UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Identificação de alvos moleculares associados à resistência
a gemcitabina e análogos de rebecamicina usando
Saccharomyces cerevisiae como modelo celular

Lucas de Sousa Cavalcante

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Identificação de alvos moleculares associados à resistência
a gemcitabina e análogos de rebecamicina usando
Saccharomyces cerevisiae como modelo celular

Lucas de Sousa Cavalcante

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cavalcante, Lucas de Sousa

C376i Identificação de alvos moleculares associados à resistência a gemcitabina e análogos de rebecamicina usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular / Lucas de Sousa Cavalcante. -- São Paulo, 2013.
97p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Souza, Gisele Monteiro de

1. Quimioterápicos : Química farmacêutica 2. Biologia molecular : Levedura 3. Cancer I. T. II. Souza, Gisele Monteiro de, orientador.

615.19 CDD

Lucas de Sousa Cavalcante

Identificação de alvos moleculares associados à resistência a
gemcitabina e análogos de rebecamicina usando *Saccharomyces*
cerevisiae como modelo celular

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza, pelos ensinamentos, compreensão e amizade ao longo desses anos de convivência, me fazendo amar cada dia mais a Ciência e que, apesar das dificuldades, sempre me ajudou a manter o otimismo.

- ✓ Aos meus pais, irmãos e amigos, por me fazerem ser quem sou hoje.

- ✓ À Grazielle, Tiago e Susan, que ajudaram de maneira fundamental na execução desse trabalho.

- ✓ Aos colegas de trabalho do laboratório, da FCF e do laboratório do Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela convivência.

- ✓ À FAPESP e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Cavalcante, L.S. **Identificação de alvos moleculares associados à resistência a gemcitabina e análogos de rebecamicina usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular**. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. O envelhecimento da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, indica que esse índice tende a aumentar a cada ano. Como o câncer é uma doença complexa, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e na resposta aos tratamentos atuais são essenciais para mudar esse cenário. Gemcitabina e rebecamicina são moléculas que apresentam atividade antitumoral, sendo que a primeira é usada como agente único no tratamento de adenocarcinoma pancreático, ou em conjunto com outras drogas em vários tipos de câncer, enquanto que alguns análogos da segunda já foram utilizados em testes clínicos de fase II em câncer de mama e pulmão. A gemcitabina é um análogo de desoxicidina que interrompe a síntese de DNA, além de apresentar efeito inibitório sobre várias proteínas, como ribonucleotídeo redutase. A rebecamicina e vários de seus análogos são indolocarbazóis que incluem moléculas intercalantes de DNA, além de inibidores da topoisomerase I e de algumas proteína quinases, como PKC e Chk1. Alguns indolocarbazóis apresentam também importante atividade antimicrobiana. Os mecanismos de resistência a essas drogas são pouco conhecidos e alguns já foram sugeridos; porém, ainda não há consenso sobre as vias celulares envolvidas. A proposta desse trabalho foi identificar genes associados às respostas a gemcitabina e análogos de rebecamicina, usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular. Avaliamos a atividade biológica de nove análogos de rebecamicina sintéticos, destacando o composto mais promissor para estudos mais aprofundados. Por meio de análise direta de fenótipo em escala genômica, identificamos genes cuja deleção resulta em hipersensibilidade ao análogo de rebecamicina, dentre eles um sensor de estresse relacionado à via Pkc1/Mpk1 quinase (*SLG1*), uma lisina deacetilase (*RPD3*) e uma lisina demetilase (*JHD2*). Esses três genes estão relacionados a uma maior atividade de proteínas de resistência multidroga, sugerindo que diversas vias regulatórias são importantes na resposta a indolocarbazóis. Também verificamos, por análise quantitativa de fenótipo (ensaio Bar-Seq), que a deleção de genes com funções atualmente pouco relacionadas à gemcitabina conferiam maior sensibilidade a droga, como uma arginina metiltransferase (*HMT1*) e uma subunidade do complexo Cop9 sinalossomo (*CSII*), o qual está relacionado a regulação da atividade de diversas proteínas, incluindo ribonucleotídeo redutase. Em conjunto, nossos resultados demonstram que vias ainda não relacionadas a resposta a esses compostos podem ser de grande contribuição para a compreensão dos mecanismos de resistência aos mesmos, auxiliando no desenvolvimento de novos tratamentos e fármacos.

Palavras-chave: gemcitabina, análogos de rebecamicina, levedura, toxicogenômica, câncer.

ABSTRACT

Cavalcante, L.S. **Identification of molecular targets related to the resistance to gemcitabine and to rebeccamycin analogs using *Saccharomyces cerevisiae* as model cell.** 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

Cancer is one of the main causes of death throughout the world. Population aging, especially in developing countries, points to an increase in cancer incidence over the coming years. As cancer is a complex disease, a better understanding of the mechanisms involved in carcinogenesis and in the current treatments is essential to change this scenario. Gemcitabine and rebeccamycin are molecules that present antitumoral activity. The first one is currently used as a single agent in pancreatic cancer treatment or in combination with other drugs in several types of cancer, while analogs of the second have been tested in phase II clinical trials in breast and lung cancers. Gemcitabine is a deoxycytidine analog that inhibits DNA synthesis, and also presents inhibitory effects over several proteins, such as ribonucleotide reductase. Rebeccamycin and its analogs are indolocarbazoles which include DNA intercalant molecules, as well as topoisomerase I and protein kinase inhibitors, such as PKC and Chk1. The mechanisms related to the resistance to these drugs are poorly understood and some of them have been suggested; even though, there is no consensus about the cellular pathways involved. The aim of this work was to identify genes associated to the response to gemcitabine and rebeccamycin analogs using *Saccharomyces cerevisiae* as a model cell. We evaluated the biological activity of nine synthetic rebeccamycin analogs, selecting the most promising compound for deeper studies. In a genome-wide qualitative phenotypic analysis, we have identified genes whose disruption resulted in hypersensitivity to the rebeccamycin analog. Among them, we found a stress-sensor involved in Pkc1/Mpk1 kinase pathway (*SLG1*), a lysine deacetylase (*RPD3*) and a lysine demethylase (*JHD2*). These three genes are related to an increased multidrug resistance activity, suggesting that several regulatory pathways play a role in the response to indolocarbazoles. We also found, by means of a quantitative phenotypic analysis (Bar-Seq assay), increased sensitivity to gemcitabine in null-mutants of genes whose functions are currently poorly related to the drug, like an arginine methyltransferase (HMT1) and a subunit of Cop9 signalosome complex (CSI1), which is related to activity regulation of several enzymes, including ribonucleotide reductase. Together, our results show that pathways which were previously unrelated to the response to these compounds can be useful for a better understanding of their resistance mechanisms, providing insights into new drug development and therapy.

Keywords: gemcitabine, rebeccamycin analogs, yeast, toxicogenomics, cancer.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ψ – pseudouridina

ABC – *ATP-binding cassette*

Ara-C – citosina arabinose

Cdk – *Cyclin-dependent kinase* (quinase dependente de ciclina)

Chk1 – *checkpoint kinase 1*

CMP – citidina monofosfato

CRL – *cullin-RING ubiquitin ligase*

CSN – Cop9 sinalossomo

dCK – desoxicitidina quinase

dCTP – desoxicitidina trifosfato

dCTD – desoxicitidilato deaminase

dFdC – 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (gemcitabina)

dFdCMP – 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina monofosfato (gemcitabina monofosfato)

dFdCDP – 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina difosfato (gemcitabina difosfato)

dFdCTP – 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina trifosfato (gemcitabina trifosfato)

dFdU – 2',2'-difluoro-desoxiuridina

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

dTMP – desoxitimidina monofosfato

dUMP – desoxiuridina monofosfato

DMSO – dimetilsulfóxido

H3K4 – lisina 4 da histona 3

hCNT – *human concentrative nucleoside transporter*

hENT – *human equilibrative nucleoside transporter*

KDAC – lisina deacetilase

MAPK – *mitogen-activated protein kinase* (MAP-quinase)

mtDNA – DNA mitocondrial

nDNA – DNA nuclear

NGS – *next generation sequencing* (sequenciamento de nova geração)

NT – *nucleoside transporter* (transportador de nucleosídeos)

OD_{600nm} – densidade ótica em 600 nanômetros

ORF – *open reading frame*

PKB – proteína quinase B

PKC – proteína quinase C

QV – *quality value*

RNR – ribonucleotídeo redutase

ROS – *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

TK2 – timidina quinase 2

Top1 – topoisomerase tipo I

TS - timidilato sintase

UBE2M - *Ubiquitin-conjugating enzyme E2M*

UFC – unidades formadoras de colônia

UMP – uridina monofosfato

YKO – *Yeast Knock Out*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	<i>Aspectos epidemiológicos do câncer .....</i>	11
1.2	<i>Desafios terapêuticos – gemcitabina .....</i>	12
1.3	<i>Carcinogênese e bases moleculares do câncer .....</i>	13
1.4	<i>Gemcitabina – incorporação e metabolismo .....</i>	15
1.5	<i>Rebecamicina .....</i>	21
1.6	<i>Toxicogenômica em <u>Saccharomyces cerevisiae</u> como uma abordagem para caracterização de vias relacionadas a resposta a drogas.....</i>	23
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	<i>Objetivos gerais .....</i>	28
3.2	<i>Objetivos específicos .....</i>	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	<i>Linhagens e meios de cultura .....</i>	29
4.2	<i>Preparação dos <u>pools</u> .....</i>	29
4.3	<i>Administração de gemcitabina e análogos de rebecamicina .....</i>	31
4.4	<i>Ensaio de viabilidade .....</i>	32
4.5	<i>Extração de DNA genômico .....</i>	32
4.6	<i>Preparação de biblioteca de DNA para análise por NGS (Bar-Seq) .....</i>	32
4.7	<i>Análise dos dados produzidos por NGS .....</i>	34
5	RESULTADOS	36
5.1	<i>Gemcitabina .....</i>	36
5.1.1	<i>Avaliação inicial do tratamento com gemcitabina .....</i>	36
5.1.2	<i>Screening da coleção Yeast Knockout Deletion Collection (YKO) em busca de mutantes sensíveis ao tratamento com gemcitabina por análise direta de fenótipo .....</i>	37
5.1.3	<i>Reavaliação dos tratamentos com gemcitabina .....</i>	42
5.1.4	<i>Ensaio competitivo dos mutantes da coleção YKO na presença de gemcitabina .....</i>	44
5.1.5	<i>Identificação de genes associados à resposta a gemcitabina .....</i>	45
5.2	<i>Análogos de rebecamicina .....</i>	50

5.2.1	<i>Avaliação inicial da atividade biológica dos análogos de rebecamicina</i>	50
5.2.2	<i>Identificação de genes associados à resposta ao análogo de rebecamicina</i>	
	<i>RebC</i>	57
6	DISCUSSÃO	62
6.1	<i><u>Saccharomyces cerevisiae</u> como modelo para identificação de alvos moleculares de drogas</i>	62
6.2	<i>Identificação de genes associados a resposta a gemcitabina</i>	63
6.2.1	<i>O papel de ribonucleotídeo redutase e das proteínas do Cop9 sinalossomo na resposta a gemcitabina</i>	67
6.3	<i>Identificação de genes associados a resposta ao análogo de rebecamicina RebC</i>	69
7	CONCLUSÕES	75
8	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos epidemiológicos do câncer

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo. Em 2008, cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram por conta da doença, o que representou 13% entre todas as causas de morte no planeta naquele ano (Ferlay *et al.*, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano de 2030, mais de 20 milhões de novos casos de câncer sejam diagnosticados, causando cerca de 13 milhões de mortes (Ferlay *et al.*, 2010). A expectativa para 2013 é de mais de 500 mil novos casos no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), e de cerca de 1,6 milhões de casos nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2013). A figura 1 mostra os números de casos e de mortalidade no mundo, para o ano de 2008, de acordo com a localização tumoral.

