*, 9, 1091-9.
- Kanamaru R., Asamura M., Sato H., Saito S., Wakui A. & Saito T. (1980). Studies on the mechanism of action of ACNU, 1-(4-amino-2-methylpyrimidine-5-yl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride: effects on cultured HeLa S3 cells. *Tohoku J Exp Med*, 132, 431-41.
- Kartalou M. & Essigmann J.M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, 478, 23-43.

- Kawai H., Toyohara J., Kado H., Nakagawa T., Takamatsu S., Furukawa T., Yonekura Y., Kubota T. & Fujibayashi Y. (2006). Acquisition of resistance to antitumor alkylating agent ACNU: a possible target of positron emission tomography monitoring. *Nucl Med Biol*, 33, 29-35.
- Kelland L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7, 573-84.
- Kennedy R.D. & D'Andrea A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev*, 19, 2925-40.
- Kim S., Lee K. & Rhee K. (2007). NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. *Biochem Biophys Res Commun*, 360, 56-62.
- Kim S.Y., Jo H.Y., Kim M.H., Cha Y.Y., Choi S.W., Shim J.H., Kim T.J. & Lee K.Y. (2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J Biol Chem*, 283, 33563-8.
- Knobel P.A. & Marti T.M. (2011). Translesion DNA synthesis in the context of cancer research. *Cancer Cell Int*, 11, 39.
- Kondo S., Sato-Yoshitake R., Noda Y., Aizawa H., Nakata T., Matsuura Y. & Hirokawa N. (1994). KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J Cell Biol*, 125, 1095-107.
- Krogh B.O. & Symington L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*, 38, 233-71.
- Lee M.Y., Kim H.J., Kim M.A., Jee H.J., Kim A.J., Bae Y.S., Park J.I., Chung J.H. & Yun J. (2008). Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle*, 7, 2705-9.
- Letwin K., Mizzen L., Motro B., Ben-David Y., Bernstein A. & Pawson T. (1992). A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J*, 11, 3521-31.
- Lin F., Hiesberger T., Cordes K., Sinclair A.M., Goldstein L.S., Somlo S. & Igarashi P. (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5286-91.
- Lina F. & Satlin L.M. (2004). Polycystic kidney disease: the cilium as a common pathway in cystogenesis. *Curr Opin Pediatr*, 16, 171-6.
- Liu S., Lu W., Obara T., Kuida S., Lehoczy J., Dewar K., Drummond I.A. & Beier D.R. (2002). A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development*, 129, 5839-46.
- Ljungman M. (2010). The DNA damage response--repair or despair? *Environ Mol Mutagen*, 51, 879-89.
- Loehrer P.J. & Einhorn L.H. (1984). Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med*, 100, 704-13.
- Lomonosov M., Anand S., Sangrithi M., Davies R. & Venkitaraman A.R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev*, 17, 3017-22.
- Long D.T. & Walter J.C. (2012). A Novel Function for BRCA1 In Crosslink Repair. *Mol Cell*, 46, 111-2.
- Lopez P.L., Filippi-Chiela E.C., Silva A.O., Cordero E.A., Garcia-Santos D., Pelegrini A.L., Reder G.M., Barbieri N.L. & Lenz G. (2012). Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown. *Oncology*, 83, 75-82.
- Lu K.P. & Hunter T. (1995a). Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell*, 81, 413-24.
- Lu K.P. & Hunter T. (1995b). The NIMA kinase: a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* and vertebrate cells. *Prog Cell Cycle Res*, 1, 187-205.

- Lu K.P., Kemp B.E. & Means A.R. (1994). Identification of substrate specificity determinants for the cell cycle-regulated NIMA protein kinase. *J Biol Chem*, 269, 6603-7.
- Ludlum D.B. (1997). The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest*, 15, 588-98.
- Löbrich M. & Jeggo P.A. (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*, 7, 861-9.
- Mahjoub M.R., Trapp M.L. & Quarmby L.M. (2005). NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. *J Am Soc Nephrol*, 16, 3485-9.
- Malumbres M. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev*, 91, 973-1007.
- Malumbres M. & Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 222-31.
- Malumbres M. & Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 9, 153-66.
- Malumbres M. & Carnero A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res*, 5, 5-18.
- Malumbres M., Hunt S.L., Sotillo R., Martín J., Odajima J., Martín A., Dubus P., Ortega S. & Barbacid M. (2003). Driving the cell cycle to cancer. *Adv Exp Med Biol*, 532, 1-11.
- Malumbres M., Ortega S. & Barbacid M. (2000). Genetic analysis of mammalian cyclin-dependent kinases and their inhibitors. *Biol Chem*, 381, 827-38.
- Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R., Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P. & Elledge S.J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316, 1160-6.
- McCabe K.M., Olson S.B. & Moses R.E. (2009). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells. *J Cell Physiol*, 220, 569-73.
- McHugh P.J., Spanswick V.J. & Hartley J.A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol*, 2, 483-90.
- Meetei A.R., Levitus M., Xue Y., Medhurst A.L., Zwaan M., Ling C., Rooimans M.A., Bier P., Hoatlin M., Pals G., de Winter J.P., Wang W. & Joenje H. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet*, 36, 1219-24.
- Melixetian M., Klein D.K., Sørensen C.S. & Helin K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol*, 11, 1247-53.
- Memisoglu A. & Samson L. (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*, 451, 39-51.
- Miller S.L., Antico G., Raghunath P.N., Tomaszewski J.E. & Clevenger C.V. (2007). Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells. *Oncogene*, 26, 4668-78.
- Milne G.T., Jin S., Shannon K.B. & Weaver D.T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16, 4189-98.
- Mogi S. & Oh D.H. (2006). gamma-H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells. *DNA Repair (Amst)*, 5, 731-40.
- Moldovan G.L. & D'Andrea A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*, 43, 223-49.
- Moniz L., Dutt P., Haider N. & Stambolic V. (2011). Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. *Cell Div*, 6, 18.
- Moniz L.S. & Stambolic V. (2011). Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol Cell Biol*, 31, 30-42.
- Moraes M.C., Neto J.B. & Menck C.F. (2012). DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Front Biosci*, 17, 1362-88.

- Muniandy P.A., Liu J., Majumdar A., Liu S.T. & Seidman M.M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45, 23-49.
- Nakanishi K., Taniguchi T., Ranganathan V., New H.V., Moreau L.A., Stotsky M., Mathew C.G., Kastan M.B., Weaver D.T. & D'Andrea A.D. (2002). Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol*, 4, 913-20.
- Naki M.M., Gür D., Zemheri E., Tekcan C., Kanadikirik F. & Has R. (2005). Short rib-polydactyly syndrome. *Arch Gynecol Obstet*, 272, 173-5.
- Noguchi K., Fukazawa H., Murakami Y. & Uehara Y. (2002). Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J Biol Chem*, 277, 39655-65.
- Noguchi K., Fukazawa H., Murakami Y. & Uehara Y. (2004). Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem*, 279, 32716-27.
- O'Connell M.J., Krien M.J. & Hunter T. (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol*, 13, 221-8.
- O'Regan L. & Fry A.M. (2009). The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. *Mol Cell Biol*, 29, 3975-90.
- Olive P.L. & Banáth J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*, 1, 23-9.
- Olive P.L. & Banáth J.P. (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom*, 76, 79-90.
- Ong A.C. & Wheatley D.N. (2003). Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet*, 361, 774-6.
- Osmani S.A., Engle D.B., Doonan J.H. & Morris N.R. (1988a). Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, 52, 241-51.
- Osmani S.A., May G.S. & Morris N.R. (1987). Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 104, 1495-504.
- Osmani S.A., Pu R.T. & Morris N.R. (1988b). Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*, 53, 237-44.
- Otto E.A., Trapp M.L., Schultheiss U.T., Helou J., Quarmby L.M. & Hildebrandt F. (2008). NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol*, 19, 587-92.
- Pace P., Johnson M., Tan W.M., Mosedale G., Sng C., Hoatlin M., de Winter J., Joenje H., Gergely F. & Patel K.J. (2002). FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J*, 21, 3414-23.
- Parker J.D., Bradley B.A., Mooers A.O. & Quarmby L.M. (2007). Phylogenetic analysis of the Neks reveals early diversification of ciliary-cell cycle kinases. *PLoS One*, 2, e1076.
- Patel V., Chowdhury R. & Igarashi P. (2009). Advances in the pathogenesis and treatment of polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 18, 99-106.
- Patel V., Li L., Cobo-Stark P., Shao X., Somlo S., Lin F. & Igarashi P. (2008). Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet*, 17, 1578-90.
- Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M. & Bonner W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 10, 886-95.
- Pelegriani A.L., Moura D.J., Brenner B.L., Ledur P.F., Maques G.P., Henriques J.A., Saffi J. & Lenz G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, 25, 447-54.