Figura 1: Novos casos e mortalidade relacionados ao câncer no mundo, em números absolutos, no ano de 2008. Adaptado de Ferlay *et al.*, 2010.

Entre alguns dos tipos de câncer mais comuns, observa-se que, apesar da grande incidência, a relação entre mortalidade e novos casos é relativamente baixa, como no caso do câncer de próstata e mama. Muito disso se deve às maiores facilidades de diagnóstico e cirurgia, além de um maior conhecimento da biologia desses tipos de tumor (Smith & Isaacs, 2011; Nakagawa *et al.*, 2012). Por outro lado, outros tipos de câncer, como o de pâncreas, possuem uma altíssima taxa de mortalidade, o que faz com que avanços no tratamento dessa neoplasia sejam imprescindíveis.

Acredita-se que as principais causas atreladas ao aumento da incidência de câncer na população mundial estejam relacionadas ao envelhecimento da população e à adoção de hábitos prejudiciais à saúde, como tabagismo, consumo de grandes quantidades de gorduras saturadas e sedentarismo, especialmente em países em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2010). Isso demonstra que, além de investimentos para o tratamento, também são necessárias ações preventivas e maior grau de informação para reverter esse cenário.

1.2. Desafios terapêuticos – gemcitabina.

Um dos maiores desafios da medicina atualmente é compreender os mecanismos relacionados à sensibilidade e à resistência aos atuais tratamentos de câncer. Apesar de muito conhecimento ter sido estabelecido ao longo dos últimos anos, ainda não existem padrões claros que permitam que tratamentos sejam administrados com grande eficácia, especialmente quando se trata de alguns tipos de câncer mais severos. O adenocarcinoma de pâncreas, a principal neoplasia pancreática, é um exemplo desses casos mais delicados, conforme demonstrado na figura 1.

O adenocarcinoma pancreático é a quarta principal causa de morte por câncer no ocidente, representando 4% das mortes relacionadas ao câncer no Brasil, segundo dados do INCA, sendo a expectativa de vida pós-diagnóstico de apenas quatro meses, o que está diretamente relacionado ao seu diagnóstico tardio (Andersson *et al.*, 2009). A gemcitabina é utilizada como um dos principais agentes quimioterápicos para adenocarcinoma de pâncreas – o que pode aumentar a expectativa de vida pós-diagnóstico para cerca de seis meses (Andersson *et al.*, 2009). Também é aplicada para tratar outros tipos de câncer, geralmente em combinação com outras drogas – em especial as que contêm platina, como carboplatina e

cisplatina – em tumores de ovário, mama, pulmão e bexiga (Nagourney *et al.*, 2008; Reck *et al.*, 2009).

Apesar do uso abrangente e relativamente comum no tratamento de câncer, a resistência intrínseca ou adquirida à gemcitabina, especialmente no câncer de pâncreas, pode comprometer severamente o tratamento. Os mecanismos relacionados à resistência à gemcitabina ainda não são totalmente claros, o que é verdadeiro também para diversos outros antitumorais. Estratégias como combinações entre diferentes agentes são amplamente utilizadas como forma de aumentar a eficácia de alguns tratamentos, comum no caso do adenocarcinoma pancreático (Greenhalf & Thomas, 2011). Novas possibilidades, como a utilização de coquetéis, contendo até três ou mais drogas, de forma semelhante aos tratamentos antivirais utilizados em portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana), também vem sendo atualmente discutidas e apoiadas por alguns pesquisadores (Kaiser, 2011). Porém, isso poderia tornar os mecanismos de resistência ainda mais complexos e difíceis de compreender, além de haver a necessidade da troca do coquetel conforme as células tumorais adquiram resistência a determinadas drogas.

Dessa forma, muitas vezes a utilização de novos fármacos acaba sendo uma alternativa. Agentes de origem natural, como rebecamicina, emodina e oleuropeina tem sido amplamente estudados devido as suas propriedades antitumorais e/ou antiproliferativas (Bush *et al.*, 1987; Srinivas *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2009). Alguns análogos da rebecamicina, em especial, já passaram por testes clínicos de fase II em seres humanos para utilização em alguns tipos de câncer, como do duto biliar (Dowlati *et al.*, 2009), de mama (Burstein *et al.*, 2007) e de pulmão (Dowlati *et al.*, 2005), além de testes de fase I em algumas neoplasias hematológicas (Borthakur *et al.*, 2008).

1.3. Carcinogênese e bases moleculares do câncer

Uma abordagem para o estabelecimento dos mecanismos moleculares associados ao câncer que tem sido bastante discutida e estudada, especialmente na era pós-genômica, está baseada na compreensão da genômica de células tumorais. Mutações em regiões do DNA genômico (gDNA) de células somáticas podem ser classificadas de acordo com suas consequências para o desenvolvimento de um câncer, num processo análogo à evolução por

meio de seleção natural Darwiniana, na qual subpopulações clonais estão sujeitas às pressões seletivas de seu microambiente – nesse caso, tecidos –, sendo selecionadas, portanto, de acordo com seu *fitness* (Nowell, 1976; Greaves & Maley, 2012). Dentro desse paradigma, mutações passageiras são aquelas que não conferem qualquer vantagem adaptativa às células que as carregam, ao passo que as indutoras são aquelas que conferem alguma vantagem, atingindo proto-oncogenes, por exemplo, e desencadeando a carcinogênese (Stratton *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não há consenso sobre quais proto-oncogenes mutados (oncogenes) em uma célula são suficientes para o desenvolvimento de um tumor, visto que diferentes oncogenes já foram associados ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (Stratton, 2011). O mapeamento dessas mutações e, conseqüentemente, o conhecimento de quais delas são frequentes em determinados tipos de câncer – reconhecendo assim as vias diretamente afetadas por essas mutações –, poderia conferir um melhor direcionamento para o tratamento, aumentando assim sua eficácia.

As tecnologias modernas de sequenciamento de DNA como NGS (*next generation sequencing*) têm trazido grandes contribuições nesse sentido, revelando padrões mutacionais em células cancerosas relacionadas à instabilidade genômica das mesmas (Cassidy & Venkitaraman, 2012). Isso inclui mutações em regiões relacionadas aos mecanismos de controle epigenético – como posicionamento de nucleossomos, modificações de histonas e alterações nos padrões de metilação do DNA – que tem se mostrado como fator determinante na evolução tumoral (Shen & Laird, 2013). Contudo, apesar das grandes quantidades de dados que uma análise por NGS produz, ainda existem desafios a serem superados, tanto no que diz respeito à heterogeneidade dos genomas de células individuais de um único tumor quanto em relação à compreensão das mudanças temporais nesses genomas durante a evolução do processo de carcinogênese (Cassidy & Venkitaraman, 2012).

Além das mutações no gDNA, mutações em regiões específicas do DNA mitocondrial (mtDNA) também já foram encontradas em células de diversos tipos de câncer, estando muitas delas presentes em regiões que codificam para proteínas dos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Chatterjee *et al.*, 2006). Apesar da relação entre mutações no mtDNA e o desenvolvimento do câncer ainda não ser bem compreendida, acredita-se que isso esteja relacionado à apoptose (Lemarie e Grimm, 2011), à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) e a alterações de diversas vias metabólicas relacionadas à obtenção de energia (Chatterjee *et al.*, 2006).

A aneuploidia (quantidade de cromossomos que não seja um múltiplo exato do número haplóide da espécie) também é outro fator relacionado à instabilidade genômica e ao câncer, podendo ser um evento inicial do desenvolvimento de um tumor ou consequência dele; de fato, grande parte das células tumorais são aneuplóides (Torres *et al.*, 2008). Sheltzer *et al.* (2011) demonstraram que a aneuploidia leva à instabilidade genômica em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, exibindo um fenótipo mutador que permite o acúmulo de mutações no gDNA. Esse acúmulo pode ser revertido pela deleção do gene REV3, que codifica para a subunidade catalítica da DNA polimerase ζ , envolvida na síntese translesão. Os autores sugerem que essa instabilidade genômica, a qual está diretamente relacionada a defeitos nas vias de reparo de DNA, pode beneficiar células sob pressão seletiva, facilitando o crescimento e a proliferação de forma semelhante a que ocorre em células tumorais (Sheltzer *et al.*, 2011). Substituições de aminoácidos na subunidade catalítica da DNA polimerase δ de *S. cerevisiae*, em posições análogas às encontradas na proteína humana em alguns tipos de câncer, também mostraram ter relação importante com a instabilidade genômica nessa levedura (Daele *et al.*, 2010). Isso demonstra que alterações nos mecanismos de controle da síntese e do reparo de DNA são fatores diretamente relacionados com a aneuploidia e a instabilidade genômica, conhecidas causas da tumorigênese.

1.4. Gemcitabina – incorporação e metabolismo.

A gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina; dFdC) é um análogo do nucleosídeo desoxicitidina, no qual átomos de flúor substituem os hidrogênios do carbono 2' da desoxirribose. É o mais importante análogo de citidina desde a citosina-arabinose (Ara-C), apresentando também diferentes propriedades dentro da célula. A incorporação dessas duas moléculas no DNA também apresenta diferenças importantes: enquanto a gemcitabina é incorporada basicamente durante a replicação do DNA, a Ara-C pode ser também incorporada por vias de reparo de DNA (Iwasaki *et al.*, 1997). A estrutura química dessas moléculas está representada na figura 2.

Figura 2: Estrutura química da desoxicitidina, citosina arabinose e gemcitabina. Adaptado de Mini *et al.*, 2006.

Nucleosídeos e seus análogos são transportados para o meio intracelular e compartimentos celulares através de transportadores de nucleosídeos (NTs: *Nucleoside Transporters*). Em humanos, são conhecidos sete NTs, classificados de acordo com o processo de transporte: equilibrativos (hENTs: *human Equilibrative Nucleoside Transporters*), que funcionam a favor do gradiente de concentração e são independentes de íons; e concentrativos (hCNTs: *human Concentrative Nucleoside Transporters*), que realizam transporte unidirecional de forma sódio-dependente (Molina-Arcas *et al.*, 2009). O principal transportador de gemcitabina é hENT1; entretanto, uma menor quantidade da droga pode ser também transportada por hENT2, hCNT1 e hCNT3 (Mackey *et al.*, 1998). A resposta à gemcitabina está diretamente relacionada à atividade desses transportadores (Spratlin *et al.*, 2004). Em *S. cerevisiae*, o transporte de nucleosídeos é feito pelas proteínas Fun26p e Fui1p, sendo a primeira ortóloga a hENT1 e a segunda possuindo maior especificidade para nucleosídeos contendo uracila (Vickers *et al.*, 2000).

Após a entrada para o meio intracelular, a gemcitabina é fosforilada no citoplasma pela desoxicitidina quinase (dCK) para gemcitabina monofosfato (dFdCMP) (Hatzis *et al.*, 1998) e, em seguida, pela UMP-CMP quinase para gemcitabina difosfato (dFdCDP) (Van Rompay *et al.*, 1999). Acredita-se que a nucleosídeo difosfato quinase seja a enzima responsável pela última etapa de fosforilação (dFdCDP no metabólito dFdCTP), embora isso ainda não esteja bem estabelecido (Wong *et al.*, 2009). A fosforilação da gemcitabina na mitocôndria pela timidina quinase 2 (TK2) mitocondrial já foi demonstrada *in vitro* (Wang *et al.*, 1999). Um esquema do metabolismo já descrito para gemcitabina está representado na figura 3.

et al., 1992). A inibição de RNR ocorre através da ligação covalente entre a gemcitabina difosfato e resíduos de aminoácidos do sítio catalítico (Xu *et al.*, 2006), causando uma mudança conformacional na enzima (Chen *et al.*, 2011), resultando numa diminuição do *pool* de desoxirribonucleotídeos, num mecanismo conhecido como auto-potencialização. Esse processo resulta também na diminuição da atividade de dCTD (Heinemann *et al.*, 1992). Uma vez que a atividade de dCK é também regulada pelos níveis de dCTP, a primeira etapa de fosforilação da gemcitabina – considerada a etapa limitante para produção de dFdCTP (Ruiz van Haperen *et al.*, 1996) – é favorecida. Isso aumenta a probabilidade de uma molécula de dFdCTP ser incorporada ao DNA e, dessa forma, potencializa a atividade citotóxica da gemcitabina (Figura 4B). Além disso, a atividade de dCTD leva à formação de dFdUMP a partir de dFdCMP, inibindo a atividade da timidilato sintase (TS), uma enzima importante do metabolismo de nucleotídeos que catalisa a formação de dTMP a partir de dUMP (Bergman *et al.*, 2002). Baixos níveis de TS podem potencializar a citotoxicidade da gemcitabina em células pancreáticas (Komori *et al.*, 2010).

Figura 4: Principais mecanismos de ação da gemcitabina. (A) Representação do processo de terminação mascarada de cadeia. A DNA polimerase (DNA-Pol) incorpora a gemcitabina trifosfato (dFdCTP) durante a síntese de DNA. Em seguida, outro desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) é incorporado, impedindo a polimerase de prosseguir no alongamento da cadeia. (B) Auto-potencialização da gemcitabina. A ligação covalente da gemcitabina difosfato (dFdCDP) leva à inativação da ribonucleotídeo redutase (RNR), o que diminui o *pool* de dNTPs e a atividade da desoxicitidilato deaminase (dCTD), aumentando a probabilidade da gemcitabina ser metabolizada e, consequentemente, incorporada ao DNA.

Além disso, já foi demonstrado em células cancerosas de pâncreas que a ativação da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) p38 – que pode levar à apoptose em algumas linhagens de células tumorais – é aumentada em tratamentos baseados em gemcitabina (Habiro *et al.*, 2004). Isso está provavelmente relacionado com uma sensibilização mediada pelo aumento da produção de ROS em células cancerosas (Benhar *et al.*, 2001). Além disso, a atividade de MAPK p38 poderia levar à supressão de crescimento induzida pela fosforilação de Hsp27 (*heat shock protein 27*) (Nakashima *et al.*, 2011). Entretanto, diversos estudos mostraram que a fosforilação de Hsp27 poderia estar relacionada à resistência a gemcitabina (Kuramitsu *et al.*, 2012). Esses resultados discrepantes demonstram que os papéis de MAPK p38 e Hsp27 na resposta à gemcitabina ainda não estão totalmente esclarecidos.

Estudos recentes também mostram diferentes efeitos citotóxicos da gemcitabina. Huang *et al.* (2011) verificaram que em linhagens de células cancerosas de bexiga, próstata e pâncreas, a gemcitabina induz um aumento da expressão de UBE2M (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2M – UBC12* em *S. cerevisiae*), que codifica uma enzima envolvida na degradação de proteínas marcadas com ubiquitina pelo proteassomo. Uma dessas proteínas é a p27^{Kip1}, um inibidor de Cdk (*Cyclin-dependent kinase*) que atua na regulação do ciclo celular durante a transição entre as fases G₁ e S e que pode levar a uma maior taxa de apoptose em células tumorais (Chu *et al.*, 2008). Entretanto, p27^{Kip1} também poderia contribuir positivamente para a metástase (Borriello *et al.*, 2011). De todo modo, os níveis intracelulares de p27^{Kip1} podem ter implicações terapêuticas importantes, relacionados também à sensibilidade e/ou resistência de algumas linhagens de células cancerosas a diferentes agentes antitumorais (Chu *et al.*, 2008).

Dentro da célula, a gemcitabina pode sofrer deaminação, principalmente pela citidina deaminase, formando dFdU (2',2'-difluoro-desoxiuridina), que também pode ter efeito citotóxico caso se acumule em altas concentrações (Velkamp *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que dFdU provavelmente está relacionada a um maior acúmulo de dFdC no meio intracelular em células HeLa, pelo aumento do influxo de gemcitabina via hENTs – o que consequentemente leva também a um aumento nos níveis de dFdCTP, num processo que aparentemente depende da ação de dCK e da modulação das vias metabólicas de fosforilação e deaminação de nucleosídeos (Hodge *et al.*, 2011).

Alguns mecanismos de resistência e inibição da gemcitabina têm sido propostos, mas trabalhos de análise em larga escala de possíveis mecanismos de resistência são escassos na literatura. As 5'-nucleotidases são enzimas que podem diminuir a citotoxicidade da

gemcitabina, por apresentar atividade oposta à dCK, convertendo nucleotídeos de volta a nucleosídeos (Mini *et al.*, 2006). Níveis de expressão diminuídos de dCK e hENT1 ou aumentados de RNR também demonstraram resultar em resistência à gemcitabina (Kroep *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2009; Bergman *et al.*, 2005).

As proteínas HMGA1 (*High mobility group AT-hook protein 1*) – fatores de transcrição arquiteturais que regulam vários genes relacionados à progressão tumoral – também têm sido sugeridas como fator fundamental na resistência à gemcitabina, tendo sua expressão aumentada em diversas neoplasias humanas (Fusco & Fedele, 2007). A inibição de HMGA1 leva à diminuição tumoral e aumenta a sensibilidade à gemcitabina, provavelmente através de um mecanismo dependente da serina/treonina quinase AKT (também conhecida como proteína-quinase B, PKB) (Liau *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2012). A resistência à gemcitabina em células cancerosas de pulmão também pode estar relacionada a um aumento da fosforilação de AKT, seguida de um aumento nos níveis de Rad51 (proteína envolvida no reparo de quebras no DNA e em eventos de recombinação). A inibição de Rad51 ou AKT levaram a um aumento da toxicidade da gemcitabina nessas células (Lin *et al.*, 2010).

O fator de transcrição NF- κ B também está relacionado com a resistência à gemcitabina, sendo que uma maior atividade de NF- κ B pode acabar suprimindo a apoptose e, consequentemente, diminuindo a sensibilidade à gemcitabina (Arlt *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011). Os altos níveis de NF- κ B encontrados em alguns tipos de células cancerosas resistentes à gemcitabina podem estar ainda relacionados a sua ativação por APE1/Ref1 (*apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1*). Essa proteína é importante para o reparo de DNA por excisão de bases e para a sinalização redox, incluindo a ativação de NF- κ B (Raffoul *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram que a diminuição dos níveis de APE1/Ref1 sensibiliza células cancerosas de pâncreas à gemcitabina (Lau *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2010). Esses estudos sugerem que NF- κ B é um fator de transcrição importante para os mecanismos de resistência à gemcitabina; entretanto, as vias diretamente afetadas por sua atividade ainda não estão elucidadas.

1.5. Rebecamicina

A rebecamicina é um antibiótico e antitumoral natural isolado do actinomicete *Saccharothrix aerocolonigenes* (Bush *et al.*, 1987), pertencente à classe dos indolocarbazóis. Essa classe inclui moléculas inibidoras de quinases, como a estaurosporina e a UCN-01 (Prudhomme, 2003; Davies *et al.*, 2000), além da rebecamicina e seus análogos, que são moléculas conhecidas por estabilizar complexos entre topoisomerases I e DNA. Essa estabilização está relacionada com suas propriedades intercalantes de DNA, o que pode resultar na inibição da topoisomerase I e aumento de quebras de fita simples (Bailly *et al.*, 1998; Prudhomme, 2000). Alguns análogos de rebecamicina também apresentam efeito inibitório sobre algumas quinases. A estrutura química dessas moléculas está representada na figura 5.

Figura 5: Estrutura química da rebecamicina, estaurosporina e UCN-01 (7-hidroxi-estaurosporina).

Apesar de suas propriedades antiproliferativas, a rebecamicina é um composto bastante hidrofóbico, o que levou diversos grupos de pesquisa a tentar desenvolver análogos que aumentassem sua solubilidade em meio aquoso, mantendo ou ampliando sua atividade intracelular. Entretanto, pouco se sabe sobre as propriedades químicas e estruturais que são cruciais para as atividades dos indolocarbazóis e para a interação com seus alvos, uma vez que estudos cristalográficos dos alvos em interação com esses compostos são escassos na literatura.