- Pellegrini L., Yu D.S., Lo T., Anand S., Lee M., Blundell T.L. & Venkitaraman A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420, 287-93.
- Pichierri P., Auerbeck D. & Rosselli F. (2002). DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum Mol Genet*, 11, 2531-46.
- Pichierri P. & Rosselli F. (2004a). Fanconi anemia proteins and the S phase checkpoint. *Cell Cycle*, 3, 698-700.
- Pichierri P. & Rosselli F. (2004b). The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J*, 23, 1178-87.
- Polci R., Peng A., Chen P.L., Riley D.J. & Chen Y. (2004). NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res*, 64, 8800-3.
- Qiu X.L., Li G., Wu G., Zhu J., Zhou L., Chen P.L., Chamberlin A.R. & Lee W.H. (2009). Synthesis and biological evaluation of a series of novel inhibitor of Nek2/Hec1 analogues. *J Med Chem*, 52, 1757-67.
- Quarmany L.M. & Mahjoub M.R. (2005). Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J Cell Sci*, 118, 5161-9.
- Quarmany L.M. & Parker J.D. (2005). Cilia and the cell cycle? *J Cell Biol*, 169, 707-10.
- Ramaekers C.H. & Wouters B.G. (2011). Regulatory functions of ubiquitin in diverse DNA damage responses. *Curr Mol Med*, 11, 152-69.
- Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B. & Sinha R.P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*, 2010, 592980.
- Ravanat J.L., Douki T. & Cadet J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63, 88-102.
- Reardon J.T., Bessho T., Kung H.C., Bolton P.H. & Sancar A. (1997). In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9463-8.
- Regué L., Sdelci S., Bertran M.T., Caelles C., Reverter D. & Roig J. (2011). DYNLL/LC8 protein controls signal transduction through the Nek9/Nek6 signaling module by regulating Nek6 binding to Nek9. *J Biol Chem*, 286, 18118-29.
- Reinhardt H.C. & Yaffe M.B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 245-55.
- Rellos P., Ivins F.J., Baxter J.E., Pike A., Nott T.J., Parkinson D.M., Das S., Howell S., Fedorov O., Shen Q.Y., Fry A.M., Knapp S. & Smerdon S.J. (2007). Structure and regulation of the human Nek2 centrosomal kinase. *J Biol Chem*, 282, 6833-42.
- Rhee K. & Wolgemuth D.J. (1997). The NIMA-related kinase 2, Nek2, is expressed in specific stages of the meiotic cell cycle and associates with meiotic chromosomes. *Development*, 124, 2167-77.
- Richards M.W., O'Regan L., Mas-Droux C., Blot J.M., Cheung J., Hoelder S., Fry A.M. & Bayliss R. (2009). An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycle-regulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. *Mol Cell*, 36, 560-70.
- Robertson A.B., Klungland A., Rognes T. & Leiros I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, 66, 981-93.
- Roig J., Mikhailov A., Belham C. & Avruch J. (2002). Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev*, 16, 1640-58.
- Rouillon C. & White M.F. (2011). The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res Microbiol*, 162, 19-26.
- Salaun P., Rannou Y. & Prigent C. (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol*, 617, 41-56.

- Schultz L.B., Chehab N.H., Malikzay A. & Halazonetis T.D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 151, 1381-90.
- Schärer O.D. (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, 42, 2946-74.
- Schärer O.D. (2005). DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *ChemBiochem*, 6, 27-32.
- Sengerová B., Wang A.T. & McHugh P.J. (2011). Orchestrating the nucleases involved in DNA interstrand cross-link (ICL) repair. *Cell Cycle*, 10, 3999-4008.
- Shalom O., Shalva N., Altschuler Y. & Motro B. (2008). The mammalian Nek1 kinase is involved in primary cilium formation. *FEBS Lett*, 582, 1465-70.
- Shang Y.L., Boder A.J. & Chen P.L. (2003). NFBFD1, a novel nuclear protein with signature motifs of FHA and BRCT, and an internal 41-amino acid repeat sequence, is an early participant in DNA damage response. *J Biol Chem*, 278, 6323-9.
- Shiloh Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3, 155-68.
- Siddik Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.
- Siede W., Friedl A.A., Dianova I., Eckardt-Schupp F. & Friedberg E.C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics*, 142, 91-102.
- Sims A.E., Spiteri E., Sims R.J., Arita A.G., Lach F.P., Landers T., Wurm M., Freund M., Neveling K., Hanenberg H., Auerbach A.D. & Huang T.T. (2007). FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 564-7.
- Slupphaug G., Kavli B. & Krokan H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531, 231-51.
- Smogorzewska A., Matsuoka S., Vinciguerra P., McDonald E.R., Hurov K.E., Luo J., Ballif B.A., Gygi S.P., Hofmann K., D'Andrea A.D. & Elledge S.J. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*, 129, 289-301.
- Sohara E., Luo Y., Zhang J., Manning D.K., Beier D.R. & Zhou J. (2008). Nek8 regulates the expression and localization of polycystin-1 and polycystin-2. *J Am Soc Nephrol*, 19, 469-76.
- Songyang Z., Lu K.P., Kwon Y.T., Tsai L.H., Filhol O., Cochet C., Brickey D.A., Soderling T.R., Bartleson C., Graves D.J., DeMaggio A.J., Hoekstra M.F., Blenis J., Hunter T. & Cantley L.C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol*, 16, 6486-93.
- Steinman T.I. (2005). Polycystic kidney disease: a new perspective from the beginning. *Kidney Int*, 68, 2398-9.
- Steinman T.I. (2012). Polycystic kidney disease: a 2011 update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 21, 189-94.
- Su T.T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet*, 40, 187-208.
- Surpili M.J., Delben T.M. & Kobarg J. (2003). Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry*, 42, 15369-76.
- Sørensen C.S., Melixetian M., Klein D.K. & Helin K. (2010). NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling. *Cell Cycle*, 9, 450-5.

- Tan B.C. & Lee S.C. (2004). Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. *J Biol Chem*, 279, 9321-30.
- Tell G. & Wilson D.M. (2010). Targeting DNA repair proteins for cancer treatment. *Cell Mol Life Sci*, 67, 3569-72.
- Thiel C., Kessler K., Giessler A., Dimmler A., Shalev S.A., von der Haar S., Zenker M., Zahnleiter D., Stöss H., Beinder E., Abou Jamra R., Ekici A.B., Schröder-Kress N., Aigner T., Kirchner T., Reis A., Brandstätter J.H. & Rauch A. (2011). NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am J Hum Genet*, 88, 106-14.
- Thompson C.L. & Sancar A. (2002). Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, 21, 9043-56.
- Trapp M.L., Galtseva A., Manning D.K., Beier D.R., Rosenblum N.D. & Quarmby L.M. (2008). Defects in ciliary localization of Nek8 is associated with cystogenesis. *Pediatr Nephrol*, 23, 377-87.
- Trucco C., Oliver F.J., de Murcia G. & Ménissier-de Murcia J. (1998). DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res*, 26, 2644-9.
- Upadhyay P., Birkenmeier E.H., Birkenmeier C.S. & Barker J.E. (2000). Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 217-21.
- Valdiglesias V., Pásaro E., Méndez J. & Laffon B. (2011). Assays to determine DNA repair ability. *J Toxicol Environ Health A*, 74, 1094-109.
- van Adelsberg J.S. (1999). The role of the polycystins in kidney development. *Pediatr Nephrol*, 13, 454-9.
- van den Heuvel S. (2005). Cell-cycle regulation. *WormBook*, 1-16.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R. & Berneman Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, 131-49.
- Vermeulen W. (2011). Dynamics of mammalian NER proteins. *DNA Repair (Amst)*, 10, 760-71.
- Wang B., Matsuoka S., Carpenter P.B. & Elledge S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, 298, 1435-8.
- Wang X. & D'Andrea A.D. (2004). The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1063-9.
- Weaver B.A., Silk A.D., Montagna C., Verdier-Pinard P. & Cleveland D.W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*, 11, 25-36.
- Wheatley D.N., Wang A.M. & Strugnell G.E. (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int*, 20, 73-81.
- White M.C. & Quarmby L.M. (2008). The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol*, 9, 29.
- Woźniak K. & Błasiak J. (2002). Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol*, 49, 583-96.
- Wu L., Osmani S.A. & Mirabito P.M. (1998). A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 141, 1575-87.
- Yao Y. & Dai W. (2012). Mitotic checkpoint control and chromatin remodeling. *Front Biosci*, 17, 976-83.
- Yim H., Sung C.K., You J., Tian Y. & Benjamin T. (2011). Nek1 and TAZ interact to maintain normal levels of polycystin 2. *J Am Soc Nephrol*, 22, 832-7.
- Yin M.J., Shao L., Voehringer D., Smeal T. & Jallal B. (2003). The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J Biol Chem*, 278, 52454-60.

## IX. ANEXOS

Anexo I: Artigo publicado durante o período do doutorado referente a Tese:  
*“Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest.”*

## Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest

Alessandra Luíza Pelegrini<sup>1</sup>, Dinara Jaqueline Moura<sup>1</sup>,  
Bethânia Luise Brenner<sup>1</sup>, Pítia Flores Ledur<sup>1</sup>,  
Gabriela Porto Maques<sup>1</sup>,  
João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,3</sup>, Jenifer Saffi<sup>4</sup> and  
Guido Lenz<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics, <sup>2</sup>Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil and <sup>4</sup>Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431/sala 107, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33087620; Fax: +55 51 33087003; Email: lenz@ufrgs.br

Received on December 16, 2009; revised on April 2, 2010;  
accepted on April 12, 2010

Never in mitosis A (NIMA)-related kinases (Nek) are evolutionarily conserved proteins structurally related to the *Aspergillus nidulans* mitotic regulator NIMA. Nek1 is one of the 11 isoforms of the Neks identified in mammals. Different lines of evidence suggest the participation of Nek1 in response to DNA damage, which is also supported by the interaction of this kinase with proteins involved in DNA repair pathways and cell cycle regulation. In this report, we show that cells with Nek1 knockdown (KD) through stable RNA interference present a delay in DNA repair when treated with methyl-methanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and cisplatin (CPT). In particular, interstrand cross links induced by CPT take much longer to be resolved in Nek1 KD cells when compared to wild-type (WT) cells. In KD cells, phosphorylation of Chk1 in response to CPT was strongly reduced. While WT cells accumulate in G<sub>2</sub>/M after DNA damage with MMS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nek1 KD cells do not arrest, suggesting that G<sub>2</sub>/M arrest induced by the DNA damage requires Nek1. Surprisingly, CPT-treated Nek1 KD cells arrest with a 4N DNA content similar to WT cells. This deregulation in cell cycle control in Nek1 KD cells leads to an increased sensitivity to genotoxic agents when compared to WT cells. These results suggest that Nek1 is involved in the beginning of the cellular response to genotoxic stress and plays an important role in preventing cell death induced by DNA damage.