Porém, os estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo diversos análogos de rebecamicina com estruturas bastante distintas sugerem que os átomos de cloro são essenciais para a interação com o DNA. A ausência desses átomos, entretanto, parece aumentar a eficiência da inibição sobre a topoisomerase I, bem como a ligação β -N-glicosídica - mas não a α -N-glicosídica - do carboidrato com a estrutura de anéis do indolopirrolocarbazol (Pereira *et al.*, 1996; Anizon *et al.*, 1997; Bailly *et al.*, 1999). Além disso, análogos de rebecamicina declorinados contendo um grupo metila ligado à imida possuem uma maior eficiência na inibição sobre a topoisomerase I e na citotoxicidade sobre células de leucemia (Anizon *et al.*, 1997). Também já foi descrito que um análogo que não continha o heterociclo superior da estrutura da rebecamicina apresentava citotoxicidade muito semelhante com a da rebecamicina, indicando que essa parte da estrutura da molécula não deve ser fundamental para a sua atividade (Voldoire *et al.*, 2004).

Woo *et al.* (2002) mostraram que a rebecamicina não é capaz de inibir a atividade da Top1p (topoisomerase tipo I) de *S. cerevisiae*, porém um análogo declorinado tornava leveduras *Atop1* que expressavam a Top1 humana sensíveis a esse análogo. Alguns análogos de rebecamicina também apresentam atividade inibitória sobre proteína-quinases, como a Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) (Marminon *et al.*, 2008) e a PKC (proteína-quinase C) – envolvida em diversos processos celulares, como regulação da transcrição e proliferação celular (Mellor & Parker, 1998) – independente da presença do carboidrato ligado ao sistema de anéis do indolocarbazol (Pereira *et al.*, 1996). As principais propriedades estruturais em relação à atividade da rebecamicina estão representadas na figura 6.

Figura 6: Principais propriedades químicas e estruturais que influenciam a interação com alvos da rebecamicina e seus análogos.

A inibição da Chk1, uma proteína fundamental no *checkpoint* entre as fases G₂ e M do ciclo celular, tem sido apontada como um potencial alvo de drogas anticâncer, uma vez que a célula pode entrar num processo mitótico prematuro e letal caso esse *checkpoint* não ocorra (Zhou & Bartek, 2004); do contrário, mutações no DNA podem ser replicadas, contribuindo para a proliferação tumoral (Kawabe, 2004). Células cancerosas (bem como organismos unicelulares) apresentam um maior “rigor” nesse *checkpoint* do que aquele entre as fases G₁ e S – dependente da proteína p53, ausente ou mutada na maior parte das células tumorais (Marminon *et al.*, 2008) –, ao contrário de células saudáveis de organismos multicelulares. Já foi descrito que a interação e consequente inibição de Chk1 por estaurosporina e UCN-01 ocorre no sítio de ligação ao ATP dessa proteína (Zhao *et al.*, 2002).

Diante do exposto, o estudo dos mecanismos de ação e resistência aos indolocarbazóis pode ser de grande importância para o tratamento do câncer. Os mecanismos que levam à resistência aos análogos de rebecamicina ainda são desconhecidos, apesar do transportador ABCG2 ter sido recentemente descrito como um dos possíveis responsáveis pela resistência a essas drogas (Robey *et al.*, 2009). ABCG2 é um transportador do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), os quais têm sido relacionados com a resistência a diversas drogas. Em humanos são expressos principalmente em células endoteliais que formam barreiras entre o sangue e outros tecidos (Saito *et al.*, 2010).

Além disso, análises moleculares que envolvam expressão gênica e mecanismos de adaptação e resistência a análogos de rebecamicina são escassos na literatura, uma vez que grande parte dos estudos sobre indolocarbazóis está relacionada a suas vias biossintéticas, que ainda não são totalmente conhecidas (Groom *et al.*, 2011).

1.6. Toxicogenômica em Saccharomyces cerevisiae como uma abordagem para caracterização de vias relacionadas à resposta a drogas

Células humanas são muito complexas, a ponto de ser bastante difícil se estabelecer vias e processos relacionados a respostas a estresses e drogas em geral. Baseado nisso, diversas abordagens utilizando organismos modelo têm crescido significativamente nos

últimos anos, especialmente na era pós-genômica, onde é possível estabelecer relações entre genes dos organismos modelo e seus ortólogos humanos.

A levedura *S. cerevisiae* é um dos principais organismos modelo em biologia molecular, tendo seu genoma completamente sequenciado desde 1996 (Goffeau *et al.*, 1996). Desde então, devido ao fato de ser um organismo de fácil cultivo e crescimento rápido, diversos trabalhos tem sido feitos utilizando *S. cerevisiae* para caracterizar seus aproximadamente 6000 genes, sendo que muito desse conhecimento pode ser extrapolado para outros organismos, inclusive humanos. Por ser um organismo eucarioto unicelular e com um genoma de pequeno tamanho em relação à maioria dos eucariotos superiores – além de existirem diversas técnicas de manipulação genética e metabólica bem estabelecidas –, há uma facilidade muito maior para a caracterização de vias metabólicas e respostas a estresse e drogas em geral (Botstein & Fink, 2011).

Essa facilidade de manipulação genética permitiu, por exemplo, a criação de coleções de mutantes com deleções para basicamente todas as suas ORFs (*Open Reading Frames*) individualmente, chamadas YKO (*Yeast Knock-Out*). Além disso, *S. cerevisiae* pode apresentar formas de vida livre tanto como um organismo haplóide quanto diplóide, o que permitiu a construção de quatro tipos diferentes de coleções de mutantes: homozigoto (diplóide, com as duas cópias de cada gene não essencial deletadas), heterozigoto (diplóide, com apenas uma cópia funcional, onde existem inclusive deleções de genes essenciais), e duas haplóides (uma com tipo sexual *MATa* e outra *MATα*) (Winzeler *et al.*, 1999), disponíveis comercialmente. Cada um dos mutantes dessas coleções carrega ainda marcas que possibilitam sua identificação em diferentes circunstâncias, devido às características dos cassetes de deleção utilizados para a interrupção de suas ORFs. Esses cassetes contêm uma marca de resistência ao antibiótico geneticina (*KanMX4*) flanqueada por duas regiões (*tags*: UPTAG e DOWNTAG) específicas para cada um dos mutantes, além de adaptadores universais (Figura 7).

Figura 7. Cassete de deleção utilizado na construção das coleções de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Giaver *et al.*, 2002.

Cada cassette foi construído através de duas reações de PCR consecutivas (Giaver *et al.*, 2002). Na primeira delas, iniciadores de 74bp para as regiões UPTAG (*forward*) e DOWNTAG (*reverse*) foram utilizados, amplificando o gene *KanMX4* do DNA pFA6-kanMX4. Cada um desses iniciadores consiste em quatro regiões (conforme representado na figura 7):

- Sequências específicas de 18bp, homólogas em sequência às regiões 5' e 3' que flanqueiam a ORF a ser interrompida (em roxo);
- Sequências de 18 e 17bp comuns a todos os mutantes (U1: 5'-GATGTCCACGAGGTCTCT-3' ou D1: 5'-CGGTGTCGGTCTCGTAG-3' – em verde escuro e laranja, respectivamente);
- Sequências de 20bp únicas para cada mutante (*barcode* – rosa e azul);
- Sequências de 18 e 19bp homólogas ao cassette *KanMX4*, também comuns a todos os mutantes (U2: 5'-CGTACGCTGCAGGTCGAC-3' em amarelo ou D2: 5'-ATCGATGAATTTCGAGCTCG-3' –em verde claro).

Na segunda reação de PCR, o cassette é estendido utilizando iniciadores de 45bp específicos para a ORF a ser interrompida. Como a interrupção das ORFs é baseada em recombinação homóloga, essa é a forma de ter especificidade em relação ao alvo.

As características desse cassette de deleção permitem diferentes abordagens para o estudo desses mutantes. Eles podem ser diretamente estudados e seu fenótipo analisado através de medidas de crescimento tanto em meio líquido (taxa de crescimento, aptidão ou *fitness*) quanto em meio sólido (unidade formadora de colônia, viabilidade). É possível, com isso, identificar genes relacionados à resposta a drogas e outros agentes tóxicos. Assim, mutantes que apresentam maior sensibilidade ao tratamento carregam interrupções de genes que podem estar associados à resistência celular ao agente, e vice-versa. Um exemplo disso foi a identificação, por meio de estudos de mutantes individuais, de genes associados ao transporte e à sensibilidade a cisplatina, um antitumoral genotóxico utilizado em casos de câncer de testículo, entre outros (Ishida *et al.*, 2002; Schenk *et al.*, 2003). Outro exemplo foi a identificação de genes associados à resistência ao antitumoral imatinibe, um importante inibidor de tirosina quinase, através de uma análise sistemática de toda a coleção YKO haplóide (dos Santos & Sá-Correia, 2009).

Outra possibilidade é aproveitar-se dos *barcodes* específicos de cada mutante e realizar ensaios de competição em *pools* contendo todos os mutantes da coleção YKO (dos Santos *et al.*, 2012). Como B-U1, B-U2-comp, B-D2-comp e B-D1 são comuns a todos os mutantes da coleção (Figura 7), é possível amplificar em uma única reação de PCR, os *barcodes* de um *pool* de células. O *fitness* de cada mutante é verificado por meio da abundância relativa do seu *barcode* em relação aos demais ou em relação a condições específicas, numa análise quantitativa de fenótipo. Dessa forma, Hillenmeyer *et al.* (2008) identificaram, através de análises de *fitness* em ensaios competitivos, genes relacionados à resposta a mais de 400 compostos, utilizando as coleções YKO diplóides homozigótica e heterozigótica. Assim, é também possível estudar genes não-essenciais cuja ausência não resulte em consequências fenotípicas claras, como ocorre para cerca de 80% da fração do genoma de *S. cerevisiae* (Hillenmeyer *et al.*, 2008).

Quanto às técnicas utilizadas, a análise quantitativa de fenótipo através da quantificação dos *barcodes* pode ser feita utilizando técnicas de detecção como *microarray* ou NGS, de forma confiável e reprodutível (Hillenmeyer *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009). Entretanto, as técnicas de NGS vêm substituindo os *microarrays* nos últimos anos para essa finalidade, uma vez que possui custos relativamente mais baixos, maior facilidade de execução e resultados geralmente mais refinados, haja vista a enorme quantidade de dados provenientes de corridas nos sequenciadores modernos (Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010). Com isso, é possível estudar a função das ORFs deletadas e a possível interação de seus produtos com os mais diversos compostos, além de também possibilitar a identificação de alvos desconhecidos de drogas (Pierce *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A identificação de possíveis novos alvos de drogas pode ser de grande contribuição para aumentar a eficácia das atuais terapias anticâncer, além de poder servir de referência para o desenvolvimento de novos tratamentos. As taxas de mortalidade referentes ao câncer tendem a aumentar com o passar dos anos, sendo que alguns tipos de neoplasias, como as pancreáticas, possuem maiores dificuldades de diagnóstico e tratamento, muitas vezes devido à resistência das células tumorais aos quimioterápicos utilizados. Diversos estudos buscando elucidar mecanismos moleculares de resistência a drogas vêm sendo conduzidos; porém, a complexidade das células humanas, em especial as tumorais, muitas vezes dificulta a identificação de alvos de maneira clara. A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para identificação de alvos moleculares de compostos de interesse humano tem se mostrado bastante eficiente, especialmente com o advento de técnicas como os *microarrays* e o sequenciamento de nova geração; novos alvos de diversas drogas têm sido identificados utilizando essa abordagem, inclusive para compostos antitumorais e de compostos com função desconhecida (Giaver *et al.*, 2004; Hillenmeyer *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Dada a complexidade dos mecanismos de ação atualmente conhecidos e da dificuldade em se realizar essa caracterização em modelos de células humanas, realizamos a identificação de genes em *Saccharomyces cerevisiae* relacionados a resistência à gemcitabina e análogos de rebecamicina, além de possíveis novos alvos celulares dessas drogas.