### Introduction

Nek1 is a member of the NIMA (Never in mitosis A)-related kinase (Nrk or Neks) family of serine/threonine kinases. In the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*, activation of a structurally related serine/threonine kinase, designated NIMA, plays a pivotal role in controlling entry into mitosis (1–3). Homology-based screens for NIMA genes in higher eukaryotes

have uncovered a large family of Neks and in mammals 11 Neks, Nek1 to Nek11, have been identified (4). All Neks have a conserved N-terminal kinase domain that have >40% of amino-acid similarity and with the exception of human Nek6, Nek7 and Nek10, possess a C-terminal non-catalytic regulatory domain. The length and composition of motifs in the C-terminal region vary considerably, with several protein–protein interaction and protein degradation motifs (4).

Nek1 has the largest non-catalytic C-terminus among mammalian Neks, with several coiled-coil domains, PEST and D-box degradations signals and both nuclear localization and export consensus sequences (4). These signatures suggest that Nek1 is a highly integrated and regulated protein. Accordingly, yeast two-hybrid assays using the central coiled-coil region of human Nek1 as bait identified 11 proteins, which include KIF3A (kinesin family member 3A), MRE11 (meiotic recombination 11), p53BP1 (p53 binding protein 1) and ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) (5).

The interaction of Nek1 with proteins involved in DNA repair point to the importance of Nek1 in this process. The importance of Nek1 in DNA repair has been characterized most thoroughly in response to ionizing radiation (IR) (6). This kind of DNA damaging agent induces predominantly double-strand breaks (DSBs), which in mammals are repaired mainly by non-homologous end joining (NHEJ) and to a lesser extent by homologous recombination (HR) involving proteins already shown to interact with Nek1, such as MRE11, p53BP1 and ATRX (5,7,8). IR exposure leads to nuclear localization of Nek1 in discrete nuclear points, possibly in double-strand DNA break sites, as well as increasing Nek1 expression and activity (6). Lack of Nek1 prevented G<sub>1</sub>/S or G<sub>2</sub>/M phase arrest in response to IR, as well as phosphorylation of Chk1 and 2 (9). Therefore, Nek1 was suggested as a kinase located at the early steps of IR-induced DNA damage signalling.

In the present report, we show that Nek1 is important in the cellular response to the genotoxic agents methyl methanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and cisplatin (CPT), which induce diverse DNA lesions and activate various repair mechanisms. MMS is a monofunctional alkylating agent that covalently reacts with only one nucleophilic center in DNA, modifying guanine to 7-methylguanine and adenine to 3-methyladenine, causing the incorrect pairing of the bases and blocking replication (10). Methyl groups can be directly removed by DNA alkyl transferase or repaired by base excision repair (BER) (11). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces reactive oxygen species (ROS) resulting in apurinic or apirimidinic sites that are repaired by BER (12). ROS also induces single- and double-stranded DNA breaks, which may recruit several repair mechanisms which include HR, NHEJ, mismatch repair, translesion synthesis and transcription-coupled repair (13). CPT treatment induces formation of DNA intra and interstrand cross links (ICLs), DNA–protein cross links and monoadducts with DNA (14). ICLs represent a small amount of the total CPT lesions

but they seem to be responsible for the cytotoxicity of CPT. Several lines of evidence suggest that DNA cross links are repaired through an incisional–recombinational repair mechanism that involves components of nucleotide excision repair (NER) and HR. Data with *Xenopus* egg extracts suggest that DNA polymerase  $\zeta$  is required for ICL repair and this repair leads to activation of ATR checkpoints and Fanconi anaemia pathways (15).

## Materials and methods

### Chemicals

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-glutamine, antibiotics (penicillin/streptomycin) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CPT [*cis*-diammineplatinum(II) dichloride] were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

### Cell culture

The Human Embryonic Kidney cells (Hek293t) and the human glioblastoma (U87) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Hek293t cells were cultivated in DMEM high glucose, and U87 cells were cultivated in DMEM (Gibco™) low glucose supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/ml L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin. Cells were maintained in tissue culture flasks at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) solution.

### RNA interference

Lentiviral encoding vectors were produced by cotransfecting pLL3.7 containing a sequence specific for human Nek1 [G(2127)CGAGAAATCTCG-TAGA; initiator A(1)TG] together with the helper vectors CMV-VSVG, RSV-REV and pMDLg/pRRE into HEK293 cells (8,16). After 48 h, supernatant were collected, centrifuged at 5000g for 10 min, filtered through a 45- $\mu$ m mesh and added to 50% confluent cells in the presence of 100  $\mu$ g/ml of polybrene. Cells expressing green fluorescent protein (GFP) were isolated by serial dilutions and GFP-positive colony selected. For the control of short hairpin RNA, cell lines were transduced with lentiviral vector containing the codifying sequence of GFP.

### Protein electrophoresis and western blot

Cells were lysed in lysis buffer [50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ethyleneglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton-X 100, plus protease inhibitors (EDTA-free tablets; Roche)], and western blotting was performed as described (17). The Nek1 antibody (sc-7437) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and Phospho-Chk1 (Ser296) and Phospho-Histone H2AX (Ser139) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Polyvinylidene difluoride membranes were stained with coomassie blue and the stained membrane was used as a loading control.

### Alkaline and neutral comet assay

Cells were treated for the indicated time, after which the media with genotoxic agents was removed and the cells were incubated in complete media. Samples were collected at different time points after the treatment (0.5, 1 and 4 h for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 2, 4 and 12 h for MMS; 12 and 24 h for CPT) and evaluated by the comet assay.

The alkaline comet assay was performed as described by Singh *et al.*, with minor modifications (18,19) and the neutral comet assay was adapted from Singh *et al.* (20). Cells ( $3 \times 10^6$  cells) were seeded in complete media and grown for 2 days prior to treatment. Cells were then incubated in FBS-free medium with different concentrations of MMS for 2 h, CPT for 1 h or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. After treatment, cells were embedded in 0.75% low-melting point agarose and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution [2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), pH 10.0] at 4°C for at least 1 h. After the lysis procedure, the slides were placed in a horizontal electrophoresis unit with fresh alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13.0) or neutral buffer (3 M sodium acetate, 1 M Tris, pH 8.5), which covered the slides for 20 min at 4°C. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (0.9 V/cm) and 300 mA for alkaline conditions and for 1 h at 14 V and

12 mA for the neutral assay. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in double-distilled water and stained using a silver staining protocol as described in Nadin *et al.* (21). After the staining step, gels were left to dry at room temperature overnight and analyzed using an optical microscope. One hundred cells of two replicate slides were selected and analyzed for DNA migration. One hundred cells were scored visually according to the tail length and the amount of DNA present in the tail. Each comet was given an arbitrary value of 0–4 (0, undamaged; 4, maximally damaged) (22). Damage score was thus assigned to each sample and can range from 0 (completely undamaged: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage: 100 cells  $\times$  4). International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method as it is highly correlated with computer-based image analysis (22,23).

### Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide cell proliferation assay

Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction was performed according to Mosmann *et al.* (24). Cells were seeded in growth medium and incubated overnight. Then, cells were treated for 24, 48 and 72 h with different concentrations of MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or CPT. After the incubation period, the culture medium was replaced by the MTT solution dissolved in PBS and the plates were incubated at 37°C for 3 h. Then, all medium was aspirated and the formazan crystals dissolved in DMSO. Results are expressed as mean percentage of absorbance at 570 nm in treated cells as compared to controls.

### Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed by use of Guava Easy Cyte Plus cell cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). In brief,  $5 \times 10^5$  cells were seeded in complete media and the day after, cells were incubated in FBS-free medium with 400  $\mu$ M MMS for 2 h, 5  $\mu$ g/ml CPT for 1 h or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. At the end of treatment, the media with genotoxic agents was removed and the cells were incubated in completed media for 24 or 48 h. After this, cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in ice-cold 70% ethanol and left for 24 h at 4°C; then, the ethanol-fixed cells were centrifuged, washed with PBS and resuspended in PSSI buffer (0.2 mg/ml RNase, 20  $\mu$ g/ml propidium iodide, 0.1% Triton X-100) and incubated for 30 min at room temperature. The data were collected and analyzed by a Guava Personal Cell Analysis flow cytometer with use of CytoSoft software (Guava Technologies). Approximately 10 000 cells were analyzed in each experiment. All analyses were performed at least three times.

### Statistics

The statistics performed were analysis of variance followed by One-way Tukey's Multiple Comparison Test using Prism Statistical Software from GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