3.2. *Objetivos específicos*

- Avaliação da atividade biológica de nove análogos sintéticos de rebecamicina;
- *Screening* da coleção *Yeast Knockout Deletion Collection*, a fim de identificar mutantes especialmente sensíveis ou resistentes à gemcitabina e ao análogo de rebecamicina com maior atividade biológica, por meio de ensaios de viabilidade ou de competição em *pools*, analisados por sequenciamento de nova geração (Bar-Seq).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens e meios de cultura

Utilizamos a linhagem haplóide BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*), além da coleção YKO – *Yeast Knockout Deletion Collection* (Invitrogen) –, que contém aproximadamente 5000 clones de leveduras haplóides mutantes dessa mesma linhagem para genes não-essenciais, divididos em 53 placas com aproximadamente 94 clones cada. Também utilizamos a linhagem ATCC 25922 de *Escherichia coli*, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marina Ishii (FBT/FCF/USP), para análises de atividade antibacteriana. Os meios de cultura utilizados foram (Ausubel *et al.*, 1998):

- Meio rico YPD (2 % glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% ágar para meio sólido);
- Meio sintético completo SD (0,67% *Yeast Nitrogen Base*, 0,12% *dropout* [mistura de aminoácidos, exceto leucina, histidina e triptofano], 2% glicose, 60µg/ml leucina, 20 µg/ml histidina, 20 µg/ml triptofano, 20 µg/ml uracila, ágar 2% para meio sólido; pH 6,5);
- Meio para crescimento bacteriano Luria-Bertani LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl).

4.2. Preparação de pools

Preparamos *pools* dos clones mutantes da coleção YKO para facilitar a análise dos aproximadamente 5000 clones. Os *pools* para cada placa foram preparados da seguinte maneira: clones de cada uma das 53 placas foram juntamente inoculados a 30°C em meio YPD líquido contendo geneticina (G418- USB) 200µg/ml por 7 dias e, em seguida, alíquotas foram estocadas a -80°C, utilizando DMSO 7% ou glicerol 15% como crioprotetor (Figura 8). Para a criação de um *pool* único contendo todos os mutantes da coleção, nos baseamos no método descrito por Pierce *et al.* (2009), com pequenas adaptações. Brevemente, as células da

placa estoque foram reativadas em meio YPD líquido contendo geneticina 200µg/ml e depois transferidas para meio YPD sólido. Após crescimento máximo das colônias (entre 3 e 4 dias), as células foram ressuspendidas em meio YPD diretamente na placa, num volume suficiente para que o *pool* estivesse na concentração de 50 OD/ml.

Figura 8: Placa contendo *pools* de mutantes das 53 placas da *Yeast Knockout Deletion Collection* (Invitrogen). Leveduras do poço 1A representam o conjunto de mutantes contidos na placa original 1 (PL1). O poço 2A contém o *pool* de mutantes contidos na placa original 2 e assim sucessivamente, até completar 1 única placa contendo 53 *pools*. O poço E6 é a linhagem BY4741 selvagem (WT) e o poço E7 é o Branco (meio de cultivo apenas).

4.3. Administração de gemcitabina e análogos de rebecamicina

A gemcitabina (Sigma-Aldrich) foi preparada em estoques a 20mM em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 8 (para ensaios com concentrações até 5mM) ou diluída diretamente em meio de cultura (nos ensaios com concentração de 10mM). Os análogos de rebecamicina foram sintetizados pela Dra. Roberta Lopes Drekenner, do grupo do Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (IQ-UNICAMP). Os estoques desses compostos foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de 200 μ M, 2mM, 20mM, 30mM ou 100mM. Nos ensaios, a concentração final de DMSO foi de 0,3% ou 5%, dependendo do experimento (indicada nas respectivas legendas).

Após pré-inóculo a 30°C em meio YPD líquido (18h nos ensaios apenas com a linhagem selvagem BY4741 ou 72h em meio contendo geneticina 200 μ g/ml nos ensaios que incluíam mutantes da coleção YKO, todos sob agitação constante a 200 rpm), as células foram diluídas para OD_{600nm} = 0,2 ou 0,065 (indicado nas legendas) em placas de 96 poços em meio de cultivo contendo os compostos químicos de interesse e incubadas (30°C, 200rpm) por diferentes tempos. Em seguida, aproximadamente 5 μ l de cultura foram transferidos para meio sólido (YPD) e incubados a 30°C por dois dias (Figura 9).

Figura 9: Reativação dos *pools* de levedura e crescimento para análise da resistência ou sensibilidade a gemcitabina e análogos de rebecamicina.

4.4. Ensaios de viabilidade

Nos ensaios de viabilidade por diluição seriada, as células foram incubadas por diferentes tempos conforme descrito acima e diluídas para $OD_{600nm} = 0,2$ (nos ensaios com análogos de rebecamicina) ou 0,03 (nos ensaios com gemcitabina). Em seguida, diluições de 5 ou 10 vezes foram feitas em água deionizada estéril e 5µl de cada diluição foram aplicados em meio YPD sólido, seguido de incubação a 30°C por dois dias. Já para as análises de unidades formadoras de colônia (UFC), a OD_{600nm} foi ajustada para 0,1 e, em seguida, as células foram diluídas 1000 vezes em água deionizada estéril, para um volume final de 1ml; 100µl desse volume foram espalhados em meio YPD sólido e incubados a 30°C por dois dias, para posterior contagem da colônias por inspeção visual.

4.5. Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico (gDNA) do *pool* da coleção YKO, utilizamos o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen), seguindo exatamente o protocolo do fabricante.

4.6. Preparação de biblioteca de barcodes de DNA para análise por NGS (Bar-Seq)

A biblioteca de DNA para análise por NGS (usando a plataforma SOLiD 4, Applied Biosystems, do Centro de Facilidades para Pesquisa – CEFAP, USP) foi preparada a partir do gDNA de um *pool* da coleção YKO. A amplificação da regiões para análise (UPTAG, mostradas na figura 7) foi feita utilizando os seguintes primers:

P1 – 5'-**CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAT**GTCCACGAGGTCTCT-3'

(Reverse)

P2-T001 – 5'-**CTGCCCCGGGTTTCCTCATTCTCTGTGTAAGAGGCTGCTGTAC**
GGCCAAGGCGTGTCGACCTGCAGCGTACG-3' (Forward)

P2-T002 – 5'-**CTGCCCCGGGTTTCCTCATTCTCTAGGGAGTGGTCTGCTGTAC**
GGCCAAGGCGTGTCGACCTGCAGCGTACG-3' (Forward)

P2-T003 – 5'-**CTGCCCCGGGTTTCCTCATTCTCTATAGGTTATACTGCTGCTGT**
ACGGCCAAGGCGTGTCGACCTGCAGCGTACG-3' (Forward)

P2-T004 – 5'-**CTGCCCCGGGTTTCCTCATTCTCTGGATGCGGTCCTGCTGCTG**
TACGGCCAAGGCGTGTCGACCTGCAGCGTACG-3' (Forward)

As regiões 5' em negrito correspondem a P1 (no primer *reverse*) e P2 (nos quatro primers *forward*). As regiões P1 e P2 são necessárias em cada fragmento a ser sequenciado para que haja a ligação do DNA a uma pequena esfera em reação de PCR de emulsão, isolando fisicamente os fragmentos. No caso de sequenciamento *multiplex* (onde há várias amostras biológicas num mesmo ponto de sequenciamento), há necessidades de outras três regiões distintas:

- As sequencias variáveis (em itálico) representam os *tags* necessários para sequenciamento *multiplex*, presente nos primers P2-T00X;
- O adaptador interno (negrito e itálico) é necessário na plataforma SOLiD para sequenciar os *tags multiplex*, presente nos primers P2-T00X;
- Regiões específicas (sublinhadas) utilizadas para amplificar os *barcodes* (presente em ambos os primers).

O resultado final da preparação da biblioteca de fragmentos contendo *tags* (ou *barcodes*) está representada na figura 10.

Figura 10: Fragmento de DNA contendo *barcodes*, após preparação, para sequenciamento *multiplex* com a plataforma SOLiD 4 (Applied Biosystems). Adaptado do manual do fabricante.

A amplificação por PCR foi feita em volumes de 100µl, utilizando o kit Platinum PCR Supermix (Invitrogen), nas seguintes condições: 1 ciclo a 95°C (3min); 25 ciclos de 94°C (30s), 55°C (30s), 68°C (30s); seguida de 10 minutos a 68°C.

4.7. Análise dos dados produzidos por NGS

Para o alinhamento das sequências produzidas pelo SOLiD 4, foi construído inicialmente um genoma referência, contendo todas as sequências de 20 bases dos *barcodes* de cada mutante da coleção YKO (disponível em http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/strain_a_mating_type.txt), espaçadas por 60 bases *N*. Dessa forma, os fragmentos produzidos no sequenciamento (por volta de 31 bases, em média) não podem se sobrepor entre dois *barcodes*. Em seguida, esses fragmentos foram alinhados com o genoma referência, utilizando o software BioEdit. Apenas alinhamentos de pelo menos 10 bases foram considerados, o que em geral é o suficiente para identificar com eficácia cada *barcode* (Smith *et al.*, 2009). Após a contagem das sequências

alinhadas com cada *barcode*, os valores foram normalizados pelo total de contagens em cada condição (controle e tratada) e foram somados 10 *pseudo-counts* a todos os valores. Dessa forma, *barcodes* que foram identificados em uma condição mas não na outra poderiam ser analisados. Além disso, essa pseudo-contagem praticamente elimina a possibilidade de que contagens muito baixas, que podem ter sido geradas por erro, sejam consideradas. Por fim, a distribuição dos dados foi analisada graficamente pela relação controle/tratado, onde valores mais altos do que 1 representam mutantes sensíveis ao tratamento e os mais baixos, insensíveis. Vale ressaltar que esse tipo de análise praticamente dispensa análises estatísticas, pois a hipótese nula é que não há diferença entre controle e tratado, o que é testado na mesma amostra sequenciada quase 5000 vezes (Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010).

5. RESULTADOS

5.1. Gemcitabina

5.1.1. Avaliação inicial do tratamento com gemcitabina

Iniciamos nossos estudos analisando o crescimento de leveduras da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* em meio SD na presença de 1mM de gemcitabina durante 12 horas. Os resultados estão mostrados na figura 11. A partir desses resultados, determinamos a concentração de 1mM de gemcitabina como padrão e iniciamos o *screening* da coleção YKO, em busca de mutantes especialmente sensíveis ao tratamento.

Figura 11: Crescimento da linhagem selvagem BY4741 de *S. cerevisiae*. As células foram crescidas em meio SD contendo 1mM de gemcitabina por até 12 horas (A). A figura B mostra com detalhes o crescimento durante o início da fase lag.

5.1.2. Screening da coleção Yeast Knockout Deletion Collection (YKO) em busca de mutantes sensíveis ao tratamento com gemcitabina por análise direta de fenótipo

Após a construção dos 53 *pools* equivalentes às 53 placas da coleção YKO –que contém cerca de 5000 mutantes de *S. cerevisiae* para genes não essenciais (ver Materiais e Métodos) –, os mesmos foram submetidos a tratamento com gemcitabina (1mM) por 4 horas. Assim, após pré-inóculo *overnight*, as células foram diluídas para $OD_{600nm} = 0,2$ e sua viabilidade foi verificada a 30°C em meio YPD líquido e sólido (alíquotas das células foram transferidas do meio líquido para o sólido após o tratamento ou não – controle - com gemcitabina). Os resultados da viabilidade estão mostrados na figura 12.

Figura 12: Seleção dos *pools* da coleção YKO com sensibilidade à gemcitabina (1mM). Cada um dos *pools* foi inoculado em meio líquido sem (A e C) ou com gemcitabina (B e D), transferidos para meio sólido e incubados por 48 horas a 30°C. (A e B) Início do tratamento, controle ou na presença de 1mM de gemcitabina (as células foram transferidas para o meio sólido imediatamente após a adição de gemcitabina no meio de cultura). (C) Crescimento por 4 horas, sem gemcitabina. (D) Crescimento por 4 horas na presença de 1mM de gemcitabina. A linhagem selvagem está circulada em vermelho; os *pools* escolhidos para análise individual dos mutantes estão circulados em verde.

Esses *pools* apresentaram diferença no crescimento após 4 horas também em meio líquido, avaliada pela proporção entre a OD_{600nm} dos *pools* tratados com gemcitabina e os não tratados. Os dados estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1: *Pools* da coleção YKO que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com gemcitabina (1mM) por 4 horas em meio YPD líquido. Os resultados estão apresentados pela relação entre a OD_{600nm} das células tratadas com gemcitabina e as não tratadas. WT representa a linhagem selvagem.

Pool	Tratada/Controle
30	0,75
37	0,66
WT	0,88

A escolha final dos *pools* se deu levando em consideração o crescimento tanto em meio líquido quanto sólido, comparando também com a linhagem selvagem. Com isso, escolhemos os *pools* referentes as placas 30 e 37 e analisamos isoladamente cada um dos mutantes da placa correspondente (Figura 13), em tratamento idêntico ao realizado na análise dos *pools* (ver figura 12). Os espaços vazios nas placas representam clones que apresentam crescimento mais lento que os demais em meio líquido, o que provavelmente se deu pelo tempo de pré-inóculo de apenas 18 horas.

Figura 13: Tratamento de mutantes isolados presentes nas placas 30 (A-D) e 37 (E-H) da coleção YKO com gemcitabina (1mM), além da linhagem BY4741 selvagem (circulada em vermelho), inoculados em meio YPD líquido com gemcitabina (à direita) ou sem (à esquerda), transferidos para meio sólido e incubados por 48 horas. (A-B; E-F) Início do tratamento. (C-D; G-H) Crescimento por 4 horas. Os espaços vazios representam mutantes que apresentaram crescimento lento e não puderam ser crescidos juntamente com os demais. Os mutantes circulados em verde foram os escolhidos para estudo.

Analisando esses resultados em meio sólido, em conjunto com os resultados do crescimento em meio líquido, escolhemos um candidato de cada uma das placas (mostrados em detalhes na figura 14). A sensibilidade à gemcitabina em meio líquido foi avaliada da mesma maneira que a análise inicial dos *pools*, e os resultados do crescimento dos mutantes selecionados (circulados em verde nas figuras 13 e 14), com a ORF correspondente às mutações, estão mostrados na tabela 2.

Figura 14: Detalhes do tratamento de mutantes isolados nas placas 30 (A) e 37 (B) da coleção YKO com gemcitabina (1mM), além da linhagem BY4741 selvagem (circulada em vermelho), crescidos em meio líquido por 4 horas, transferidos para meio sólido e incubados por 48 horas a 30°C. As fotos representam detalhes das figuras 13D (A) e 13H (B). Estão circulados em verde mutantes que apresentaram menor densidade de colônias em relação à linhagem selvagem (circulada em vermelho).

Tabela 2: Mutantes da coleção YKO, das placas 30 e 37, que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com gemcitabina (1mM) por 4 horas em meio YPD líquido. Os resultados estão apresentados pela relação entre a OD_{600nm} das células tratadas com gemcitabina e as não tratadas. *A proporção da OD_{600nm} entre as células tratadas e o controle para a linhagem selvagem (BY4741) foi de 1,04.

Placa	Poço	ORF	Tratada/Controle*
30	D9	<i>YDR317W</i>	0,94
37	B9	<i>YLR446W</i>	0,6

Contudo, ao tentarmos reproduzir esses resultados com os mutantes das placas 30 e 37 da coleção YKO, obtivemos respostas diferentes em relação a esse tratamento. A única diferença em relação aos resultados mostrados acima foi o tempo de pré-inóculo, que foi de 72 horas, diferentemente do tempo de aproximadamente 18 horas utilizado nos ensaios acima. Dessa forma, todos os mutantes puderam ser avaliados, independentemente da sua velocidade de crescimento (Figura 15).

Figura 15: Tratamento de mutantes isolados presentes nas placas 30 e 37 da coleção YKO com gemcitabina (1mM), além da linhagem BY4741 selvagem (circulada em vermelho), inoculados por 4 horas em meio YPD líquido com ou sem gemcitabina, transferidos para meio sólido e incubados por dois dias a 30°C.

Em face desses resultados, decidimos por reavaliar a concentração de gemcitabina a ser utilizada nos experimentos (Seção 5.1.3), bem como buscar outro método que fosse mais sensível ao tratamento com a droga (Seção 5.1.4).

5.1.3. Reavaliação dos tratamentos com gemcitabina

Como demonstrado acima, tanto a concentração de gemcitabina quanto os métodos utilizados inicialmente para identificação de alvos sensíveis aos tratamentos se mostraram pouco reprodutíveis. Decidimos, assim, aumentar a concentração de gemcitabina nos tratamentos. Iniciamos comparando o crescimento de *S. cerevisiae* nas concentrações de 1mM e 5mM (Figura 16A). Uma vez que não foi observada diferença significativa no crescimento em meio líquido, verificamos também a viabilidade das células por meio da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC; Figura 16B).

Figura 16: Avaliação da sensibilidade da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* a concentrações de até 5mM de gemcitabina (Gem). (A) As células foram crescidas em meio SD contendo 1mM ou 5mM da droga por até 48h. (B) Viabilidade celular em tratamento com gemcitabina (5mM) por 4 horas, verificada através pela quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC).

Como os resultados da figura 16 indicam, a concentração de 5mM de gemcitabina não foi suficiente para inibir o crescimento ou afetar a viabilidade da linhagem selvagem. Numa análise mais detalhada, realizamos uma curva de crescimento em meio SD líquido na

presença de 1mM e 10mM de gemcitabina, durante 48 horas. Os resultados estão mostrados na figura 17.

Figura 17: Curva de crescimento da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae*. As células foram crescidas em meio SD líquido contendo 1mM ou 10mM de gemcitabina por até 48 horas. Cada ponto da curva representa a média de crescimento de três replicatas individuais.

Os resultados da figura 17 mostram um crescimento mais lento por parte das células tratadas com gemcitabina, especialmente na concentração de 10mM. Uma análise do crescimento durante as primeiras 8 horas revela uma diferença ainda maior das células tratadas em relação ao controle (Figura 18).

Figura 18: Detalhe das primeiras 8 horas da curva de crescimento linhagem BY4741 de *S. cerevisiae*, apresentada na figura 17. As células foram crescidas em meio SD líquido contendo 1mM ou 10mM de gemcitabina por até 48 horas. Cada ponto da curva representa a média de crescimento de três replicatas individuais. As curvas são estatisticamente distintas, conforme verificado por teste t pareado ($p < 0,001$ para as amostras tratadas em relação ao controle; $p < 0,01$ entre as amostras tratadas).

Verificamos assim que, especialmente nos pontos entre 5 e 8 horas, há uma diferença estatisticamente significativa do crescimento entre o controle e as células tratadas com 10mM de gemcitabina. Esse resultado foi importante para determinarmos a concentração e o tempo de exposição (estabelecidos em 10mM e 8 horas, respectivamente) para utilização no ensaio de competição dos mutantes da coleção YKO na presença de gemcitabina.

5.1.4. Ensaio competitivo dos mutantes da coleção YKO na presença de gemcitabina

Após a construção de um *pool* contendo todos os mutantes da coleção YKO, seguindo o protocolo estabelecido por Pierce *et al.* (2009), o mesmo foi inoculado em meio SD na presença de 10mM de gemcitabina por 8 horas (de acordo com os resultados apresentados nas figuras 17 e 18), a partir de $OD_{600nm}=0,0625$. Ao fim do tratamento, os valores de OD_{600nm} foram de 0,703 e 0,568 para as condições controle e tratada, respectivamente. Após isso, o gDNA foi imediatamente extraído com o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). Em seguida, realizamos a amplificação dos *tags* do gDNA recém extraído, utilizando o *primer* P1 (*reverse*) em combinações com P2-T001+P2-T002 e P2-T003+P2-T004 como *primers forward* para as amostras controle e tratada, respectivamente, conforme as condições descritas em Materiais e Métodos. O resultado da amplificação, cujo tamanho esperado é de 135bp (soma dos 74bp do primer P2, 20bp dos *barcodes* de cada mutante e 41bp do primer P1), está mostrado na figura 19.

Figura 19: Produtos da amplificação dos *barcodes* do *pool* da *Yeast Knockout Deletion Collection* (Invitrogen), a partir do DNA genômico. A primeira canaleta corresponde ao padrão 50bp DNA Ladder (New England Biolabs), A segunda canaleta corresponde ao produto amplificado do gDNA do controle e a terceira, das células tratadas com 10mM de gemcitabina.