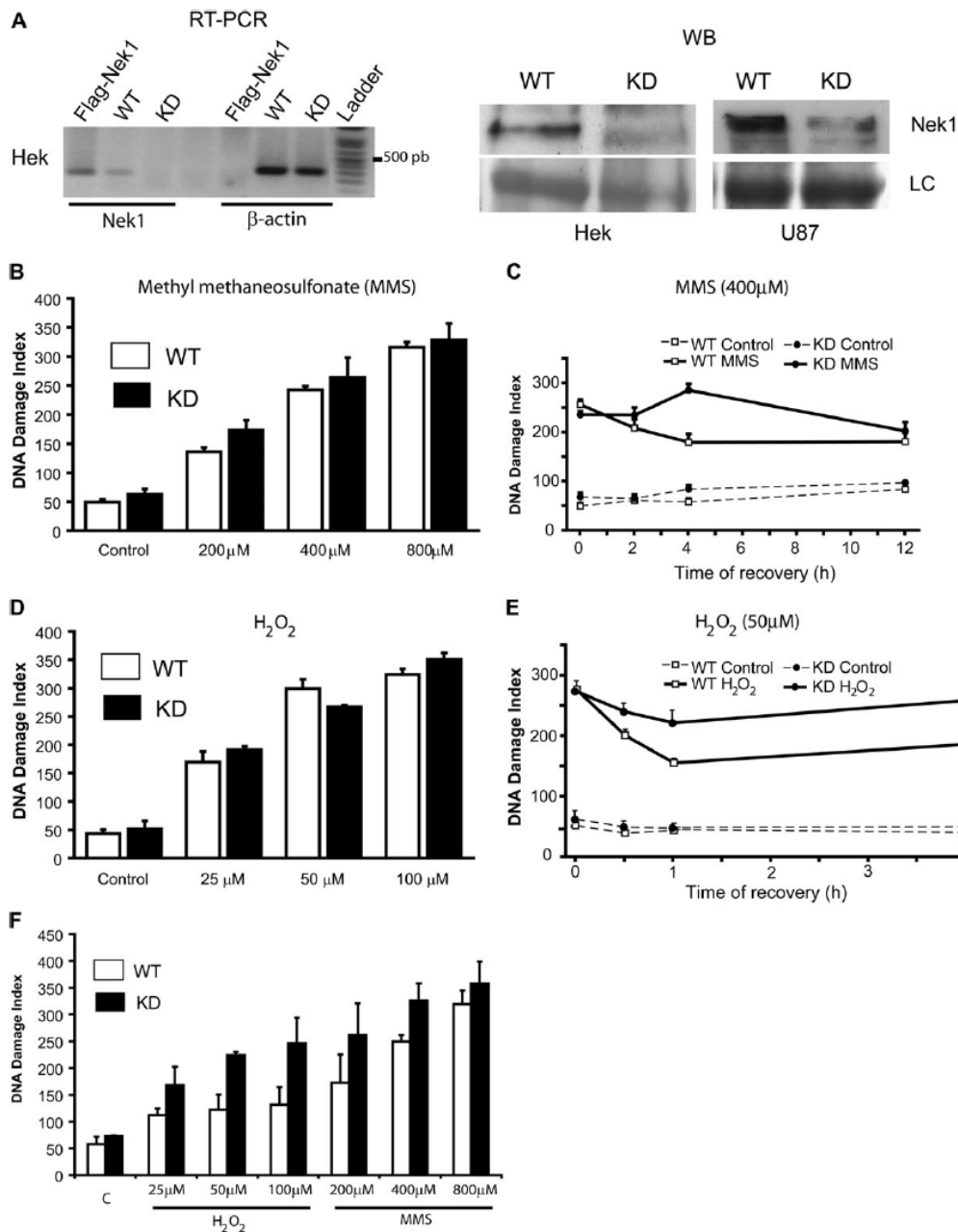
## Results

### Nek1 silencing affects DNA repair but not DNA damage

Stable Nek1 silencing mediated by lentiviral-transduced shRNAs was confirmed at the mRNA and protein level in Hek293T and U87 cells (Figure 1A). DNA damage caused after treatments with genotoxic agents MMS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not significantly different in Nek1 KD cells when compared to WT cells as estimated by the alkaline comet assay 2 h after treatment with MMS and 30 min with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 1B and D). However, when the DNA repair capacity in both cells was measured based on the decrease of DNA damage index over time, a fast reduction was observed in WT cells whereas KD cells took much longer to repair its DNA after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or MMS (Figure 1C and E). In the cases of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage, the reduction in damage was very low after 4 h (Figure 1E). With U87 glioma cells, Nek1 KD slightly increased the DNA damage caused by MMS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pointing to a more important role in this malignant cell line (Figure 1F).

### Nek1 is important to solve CPT-induced DNA interstrand cross links

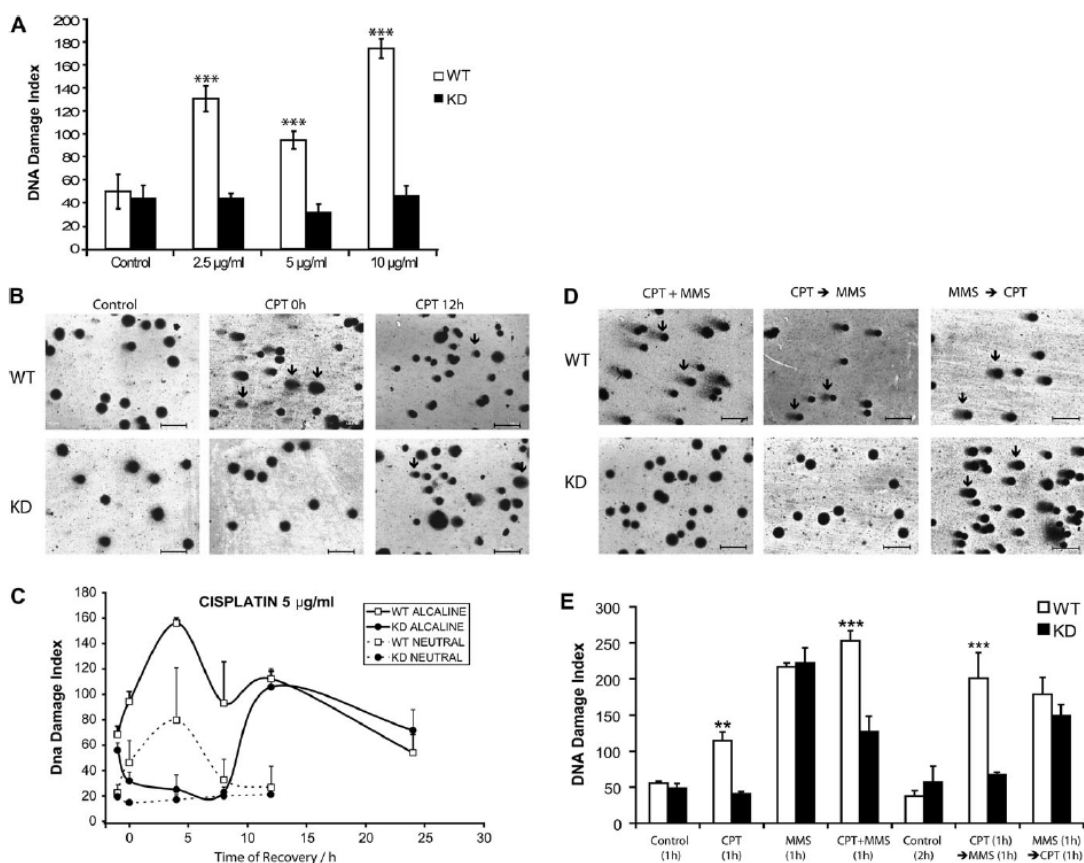
Despite not being the most prevalent DNA alteration by CPT, ICLs seem to be the main lesion responsible for cell toxicity. Analysis of ICL formation and repair is contraindicated in the alkaline comet assay since ICL formation reduces whereas



**Fig. 1.** DNA damage and repair of Nek1 knockdown (KD) Hek293t cells exposed to genotoxic agents. Hek293t and U87 were silenced by lentiviral-mediated RNA interference and selected for expression of GFP. KD cells presented reduction in mRNA (left) and protein (right) level of Nek1 (A). Wild-type (WT) and Nek1 KD Hek293T cells were treated with the indicated concentrations of MMS for 2 h (B) or  $H_2O_2$  for 30 min (D) and followed by the comet assay under alkaline conditions. Time course of Hek293t cells treated with 400  $\mu$ M of MMS for 2 h (C) or 50  $\mu$ M of  $H_2O_2$  for 30 min (E). WT and KD U87 Cells were treated with MMS and  $H_2O_2$  as in B and D (F). Data are from three independent experiments; LC, loading control.

repair increases migration. This occurs because denaturation of DNA containing ICLs is repressed and thus migration is retarded while repair of ICLs leads to incisions near the ICLs, thus producing DNA strand breaks which increases migration (25). One hour of CPT treatment induced a considerable

migration of the nuclear DNA of WT cells, suggesting the beginning of repair, which was not observed in Nek1 KD cells (Figure 2A and B). The time course of ICL repair clearly shows the delay of Nek1 KD cells in repairing this kind of lesion, since only after 12 h was an increase in migration observed, in



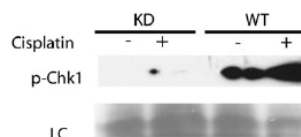
**Fig. 2.** CPT induces cross links that are not resolved in Nek1 KD cells. Hek293T cells were treated with different doses of CPT for 1 h followed by alkaline comet assay (A). Representative photomicrographs of stained nuclei of control cells (left) or cells treated for 1 h with 5 µg/ml CPT with 0 h (middle) or 12 h recovery (right). Arrows indicate cells with tails. Size bar = 10 µm (B). Quantification of DNA damage index by comet assay under alkaline and neutral conditions after 1 h treatment with 5 µg/ml of CPT and 0, 12 or 24 h of recovery (C). Cells were treated with CPT plus MMS (left) for 1 h, for 1 h with CPT followed by a treatment of 1 h with MMS (middle) or for 1 h with MMS followed by a treatment of 1 h with CPT (right) (D). Quantification of DNA damage index by alkaline comet assay with the combinations of CPT and MMS (E). Data are from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  with analysis of variance followed by One-way Tukey's Multiple Comparison Test.

contrast to WT cells (Figure 2B and C). When only double-strand break (DSBs) were evaluated, using the neutral comet assay, the Nek1 KD cells did not present any nuclear DNA migration, whereas the WT cells presented a considerable increase in migration 2 and 4 h after treatment (Figure 2C).

In order to ascertain that this lack of migration was indeed due to the formation of cross links and not a result of complete repair of the DNA damage, cells were pretreated with MMS to induce DNA breaks followed by treatment with CPT. In this case, an increase in migration was observed in the KD cells that was similar to WT cells (Figure 2D and E). When CPT treatment preceded MMS treatment, the level of DNA damage was not different from CPT alone, strongly suggesting that the effect seen with CPT was due to DNA ICL formation (Figure 2D and E).