Por fim, antes de enviarmos nossas amostras para a produção da biblioteca de DNA e posterior análise por NGS, verificamos a pureza dos produtos de amplificação, através da relação A_{260nm}/A_{280nm} , que deve estar entre 1,7 e 1,9. Para a amostra controle, essa relação foi de 1,81 e, para a tratada, de 1,92 – o que indica uma pureza adequada para os fins desejados.

5.1.5. Identificação de genes associados à resposta a gemcitabina

Antes da análise do *fitness* dos mutantes da coleção YKO no ensaio competitivo (Bar-Seq), os dados produzidos pelo sequenciamento dos *barcodes* foram filtrados de acordo com alguns parâmetros. Apenas fragmentos que passaram pelos seguintes filtros foram considerados para análise:

- Alinhamento de pelo menos 10 bases dos *barcodes*;
- MappingQV maior do que 10.

Os QV (*quality value*) são valores relacionados à qualidade dos dados; um valor de 10 significa uma precisão de 90%, enquanto 20 significa 99%, e assim sucessivamente, em escala logarítmica. MappingQV se refere à precisão dos mapeamentos, enquanto BaseQV está relacionado à identidade das bases produzidas no sequenciamento. As estatísticas dos dados utilizados em nossas análises, nas condições controle e tratada, estão sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3: Estatísticas dos dados de sequenciamento produzidos na plataforma SOLiD 4 (Applied Biosystems), nas condições tratada e controle, considerados para análise. Apenas os dados que passaram pelos filtros considerados estão representados [Alinhamento (bp) > 10; MappingQV > 10].

	Tratada	Controle
Total de fragmentos	30.822.780	20.376.165
Total de fragmentos mapeados	28.579.306	18.747.787
Fragmentos mapeados (%)	91.99	92.01
Tamanho dos alinhamentos (bp)	18.1	18.16
BaseQV	30.74	31.11

Os valores normalizados de contagem (*counts*) para cada *barcode* sequenciado estão representados na figura 20.

Figura 20: Valores de *counts*, normalizados pelo total de fragmentos mapeados, produzidos no ensaio Bar-Seq, nas condições controle e tratada (gemcitabina 10mM).

Após adicionarmos 10 *pseudo-counts* a cada *barcode* mapeado, os valores de $\log_2$ da razão controle/tratada ($\log_2$ ratio) foram plotados no gráfico apresentado na figura 21, onde foi possível identificar os mutantes que apresentaram maior sensibilidade ou resistência ao tratamento. Destacamos os cinco genes relacionados a maior sensibilidade e os cinco a maior resistência para posterior análise.

Figura 21: Resultado do ensaio Bar-Seq com a coleção YKO de *Saccharomyces cerevisiae*. No eixo Y estão representados os valores de $\log_2$ ratio (razão das *contagens* na condição controle sobre tratada) e no eixo X, os genes interrompidos nos mutantes da coleção (em ordem alfabética em relação ao nome da ORF correspondente). Valores positivos indicam mutações que resultaram em sensibilidade ao tratamento e os valores negativos, em resistência. Os cinco alvos mais sensíveis e os cinco mais resistentes estão indicados no gráfico.

Os resultados da figura 21 mostram uma visão geral da resposta dos mutantes ao tratamento com gemcitabina. A média dos valores da razão logarítmica entre controle/tratada ficaram distribuídos no gráfico na faixa de -0.003008415, indicando que genes destacados tem relação a uma resposta específica à gemcitabina, e não uma resposta geral a estresse. Estão destacados no gráfico os cinco alvos mais sensíveis (genes possivelmente relacionados à resistência celular à gemcitabina) e os cinco mais resistentes (possíveis alvos de ação da droga). Na figura 22, os mesmos dados apresentados na figura 21 estão representados simplesmente pela razão controle/tratada. Dessa forma, é possível observar mais claramente as diferenças entre os alvos mais sensíveis ao tratamento.

Figura 22: Resultado do ensaio Bar-Seq com a coleção YKO de *Saccharomyces cerevisiae*. Os mesmos resultados da figura 21 estão representados simplesmente pela razão controle/tratada, facilitando a visualização dos alvos sensíveis ao tratamento.

Dentre os dez alvos identificados em nosso estudo (Figura 21), apenas um (*RNR3*) tem relação descrita com vias já associadas à resposta a gemcitabina. Um resumo das funções desses alvos está mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Linhagens mutantes da coleção YKO que apresentaram maior sensibilidade ou resistência ao tratamento com gemcitabina 10mM no ensaio Bar-Seq. As descrições das funções do produto de cada gene foram obtidos através do site *Saccharomyces* Genome Database – SGD (<http://www.yeastgenome.org>).

ORF	Gene	log ₂ ratio	Descrição
Sensíveis			
YLL046C	<i>RNP1</i>	2.110865192	Ribonucleoproteína com sítios de reconhecimento de RNA.
YLR415C	-	2.053503085	Proteína putativa de função desconhecida.
YBR034C	<i>HMT1</i>	1.948699293	Proteína arginina metiltransferase.
YMR025W	<i>CSH</i>	1.709601398	Subunidade do Cop9 sinalossomo (CSN).
YNL292W	<i>PUS4</i>	1.440973974	Pseudouridina sintase; catalisa a formação de pseudouridina-55 (Psi55).
Resistentes			
YLR445W	<i>GMC2</i>	2.959879399	Proteína envolvida na progressão meiótica.
YJR083C	<i>ACF4</i>	2.793788395	Proteína de função desconhecida; potencial substrato de Cdc28p.
YAL028W	<i>FRT2</i>	2.583910881	Proteína de membrana do retículo endoplasmático; promove crescimento em algumas condições de estresse; potencial substrato de Cdc28p.
YIL066C	<i>RNR3</i>	2.522578369	Isoforma menos abundante da subunidade catalítica da holoenzima ribonucleotídeo redutase.
YNL321W	<i>VNX1</i>	2.449980459	Proteína transportadora localizada na membrana do retículo endoplasmático; potencial substrato de Cdc28p.

Verificamos, em seguida, a resposta fenotípica desses mutantes de forma qualitativa, por meio de ensaio de viabilidade. Além desses 10 mutantes destacados, analisamos também a resposta de outros oito mutantes com funções moleculares relacionadas, sendo três mutantes de arginina metiltransferases (*Armt2*, *Ahsl7* e *Asfm1*) e cinco de proteínas envolvidas na via do Cop9 sinalossomo (CSN) (*Arri1*, *Acsn9*, *Arri2*, *Apci8* e *Ayjr084w*). Selecionamos os mutantes de genes dessas duas atividades celulares por estarem diretamente relacionadas a diversos processos regulatórios, incluindo a modulação de atividade de alvos de gemcitabina já descritos, como no caso do CSN, envolvido na regulação de ribonucleotídeo redutase (Liu *et al.*, 2003). Os resultados da análise desses mutantes estão apresentados nas figuras 23 (sensíveis), 24 (subunidades do CSN), 25 (arginina metiltransferases) e 26 (resistentes).

Figura 23: Viabilidade celular dos mutantes que, através de ensaio Bar-Seq, demonstraram maior sensibilidade ao tratamento com gemcitabina (*Δrpn1*, *Δylr415c*, *Δhmt1*, *Δcsi1* e *Δpus4*). As células foram crescidas em meio SD na presença de 10mM de gemcitabina e, após 8 horas de tratamento em meio líquido com a droga, a OD_{600nm} foi igualada em 0.06 e foram realizadas diluições seriadas de 10 vezes. Aliquotas das células foram então plaqueadas em meio YPD e incubadas a 30°C por dois dias.

Figura 24: Viabilidade celular de mutantes das subunidades do complexo Cop9 sinalossomo de *S. cerevisiae* (*Δrri1*, *Δcsn9*, *Δrri2*, *Δpci8* e *Δyjr084w*). O procedimento experimental para esse ensaio se deu da mesma forma que o descrito na figura 23.

Figura 25: Viabilidade celular de mutantes de arginina metiltransferases de *S. cerevisiae* (*Δrmt2*, *Δhsl7* e *Δsfm1*). O procedimento experimental para esse ensaio se deu da mesma forma que o descrito na figura 23.

Figura 26: Viabilidade celular dos mutantes que, através de ensaio Bar-Seq, demonstraram maior resistência ao tratamento com gemcitabina (*Δgmc2*, *Δacf4*, *Δftr2*, *Δrnr3* e *Δvnx1*). O procedimento experimental para esse ensaio se deu da mesma forma que o descrito na figura 23.

Conforme demonstrado nas figuras 23 a 26, a gemcitabina teve pouco ou nenhum efeito na viabilidade celular desses mutantes, o que era esperado apenas para os mutantes inicialmente identificados como resistentes (Figura 26). Dessa forma, é provável que os resultados observados no ensaio Bar-Seq sejam devidos a uma significativa inibição do crescimento daqueles mutantes. É importante ressaltar que esses tipos de ensaios realizados (viabilidade e Bar-Seq) permitem extrair diferentes informações fenotípicas dos mutantes; porém, em conjunto, nossos resultados indicam que a gemcitabina possui efeito inibitório – mas não tóxico – sobre os mutantes sensíveis identificados por Bar-Seq. Verificamos também que a deleção de *RNR3* resulta em maior resistência a gemcitabina, consistente com dados da literatura que relacionam ribonucleotídeo redutase a resposta à droga.

5.2. Análogos de rebecamicina

5.2.1. Avaliação inicial da atividade biológica dos análogos de rebecamicina

A estrutura química dos nove análogos sintéticos avaliados, nomeados RebA–RebI, está representada na figura 27.

Figura 27: Estrutura química dos análogos sintéticos de rebecamicina estudados.

Como uma avaliação inicial da atividade biológica desses compostos, analisamos a viabilidade celular da linhagem selvagem BY4741 de *S. cerevisiae*, em meio YPD, após exposição a diferentes concentrações dos análogos de rebecamicina (RebA–G) por duas horas. Os resultados estão mostrados na figura 28.

Figura 28: Viabilidade celular da linhagem selvagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença dos análogos de rebecamicina. As células foram inoculadas em meio YPD líquido por duas horas na presença dos compostos, submetidos a diluição seriada de cinco vezes e incubados em meio YPD sólido a 30°C por 48 horas. (C): controle contendo apenas DMSO 5%.

Foi possível verificar que nenhuma dessas concentrações, para nenhum dos análogos de rebecamicina, resultou em diminuição significativa da viabilidade celular em *S. cerevisiae* nesse tempo de exposição. Contudo, com o aumento da concentração, pode-se verificar uma sensível diminuição do número de colônias formadas, em especial para os compostos RebC e RebF. É importante ressaltar que maiores concentrações não puderam ser atingidas em parte devido à hidrofobicidade desses compostos (ver estruturas na figura 27): a adição de concentrações superiores a 1mM resultou na precipitação dos mesmos em meio de cultura. Com isso, verificamos o efeito da concentração de RebF na taxa de crescimento da levedura durante um tempo de exposição maior (24h), utilizando novamente concentrações de 10μM, 100μM e 1mM do composto. Os resultados estão mostrados na figura 29.