#### *Nek1 is important for the phosphorylation of H2AX and Chk1 in response to CPT*

In order to assess where in the pathway from DNA damage to cell cycle arrest Nek1 was acting, we analyzed the phosphorylation



**Fig. 3.** Nek1 is important for Chk1 phosphorylation in response to CPT. Hek293T cells were treated with CPT (5 µg/ml) for 1 h lysed and analyzed by western blotting using an antibody against phosphor-(Ser 296)-Chk1. The coomassie blue-stained PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane was used as loading control (LC). Result shown is representative of at least three independent experiments.

status of Chk1 in response to CPT in WT and KD cells. The phosphorylation of Chk1 at Ser296 was almost completely abrogated in KD cells in response to CPT (Figure 3) suggesting that Nek1 is involved at the early event of recognition and response to CPT-induced DNA damage. H2AX phosphorylation at Ser 139 (also known as  $\gamma$ H2AX) was also reduced in KD cells in relation to WT cells in response to CPT (data not shown).



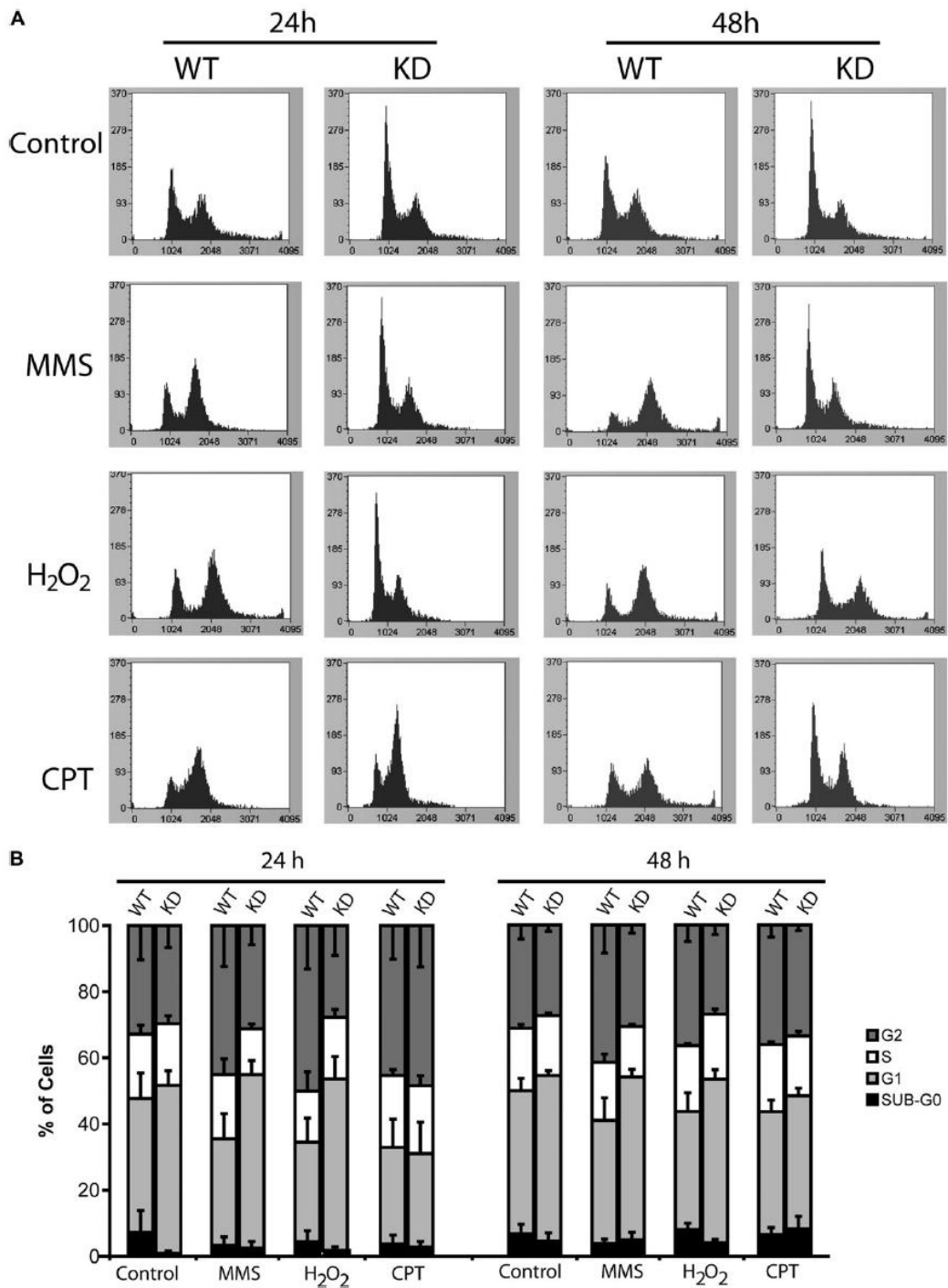


Fig. 4. Nek1 KD cells fail to arrest in G<sub>2</sub>/M after DNA damage. Hek293t cells were treated with MMS (400  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M) or CPT (5  $\mu$ g/ml) for 1 h and cell cycle distribution was analyzed in a flow cytometer after 24 and 48 h (A). Quantification of the cell cycle distribution after 24 and 48 h of recovery (B);  $n = 3$ .

### Knockdown of *Nek1* affects DNA damage-induced cell cycle arrest

Mammalian cells treated with MMS or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arrest at the G<sub>2</sub>/M checkpoint (26,27). *Nek1* KD cells presented virtually no arrest 24 h after DNA damage induced by MMS or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in clear contrast with WT cells, which arrested in G<sub>2</sub>/M. This difference was still visible after 48 h (Figure 4A and B). CPT treatment was described to induce cell cycle arrests at the end of S phase with a 4N DNA content regardless of whether the damage was introduced pre- or post-DNA replication (28). CPT induced a cell cycle arrest in WT cells with a 4N DNA content and, in contrast to cells treated with MMS or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Nek1* KD cells treated with CPT also arrested with 4N DNA content suggesting that *Nek1* is not involved in ICL-induced G<sub>2</sub>/M arrest signaling or that the lack of ICL repair in *Nek1* KD cells makes them arrest due to stalled replication forks at the end of S phase.

### *Nek1* silencing reduces cell survival to genotoxic agents

In order to evaluate the effect of the alteration in repair kinetics and cell cycle arrest regulation on the biology of the cell after genotoxic damage, we evaluated cell viability after DNA

damage. Both Hek293t and U87 cells with *Nek1* KD were more sensitive to low doses of MMS, CPT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with higher doses being equally toxic probably due to a plateau effect (Figure 5A). Furthermore, intermediate concentrations of MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CPT produced a faster reduction in cell viability of KD cells when compared to WT cells (Figure 5B). This indicates that *Nek1* plays an important role in the repair of lesions induced by MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CPT, thus affecting the overall survival of cells in which *Nek1* is silenced.

### Discussion

IR-induced DNA damage has already been shown to activate *Nek1*, which localized to nuclear foci of DNA damage. Furthermore, deletion of *Nek1* reduced DNA repair and potentiated the lethality of IR (6,9). Here, we report the importance of *Nek1* in DNA damage response (DDR) after exposure to different agents that produce an array of DNA damage that differs from IR-induced DNA damage. We show that *Nek1* KD reduces repair, cell cycle arrest and viability to DNA damage induced by the alkylating agent MMS, the ROS inducer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the ICL inducer CPT.

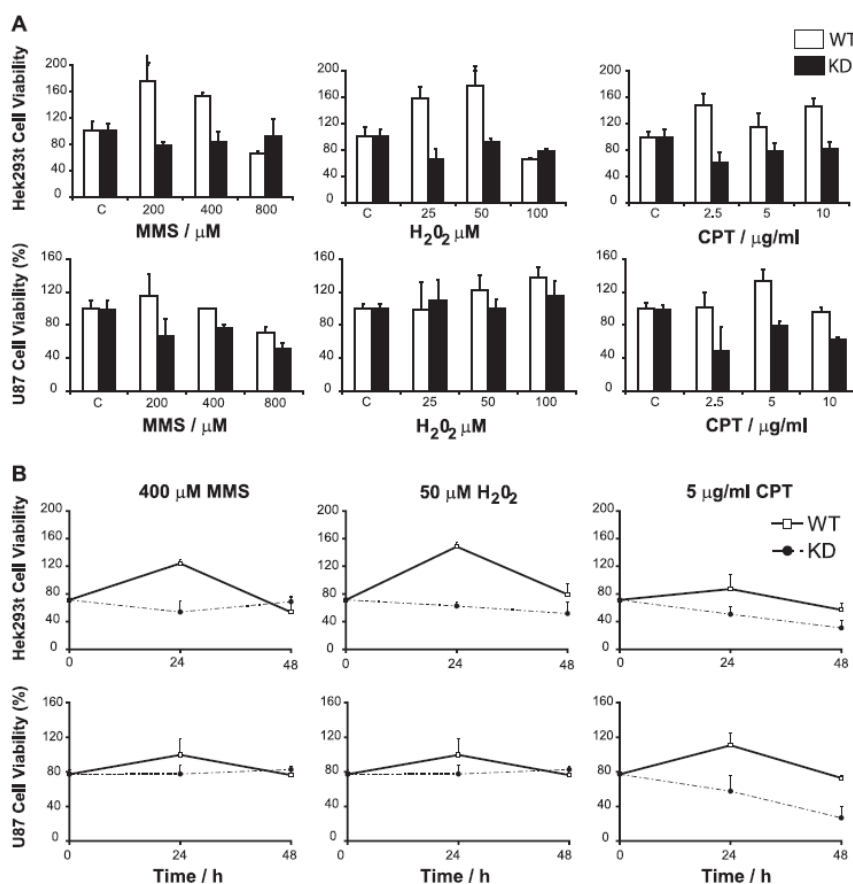


Fig. 5. *Nek1* KD cells are more sensitive to DNA damage-inducing agents. Dose-response curves of Hek293T and U87 cells treated with MMS for 2 h, CPT for 1 h or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min evaluated by MTT staining (A). Hek293t and U87 cells were treated with the indicated concentrations of agents and cell viability was analyzed 24, 48 and 72 h later (B); *n* = 3.

Nek1 seems to play an important role in G<sub>2</sub> checkpoint arrest induced by MMS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with a strong lack of arrest after treatment with these agents. Surprisingly, both WT and KD cells presented an increase of the 4N cell population when treated with CPT, despite the striking retardation in the repair of CPT-induced ICLs observed in Nek1 KD cells. One plausible hypothesis is that while WT cells arrested due to G<sub>2</sub>/M checkpoint activation, Nek1 KD cells arrested at the end of S with a 4N DNA content due to unresolved ICLs (28). This is further supported by the absence of DSBs in Nek1 KD cells at the early times after CPT treatment, suggesting that Nek1 is essential for the DSB formation that follows CPT-induced ICL, since formation of DSBs is a crucial step for the ICL repair and this step occurs predominantly in the S phase of the cell cycle (29). Nek1 KD cells eventually form DSBs, suggesting that other proteins, including other Nek isoforms, can eventually substitute the absent Nek1.

In response to IR, i.e. predominantly DSBs formation, Nek1 was shown to be fundamental for Chk1 but not for H2AX phosphorylation, suggesting that Nek1 is located downstream of ATM, but upstream of Chk1 in the signalling cascade involved in the DDR to DSB (9). Similarly to what was observed with IR, Nek1 was also required to CPT-induced phosphorylation of Chk1. Preliminary evidence suggests that Nek1 is also required for the phosphorylation of H2AX on Ser 139, which is described to be a process dependent on PI3K-like kinases, such as ATM, ATR and DNA-PKs (30). The reduced phosphorylation of Chk1 and H2AX in response to CPT in Nek1-KD when compared to WT cells points to the importance of Nek1 in the signaling activated by CTP-induced DNA damage.

Our data point to the hypothesis that Nek1 does not belong to a specific DDR signalling complex, but acts in different signalling pathways that respond to a variety of DNA damage. NER, BER, HR and NHEJ all contribute to repair of DNA damage in response to the agents used in the present study. Lack of Nek1 retarded repair to all of these agents and affected the cell cycle response and survival to these three agents.

The lack of repair and the increase in mortality rate in Nek1 KD cells that were exposed to genotoxic stress could be a result of cell cycle defects. It is common that mutants related to cell cycle regulation are more susceptible to genotoxic stress since some repair mechanisms depend upon the normal cell cycle progression (31). Additionally to the direct involvement of Nek1 in the detection, repair and/or signalling of DNA damage, this kinase was shown to modulate mitochondrial function through the association and phosphorylation of the mitochondrial voltage dependent anion channel 1, which seems to modulate the cellular response to DNA damage (32). This effect could be responsible, at least in part, for the reduced survival to DNA damage in the Nek1 KD cells. When comparing the cancerous U87 cells with the non-cancerous Hek cells, the former presented an increase in DNA damage when compared to the latter in the absence of Nek1, but this increased damage did not reflect further reduction in survival, suggesting that this cancer cell line is able to better cope with damaged DNA.

It is still too early to say if Nek1 is acting directly in cell cycle control or if it is acting in repair routes or even both. Meanwhile, our results suggest a broader role of Nek1 in several kinds of DDR mechanisms and that defects in the Nek1 and possibly other members of the family may be involved in altered sensibility to several forms of DNA damage.

## Funding

Brazilian Agencies 'Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul' (0522686); 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq) (420036/2005-9).

## Acknowledgments

A.L.P. is recipient of a fellowship from the 'Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior' and G.L. from 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq).

Conflict of interest statement: None declared.

## References

- Fry, A. M., Schultz, S. J., Bartek, J. and Nigg, E. A. (1995) Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12899–12905.
- Osmani, S. A. and Ye, X. S. (1996) Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem. J.*, **317**, (Pt 3), 633–641.
- Morris, N. R., Osmani, S. A., Engle, D. B. and Doonan, J. H. (1989) The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Bioessays*, **10**, 196–201.
- O'Connell, M. J., Krien, M. J. and Hunter, T. (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.*, **13**, 221–228.
- Surpili, M. J., Delben, T. M. and Kobarg, J. (2003) Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry*, **42**, 15369–15376.
- Polci, R., Peng, A., Chen, P. L., Riley, D. J. and Chen, Y. (2004) NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res.*, **64**, 8800–8803.
- Jeggo, P. and Lobrich, M. (2006) Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat. Prot. Dosimetry*, **122**, 124–127.
- Lanza, D. C., Meirelles, G. V., Alborghetti, M. R., Abrile, C. H., Lenz, G. and Kobarg, J. (2009) FEZ1 interacts with CLASP2 and NEK1 through coiled-coil regions and their cellular colocalization suggests centrosomal functions and regulation by PKC. *Mol. Cell Biochem.*, **338**, 35–45.
- Chen, Y., Chen, P. L., Chen, C. F., Jiang, X. and Riley, D. J. (2008) Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle*, **7**, 3194–3201.
- Beranek, D. T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.*, **231**, 11–30.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. and Helleday, T. (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3799–3811.
- Barnes, D. E. and Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 445–476.
- Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, H. E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, **531**, 231–251.
- Zamble, D. B. and Lippard, S. J. (1995) Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 435–439.
- Raschle, M., Knipsheer, P., Enouï, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J. D., Ellenberger, T. E., Scharer, O. D. and Walter, J. C. (2008) Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell*, **134**, 969–980.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V. et al. (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.*, **33**, 401–406.
- Jacques-Silva, M. C., Bernardi, A., Rodnight, R. and Lenz, G. (2004) ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology*, **67**, 450–459.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, **26**, 249–261.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184–191.
- Singh, N. P., Muller, C. H. and Berger, R. E. (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.*, **80**, 1420–1430.

A. L. Pelegrini *et al.*

21. Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M. and Ciocca, D. R. (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1183–1186.
22. Ross, G. M., McMillan, T. J., Wilcox, P. and Collins, A. R. (1995) The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat. Res.*, **337**, 57–60.
23. Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G. *et al.* (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res.*, **627**, 31–35.
24. Mosmann, T. J. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
25. Rothfuss, A. and Grompe, M. (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 123–134.
26. Kim, S. Y., Jo, H. Y., Kim, M. H., Cha, Y. Y., Choi, S. W., Shim, J. H., Kim, T. J. and Lee, K. Y. (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J. Biol. Chem.*, **283**, 33563–33568.
27. Trucco, C., Oliver, F. J., de Murcia, G. and Menissier-de Murcia, J. (1998) DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2644–2649.
28. Akkari, Y. M., Bateman, R. L., Reifsteck, C. A., Olson, S. B. and Grompe, M. (2000) DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8283–8289.
29. Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J. and Kanaar, R. (2006) The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *EMBO J.*, **25**, 4921–4932.
30. Riches, L. C., Lynch, A. M. and Gooderham, N. J. (2008) Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks. *Mutagenesis*, **23**, 331–339.
31. Islaih, M., Halstead, B. W., Kadura, I. A. *et al.* (2005) Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat. Res.*, **578**, 100–116.
32. Chen, Y., Craigen, W. J. and Riley, D. J. (2009) Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle*, **8**, 257–267.

*Anexo II: Artigos publicados durante o período do doutorado referentes a outros trabalhos: “Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines” e “Sensitization of glioma cells by x-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown” (somente a primeira página)*

## Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines

Daniéli Gerhardt · Ana Paula Horn ·  
Mariana Maier Gaelzer · Rudimar Luiz Frozza ·  
Andrés Delgado-Cañedo · Alessandra Luiza Pelegrini ·  
Amélia T. Henriques · Guido Lenz · Christianne Salbego

Received: 2 July 2008 / Accepted: 12 November 2008 / Published online: 3 December 2008  
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

**Summary** Malignant gliomas are the most common and devastating primary tumors of the central nervous system. Currently no efficient treatment is available. This study evaluated the effect and underlying mechanisms of boldine, an aporphine alkaloid of *Peumus boldus*, on glioma proliferation and cell death. Boldine decreased the cell number of U138-MG, U87-MG and C6 glioma lines at concentrations of 80, 250 and 500  $\mu\text{M}$ . We observed that cell death caused by boldine was cell-type specific and dose-dependent. Exposure to boldine for 24 h did not activate key mediators of apoptosis. However, it induced alterations in the cell cycle suggesting a G<sub>2</sub>/M arrest in U138-MG cells. Boldine had no toxic effect on non-tumor cells when used at the same concentrations as those used on

tumor cells. Based on these results, we speculate that boldine may be a promising compound for evaluation as an anti-cancer agent.

**Keywords** Glioma · Proliferation · Boldine · Anti-tumor agent

### Introduction

Malignant gliomas are tumors that usually arise from cells of astrocytic lineage. They are the most common and devastating primary tumors of the central nervous system (CNS) [1]. Glioblastoma multiform (GBM), or grade IV astrocytoma, is the most frequent class of malignant primary brain tumors and one of the most aggressive forms of cancer. Consequently, survival after diagnosis is less than 1 year, even when patients are treated with aggressive surgery, radiotherapy, and common chemotherapy regimens [2, 3].

Excessive proliferation, disseminated tumor growth, extremely rich neovascularization, evasion of immune responses and resistance towards apoptotic stimuli are the main features of malignant gliomas. These characteristics make their treatment particularly complicated [4, 5]. New therapeutic strategies are urgently needed.

The use of plants as medicines can be traced back to early man [6]. During the last few decades, investigation into natural compounds has been particularly successful in the field of anti-cancer drug research [7]. The aporphine alkaloids represent an interesting and potentially useful category of these agents [8]. Boldine ((*S*)-2,9-dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine) is an aporphine alkaloid (Fig. 1). It occurs abundantly in the leaves and bark of boldo (*Peumus boldus* Molina), a widely distributed tree native to Chile [9]. This alkaloid has attracted attention due

---

D. Gerhardt · A. P. Horn · M. M. Gaelzer · R. L. Frozza ·  
C. Salbego (✉)  
Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica,  
Departamento de Bioquímica,  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Rua Ramiro Barcelos 2600,  
90035.003 Porto Alegre, RS, Brazil  
e-mail: salbego@terra.com.br

A. Delgado-Cañedo  
Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular, IC/FUC-RS,  
Avenida Princesa Isabel 370-3º andar,  
90620.000 Porto Alegre, RS, Brazil

A. L. Pelegrini · G. Lenz  
Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS,  
Avenida Bento Gonçalves 9500,  
91501.970 Porto Alegre, RS, Brazil

A. T. Henriques  
Departamento de Produção de Matéria Prima,  
Faculdade de Farmácia, UFRGS,  
Avenida Ipiranga 2752,  
90610.000 Porto Alegre, RS, Brazil

# Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown

Patricia L.C. Lopez<sup>a</sup> Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>a</sup> Andrew O. Silva<sup>a</sup>  
Elvira A.A. Cordero<sup>a</sup> Daniel Garcia-Santos<sup>b</sup> Alessandra L. Pelegrini<sup>a</sup>  
Gleice M. Reder<sup>c</sup> Nicolle L. Barbieri<sup>a</sup> Guido Lenz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biophysics Department and Center of Biotechnology, and <sup>b</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, and <sup>c</sup>Institute for Biomedical Research, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## Key Words

Apoptosis · Doxorubicin · Gliomas · Senescence · shRNA · Vincristine · XIAP

## Abstract

**Objective:** Glioblastomas are a kind of cancer with high resistance to treatments, requiring more efficient alternatives of treatment. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is highly expressed in gliomas and, due to its inhibition of caspases, can participate in resistance to therapy. Here we test the sensitization of glioma cells with XIAP gene knockdown (KD) to drugs used in chemotherapy. **Methods:** We silenced XIAP expression in U87MG glioblastoma using stable shRNA, and cells were treated with taxol, BCNU, temozolomide, cisplatin, etoposide, resveratrol (Rsv), vincristine and doxorubicin. We analyzed cell viability, cell cycle, apoptosis and senescence. **Results:** XIAP KD cells were more sensitive to etoposide, Rsv, vincristine and doxorubicin compared to wild-type (WT) cells. Doxorubicin 1  $\mu$ M and vincristine 100 nM induced higher activation of caspases after 24 h and doxorubicin induced a higher degree of senescence induction in XIAP KD cells in relation to WT cells. Phospho-p53 and phospho-H2Ax Western blot indicate subsequent DNA damage

as an important effector of doxorubicin-induced death. **Conclusions:** This study suggests that XIAP inhibitors may sensitize gliomas to certain drugs and induce death and that the mechanisms of sensitization involve apoptosis, senescence and p53 signaling.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM), the most common primary tumor of the central nervous system, classified as grade IV by the WHO, is a very aggressive type of cancer with high resistance to conventional therapies such as surgery, and radio- and chemotherapy [1]. Life expectancy of patients with GBM in current treatment regimens is around 14 months. Beside the clinicopathological diagnosis used to distinguish among GBM grades, a molecular approach can improve the knowledge and predict drug response. In this sense, knowing the resistance mechanisms present in these cells, and mainly overcoming this resistance, is a fundamental part of conquering resistance.

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel  
0030-2414/12/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/ocf

Guido Lenz  
Departamento de Biofísica, IB, UFRGS  
Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431, Sala 107  
Campus do Vale, Porto Alegre, RS 91501-970 (Brazil)  
Tel. +55 51 3308 7620, E-Mail lenz@ufrgs.br

© S. Karger AG, Basel  
**PROOF Copy  
for personal  
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS  
ARTICLE WITHOUT WRITTEN  
CONSENT FROM S. KARGER  
AG, BASEL IS A VIOLATION  
OF THE COPYRIGHT.

## X. CURRÍCULO

### Alessandra Luíza Pelegrini

#### *Curriculum Vitae*

#### Dados Pessoais

Data de nascimento: 23/06/1982  
Origem: Porto Alegre/RS - Brasil  
Endereço Profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica  
Bento Gonçalves 9500, prédio 43431  
Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS – Brasil  
Telefone: 51 33087620  
Endereço eletrônico: aleepelegrini@gmail.com

#### Formação Acadêmica

2001 - 2005  
Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil  
Trabalho de conclusão: O silenciamento da cinase humana  
Nek1 altera o reparo normal de danos ao DNA induzidos por  
agente alquilante.  
Orientador: Dr. Guido Lenz

2001 - 2006  
Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil

2006 - 2007  
Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil



Título: Estudo do envolvimento da cinase humana Nek1 na sinalização de reparo de DNA.,

Ano de obtenção: 2007

Orientador: Dr. Guido Lenz

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

2007 (em andamento)

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Porto Alegre, RS, Brasil

Conclusão prevista para setembro/2012

Título: O silenciamento da cinase humana Nek1 altera o reparo normal do DNA.

Orientador: Dr. Guido Lenz

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

2011 - 2012

Estágio doutorado sanduíche

Universidade de São Paulo

São Paulo, SP, Brasil

Orientador: Dr. Carlos Frederico Martins Menck

### **Estágios e Monitorias acadêmicas**

2001 -2003

Estágio de Iniciação Científica

Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Porto Alegre, RS, Brasil

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Projeto: Atividade enzimática da glutathione-S transferase de *Boophilis microplus*: envolvimento na resistência a carrapaticidas.

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS

2003 - 2005

Estágio de Iniciação Científica

Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Porto Alegre, RS, Brasil

Orientador: Dra. Lia Rejane Muller Bevilaqua

Co-orientador: Dr. Iván Izquierdo

Projeto: Análise bioquímico-molecular dos processos envolvidos na formação, evocação, extinção e reaquisição da memória.

Bolsista: PIBIC/CNPq UFRGS

2005 – 2006

Estágio de Iniciação Científica

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular,  
Departamento de Biofísica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Porto Alegre, RS Brasil

Orientador: Dr. Guido Lenz

Projeto: Envolvimento da cinase mitótica Nek1 na sinalização de reparo de DNA

Estágio voluntário

2005

Estágio de Iniciação Científica

14º Programa de Bolsas de Verão

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Centro Nacional de  
Pesquisa em Energia e Materiais  
Campinas, SP, Brasil  
Orientador: Dr. Nilson Zanchin  
Projeto: Clonagem, expressão e purificação da GTPase  
Rab21 humana para análises estruturais.

2002 – 2004  
Monitoria na disciplina Histologia para Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de  
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil  
Supervisão: Dra. Maria Cristina Faccioni Heuser

2004  
Monitoria na disciplina Biologia Tecidual para Biomedicina  
Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de  
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil  
Supervisão: Dra. Maria Cristina Faccioni Heuser

2005  
Estágio nível graduação  
Serviço de Genética Médica, Laboratório de Erros Inatos do  
Metabolismo, Hospital de Clinicas de Porto Alegre  
Supervisão: Maíra Burin

### **Formação Complementar**

2002 - 2002  
Curso de curta duração em Manipulação de Embriões  
Humanos.  
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC  
São Paulo, SP, Brasil

- 2003 – 2003  
Curso de curta duração em Medicina Genômica.  
Sociedade Brasileira de Genética, SBG  
Ribeirão Preto, SP, Brasil
- 2003 – 2003  
Extensão universitária em Terapia Gênica.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil
- 2003 – 2003  
Curso de curta duração em Marcadores de suscetibilidade  
ao Câncer.  
Sociedade Brasileira de Genética, SBG  
Ribeirão Preto, SP, Brasil
- 2004 – 2004  
Curso de curta duração em Técnicas de Biologia Molecular  
aplicadas a Neurociências  
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE  
São Paulo, SP Brasil
- 2004 – 2004  
Extensão universitária em Técnicas Histológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil
- 2004 – 2004  
Extensão universitária em III Curso de Biologia Molecular  
aplicada às ciências da saúde  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil
- 2004 – 2004  
Extensão universitária em As relações Ser Humano-  
Natureza com enfoque no ensino em ciências  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil
- 2005 – 2005  
Treinamento em Espectrometria de Massas.  
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS  
Campinas, SP, Brasil
- 2005 – 2005  
Extensão universitária em Atualizações em Genética.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS  
Porto Alegre, RS, Brasil

- 2005 – 2005 Curso de curta duração em Bioinformática cotidiana.  
Sociedade Brasileira de Genética, SBG,  
Ribeirão Preto, SP, Brasil
- 2006 – 2006 Extensão universitária em O uso de animais no ensino e na  
pesquisa.  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil
- 2007 – 2007 Curso de curta duração em Genética Forense.  
Sociedade Brasileira de Genética, SBG  
Ribeirão Preto, SP, Brasil
- 2007 – 2007 Curso de curta duração em Ferramentas para o estudo de  
reparo do DNA.  
Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e  
Teratogênese Ambiental, SBMCTA  
Ribeirão Preto, SP, Brasil
- 2008 – 2008 Treinamento para implantação e realização do Curso de  
Férias pertencente a Rede Nacional Jovens Talentos.  
Instituto de Bioquímica Médica UFRJ, IBQM  
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 2008 – 2008 Extensão universitária em Curso Básico de Citometria de  
Fluxo.  
Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC,  
Porto Alegre, RS, Brasil

### **Prêmios e títulos**

- 2005 Prêmio Iniciação Científica apresentação oral sessão  
Mutagênese do 51º Congresso Brasileiro de Genética, SBG
- 2005 Destaque do XVII Salão de Iniciação Científica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- 2006 Prêmio Iniciação Científica do 52º Congresso Brasileiro de  
Genética, SBG

- 2007 Prêmio Pós-graduação do 53º Congresso Brasileiro de Genética, SBG
- 2011 Menção Honrosa No Prêmio Pós-Graduação do 57º Congresso Brasileiro de Genética, SBG

### **Produção Bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. GERHARDT D., HORN A.P., GAELZER M.M., FROZZA R.L., DELGADO-CAÑEDO A., **PELEGRINI A.L.**, HENRIQUES A.T., LENZ G. & SALBEGO C. (2008). Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Invest New Drugs*.
2. LOPEZ P.L., FILIPPI-CHIELA E.C., SILVA A.O., CORDERO E.A., GARCIA-SANTOS D., **PELEGRINI A.L.**, REDER G.M., BARBIERI N.L. & LENZ G. (2012). Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown. *Oncology*, 83, 75-82.
3. **PELEGRINI A.L.**, MOURA D.J., BRENNER B.L., LEDUR P.F., MAQUES G.P., HENRIQUES J.A., SAFFI J. & LENZ G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, 25, 447-54.

#### **Apresentação de trabalhos em eventos**

1. **PELEGRINI, A. L.**; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J.; MENCK, C. F. M.; LENZ, G. (2011). Nek1 silencing affects cisplatin DNA damage response. Hotel Monte Real; Águas de Lindóia; 57º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA; Sociedade Brasileira de Genética.
2. **PELEGRINI, A. L.**; MOURA, D. J.; MARQUES, G. P.; BRENNER, B. L.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J.; LENZ, G. (2010). The Nima related kinase Nek1 is involved in DNA repair and cell cycle regulation in mammalian cells. Estados Unidos/Inglês; Hotel Ventura Beach Marriot; Ventura, Califórnia; Gordon Research Conference - DNA Damage, Mutation & Cancer.

3. MARQUES, G. P.; **PELEGRINI, A. L.**; BRENNER, B. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2010). The mammalian Nek1 kinase is involved in DNA crosslink repair. XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Society (SBBq), Foz do Iguaçu.
4. **PELEGRINI, A. L.**; BINOTTO, N.; BRENNER, B. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2009). Nek1 Knockdown Delays DNA Repair and Impairs G2 Checkpoint in HEK293t Cells. Brasil/Português; Hotel Monte Real; Águas de Lindóia SP; XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.
5. **PELEGRINI, A. L.**; MARQUES, G.P.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2009). O silenciamento da Nek1 altera a reparação do DNA de células HEK293T tratadas com cisplatina. XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre.
6. BINOTTO, N.; **PELEGRINI, A. L.**; BRENNER, B. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2008). O silenciamento da Nek1 altera o padrão de migração do DNA em células Hek293t tratadas com cisplatina. XX Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
7. BRENNER, B. L.; **PELEGRINI, A. L.**; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2007). Células com a cinase Nek1 silenciada apresentam maior sensibilidade a agentes mutagênicos. XIX Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
8. **PELEGRINI, A. L.**; BRENNER, B. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2007). O silenciamento da Nek1 provoca o aumento no índice de dano ao material genético de células expostas a agentes mutagênicos. VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, SBMCTA, Mangaratiba.
9. **PELEGRINI, A. L.**; BRENNER, B. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2007). O silenciamento da Nek1 provoca o aumento no índice de dano ao material genético de células expostas a agentes mutagênicos. Brasil/Português; Hotel Monte Real; Águas de Lindóia, SP. 53º Congresso Brasileiro de Genética; Sociedade Brasileira de Genética.

- 10. BRENNER, B. L.; PELEGRINI, A. L.; MOURA, D. J.; SAFFI, J; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2007).** Células com a cinase Nek1 silenciada apresentam maior sensibilidade a agentes mutagênicos. Brasil/Português; Hotel Monte Real; Águas de Lindóia, SP. 53º Congresso Brasileiro de Genética; Sociedade Brasileira de Genética.
- 11. PELEGRINI, A. L.; BRENNER, B. L.; MOURA, D J; SAFFI, J; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2006).** O silenciamento da cinase humana Nek1 altera o reparo normal de danos ao DNA induzidos por agente alquilante. Brasil/Português; Foz do Iguaçu, Paraná; 52º Congresso Brasileiro de Genética; Sociedade Brasileira de Genética.
- 12. BRENNER, B. L.; PELEGRINI, A. L.; FIRPO, C.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2006).** O silenciamento da cinase humana Nek1 em células Hek293t altera o reparo normal de danos ao DNA. XVIII Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 13. PELEGRINI, A. L.; BRENNER BL; FIRPO, C.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2006).** O silenciamento da cinase humana Nek1 altera o reparo normal de danos ao DNA induzidos por agente alquilante. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre.
- 14. PELEGRINI, A. L.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2005).** O silenciamento da quinase Nek1 aumenta o dano ao DNA em células HEK293t. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia.
- 15. PELEGRINI, A. L.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M; SAFFI, J; HENRIQUES, J. A. P.; LENZ, G. (2005).** O silenciamento da quinase Nek1 aumenta o dano ao DNA em células HEK293t. XVII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre.
- 16. PELEGRINI, A. L.; BRENNER, B.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J A P ; LENZ, G. (2005) .** O silenciamento da Nek1 altera reparo normal de danos ao DNA causados por agente alquilante. VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre.
- 17. PELEGRINI, A. L.; SCAPIN, S. M. N.; ZANCHIN, N. I. T. (2005).** Clonagem, expressão e purificação da GTPase Rab21 humana para análises estruturais. 15º



Reunião anual de Usuários do LNLS, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP.

**18. ROSSATO, J. I.; PELEGRINI, A. L.; CLARKE, J. H. R.; BEVILAQUA, L R M ; CAMMAROTA, M. ; IZQUIERDO, I. (2004).** Short-term Memory expression does not affect expression or extinction of long-term memory. XIX reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia.

**19. PELEGRINI, A. L.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. (2004).** Memory consolidation induces the CAMKII and RNMDA-dependent phosphorylation of hippocampal GLUR1. XIX reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia.

**20. PELEGRINI, A. L.; CLARKE, J. H. R.; ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; (2004) .** A extinção da memória para o labirinto aquático de Morris não requer síntese proteica no hipocampo dorsal. XVI Salão e na XIII feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

**21. CLARKE, J. H. R.; PELEGRINI, A. L.; ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; (2004) .** A formação da memória para o labirinto aquático de Morris requer síntese proteica na região CA1 do hipocampo de ratos. XVI Salão e na XIII feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

**22. PELEGRINI, A. L. ; VAZ JÚNIOR, I. S. ; FREITAS, D. R. J.; MASUDA, A. (2003).** Atividade enzimática da Glutathione-S-transferase em diferentes tecidos do carrapato *Boophilus microplus*. 49º congresso de genética da Sociedade Brasileira de Genética, Águas de Lindóia.

**23. PELEGRINI, A. L.; KERR, D. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. ; CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.(2003).** A inibição das quinases de extremo terminal-Jun hipocampais acentua a memória de curta duração, mas bloqueia a formação da memória de longa duração e a evocação na tarefa de esquivas inibitória. XV Salão e na XII feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

**24. PELEGRINI, A. L. ; VAZ JUNIOR, I. S. ; MASUDA, A. (2002).** Obtenção da proteína recombinante Glutathione S-transferase de *Boophilus microplus* para cristalografia e ensaio de atividade enzimática. XIV Salão e XI Feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

### **Organização de Eventos e Cursos ministrados**

**1. QUAYLE, C. ; GARCIA, C. C. M. ; PELEGRINI, A. L. ; VESSONI, A. T. ; ANDRADE, A. Q. ; VIEIRA, D. B. ; ALVES, F. I. A. ; VILAR, J. B. ; LIMA, L. C. A. ; LERNER, L. K. ; CASTRO, L. P. ; GOMES, L. R. ; BRAZ, V. S. ; MIRANDA, V. ; KAJITANI, G. S. ; MUNFORD, V. ; BOCCARDO, E. ; GALHARDO, R. S. ; MENCK, C. F. M. . I CURSO DE INVERNO 2012 RESPOSTAS A DANOS NO DNA: IMPLICAÇÕES EM ENVELHECIMENTO E CÂNCER. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

**2. Pelegrini, Alessandra Luiza ; Barbieri, N. L. ; Nör, C. ; Piovesan, A., R. ; Ribeiro, C. W. ; Oliveira, E. S. ; Filippi-Chiela, E. C. ; Vargas, E.F.F ; Kulcheski, F. ; Silva, L. A. D. ; Perini, P. ; Maschmann, R. A. ; Barcellos, R.B. ; Braun, R. L. ; Carlini, C. R. . Curso de férias: A Célula. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

**3. PELEGRINI, A. L. ; silva, A. O. ; Sperotto, A. R. M. ; Nör, C. ; BORDIN, D. L. ; Villodre, E. S. ; Lopes, F. C. ; Pereira, J. Q. ; Barbieri, N. L. ; Perini, P. ; Grandi, T. ; Tichota, D. M. ; Gonchoroski, T. ; Divino, B. D. ; Carlini, C. R. . Curso de Férias : De onde vem as células?. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

**4. Pelegrini, Alessandra Luiza ; Barbieri, N. L. ; Pinhatti, V. R. ; SANDRI, M. R. ; Crestani, J. ; Sousa, F. G. ; Matuo, R. ; Lopez, P. L. C. ; Villodre, E. S. ; Reck, J. ; Margis, R. ; Carlini, C. R. . Curso de Férias - Microrganismos: O mundo que não enxergamos. 2009. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

**5. Pelegrini, Alessandra Luiza ; Barbieri, N. L. ; Filippi-Chiela, E. C. ; Vargas, E.F.F ; Villodre, E. S. ; Lopes, F. C. ; Maboni, F ; Salton, G. D. ; Vargas, J. E. ; Sachett, L. G. ; Lopez, P. L. C. ; VELHO, R. V. ; Weber, S. S. ; Feder, V. ; Margis, R. ; Carlini, C. R. . Curso de Férias - Microrganismos: Mocinhos ou Bandidos?. 2009. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

**6. Pelegrini, Alessandra Luiza ; KINDEL, A. . II Jornada Acadêmica da Biologia da UFRGS ( II JABUFRGS). 2005. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).**