Figura 29: Crescimento da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença de até 1mM do composto RebF em meio YPD, por até 24 horas. Cada ponto da curva representa a média de crescimento de três replicatas individuais. Controle: DMSO 5%.

Em seguida, verificamos o crescimento e a viabilidade da mesma linhagem BY4741, dessa vez na presença dos compostos RebH e RebI por 4 horas (Figura 30).

Figura 30: Crescimento da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença de 10µM ou 100µM dos compostos RebH (A) e RebI (B) em meio YPD por até 4 horas. Depois de 4 horas de crescimento em meio líquido, as células tratadas com 100µM de RebH ou RebI tiveram sua OD_{600nm} ajustada para 0,2 e, em seguida, foram submetidas a diluição seriada de 5 vezes e aplicadas alíquotas de 5µl em meio YPD sólido (C). Cada ponto das curvas representa a média de crescimento de três replicatas individuais. Apenas a curva correspondente ao tratamento com 100µM de RebI é estatisticamente distinta do controle ($p < 5\%$). Controle: 5%.

Diante desses resultados, pudemos verificar que o composto RebH não apresenta efeito sobre o crescimento ou a viabilidade de *S. cerevisiae*, ao contrário de RebI, que

apresenta ambos os efeitos – embora o tratamento com RebI não comprometa de forma drástica a viabilidade celular após 4 horas de tratamento.

Numa análise mais detalhada do crescimento de *S. cerevisiae* na presença dos compostos mais promissores, RebF e RebI, verificamos que a presença de ambos em meio mínimo resulta em uma significativa inibição do crescimento celular em períodos de exposição mais prolongados (até 16 horas; Figura 31).

Figura 31: Curva de crescimento da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença de 100µM dos compostos RebF e RebI em meio SD líquido por até 16 horas. Cada ponto da curva representa a média de crescimento de três replicatas individuais. As curvas são estatisticamente distintas, conforme verificado por teste t pareado ($p < 0,1\%$ para as amostras tratadas em relação ao controle; $p < 1\%$ entre as amostras tratadas).

Visto que a rebecamicina e outros indolocarbazóis são descritos como compostos que possuem atividades tanto antitumoral quanto antimicrobiana, verificamos também a possível inibição de crescimento desses dois compostos sobre a linhagem ATCC 25922 de *Escherichia coli* (Figura 32).

Figura 32: Atividade inibitória dos compostos RebF (A) e Rebl (B) em *Escherichia coli*. As células foram inoculadas em meio LB contendo os compostos por até 24 horas a 37°C. O crescimento foi medido pela OD_{600nm} e em seguida normalizado. As diferenças observadas nas curvas não são estatisticamente significativas ($p > 10\%$ em todos os casos).

Os resultados das figura 29 a 32 mostram que os compostos RebF e Rebl apresentaram inibição de crescimento significativa com *S. cerevisiae* mas não com *E. coli*. Isso pode indicar que esses compostos apresentam um alvo molecular específico de *S. cerevisiae* ou de organismos eucariotos. Contudo, apesar desses resultados, esses compostos frequentemente apresentavam instabilidade em meio de cultura, o que comprometeu posteriores experimentos em busca de genes alvo dos mesmos. Dessa forma, decidimos

prosseguir nossas análises utilizando o composto RebC, que se mostrou mais estável, além de produzir resultados mais reprodutíveis. Esse composto causa inibição do crescimento de *S. cerevisiae* comparável à RebF, conforme mostra a figura 33.

Figura 33: Crescimento da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença de 1mM dos compostos RebC e RebF em meio YPD líquido por 4 horas a 30°C, verificados pela OD_{600nm}. (C) controle contendo DMSO 5%.

5.2.2. Identificação de genes associados à resposta ao análogo de rebecamicina RebC

Para a identificação de genes relacionados a resposta à RebC, foi feito um *screening* da coleção YKO, onde todos os mutantes foram expostos a 100μM do composto em meio SD líquido. As células foram transferidas para meio YPD sólido após exposição por 4 ou 24 horas. Identificamos quatro mutantes especialmente sensíveis ao tratamento com RebC, presentes nas placas 5 (*Arpd3*; figura 34), 6 (*Aslg1*; figura 35), 35 (*Aarg2*; figura 36) e 38 (*Ajhd2*; figura 37).

Figura 34: Viabilidade dos mutantes da placa 5 da coleção YKO após exposição a RebC. Depois de crescimento por 4h em meio SD líquido contendo 100µM do composto, as células foram transferidas para meio YPD e incubadas por dois dias a 30°C. O mutante circulado na figura (*Arpd3*) foi o que apresentou a maior sensibilidade ao tratamento.

Figura 35: Viabilidade dos mutantes da placa 6 da coleção YKO após exposição a RebC, da mesma forma a mostrada na figura 31. O mutante circulado na figura (*Aslg1*) foi o que apresentou a maior sensibilidade ao tratamento.

Figura 36: Viabilidade dos mutantes da placa 35 da coleção YKO após exposição a RebC, da mesma forma a mostrada na figura 31. O mutante circulado na figura (*Δarg2*) foi o que apresentou a maior sensibilidade ao tratamento.

Figura 37: Viabilidade dos mutantes da placa 38 da coleção YKO após exposição a RebC, da mesma forma a mostrada na figura 31. O mutante circulado na figura (*Δjhd2*) foi o que apresentou a maior sensibilidade ao tratamento.

A descrição da função geral dos genes interrompidos nesses mutantes está sumarizada na tabela 5.

Tabela 5: Linhagens mutantes da coleção YKO que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com RebC 100µM, verificado por análise direta de fenótipo. As descrições das funções do produto de cada gene foram obtidos através do *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>).

Gene	Descrição
<i>RPD3</i>	Histona deacetilase, componente dos complexos Rpd3S e Rpd3L.
<i>SLG1</i>	Transdutor de sinal da via PKC1-MPK1 quinase.
<i>ARG2</i>	Acetilglutamato sintase; catalisa a primeira etapa da biossíntese de ornitina.
<i>JHD2</i>	Histona demetilase; contém domínio JmjC.

Analizamos, em seguida, a viabilidade celular desses mutantes após exposição, por 24 horas, a concentrações de RebC entre 0,1µM e 100µM (Figura 38).

Figura 38: Viabilidade celular dos mutantes da coleção YKO identificados como sensíveis a 100µM de RebC. As células foram crescidas em meio SD na presença de 100nM, 1µM, 10µM e 100µM do composto e, após 24 horas de tratamento em meio líquido, foram realizadas diluições seriadas de 10 vezes. As células foram então plaqueadas em meio YPD e incubadas a 30°C por dois dias.

É possível verificar que todos os mutantes apresentam viabilidade diminuída em relação à linhagem selvagem após exposição a RebC. Dentre eles, apenas *Δarg2* não apresentou grandes diferenças de viabilidade com a variação da concentração de RebC. Interessantemente, *Δrpd3* e *Δslg1* são especialmente mais sensíveis na concentração de 0,1µM, ao passo que *Δjhd2* apresenta menor viabilidade após exposição a 1µM de RebC – as

concentrações mais baixas testadas. Esses resultados podem ter relação com o fato de que esses três genes estão relacionados a processos regulatórios (tabela 5), os quais são sensíveis a pequenas variações de concentração tanto de proteínas quanto de outros fatores, sejam eles endógenos ou exógenos.

6. DISCUSSÃO

6.1. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para identificação de alvos moleculares de drogas

Nos últimos anos, a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* e outros organismos modelo para a identificação de alvos de resposta a drogas e condições estressantes tem crescido consideravelmente. A construção de coleções de mutantes de praticamente todas as ORFs de *S. cerevisiae* (*Yeast Knock Out*, YKO) representou um marco para a elucidação da função de parte significativa dos genes desse organismo, além de permitir relacionar mutações específicas à variação fenotípica em resposta a determinadas condições. A partir disso, estudos toxicogenômicos em *S. cerevisiae* permitiram inferir as vias metabólicas envolvidas na resposta a drogas, tanto por análise direta de fenótipo quanto por ensaios em condições competitivas (dos Santos *et al.*, 2012). Uma diferença fundamental nessas duas abordagens é que, enquanto a primeira tem caráter qualitativo, a segunda permite uma análise fenotípica quantitativa (Smith *et al.*, 2009).

Com o advento de técnicas que possibilitam que estudos em escala genômica sejam realizados de forma relativamente simples e rápida (i.e. *microarrays* e sequenciamento de nova geração – NGS), também foi possível caracterizar de maneira geral o perfil fenotípico de mutantes não apenas de *S. cerevisiae*, mas também de outros organismos, como *Schizosaccharomyces pombe* (Giaver *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2010). Hillenmeyer *et al.* (2008) demonstraram que a maioria das deleções no genoma de *S. cerevisiae* não resultam em fenótipo claramente observável qualitativamente, ao passo que quantitativamente é possível verificar variação fenotípica em cerca de 97% deles.

A partir de *screenings* em diferentes coleções de mutantes de *S. cerevisiae* é possível identificar genes relacionados à resposta a diferentes agentes tóxicos e/ou antitumorais, sendo que em muitos casos há conservação gênica entre levedura e humanos. Alguns exemplos de compostos estudados dessa maneira incluem cisplatina, 5-fluorouracila e imatinibe (Ishida *et al.*, 2002; Sletta *et al.*, 2011; dos Santos & Sá-Correia, 2009), todos eles de grande relevância clínica no tratamento de câncer. Além disso, os alvos biológicos de moléculas de função

desconhecida também podem ser elucidados, especialmente utilizando coleções de mutantes homozigotos ou haplóides (Hoon *et al.*, 2008).

No presente trabalho, utilizamos técnicas toxicogenômicas tanto de forma quantitativa quanto qualitativa, para a identificação de genes associados à resposta a gemcitabina e a análogos de rebecamicina, respectivamente, sendo que ambas se mostraram bastante eficientes na identificação de alvos. Cerca de 40% dos genes de *S. cerevisiae* possuem ortólogos humanos, de forma que muitos dos processos celulares observados nas leveduras são conservados em mamíferos e outros organismos mais complexos. Dessa forma, a utilização da coleção YKO pode ser de grande utilidade para a identificação de genes associados à resposta a (i) antitumorais, especialmente aquelas onde há complexos mecanismos de resistência, como a gemcitabina e (ii) compostos cujos alvos celulares são desconhecidos, como os análogos de rebecamicina utilizados neste estudo.

6.2. Identificação de genes associados à resposta a gemcitabina

A maior parte dos mecanismos de resistência e sensibilidade à gemcitabina estão relacionados a seu metabolismo celular. Células resistentes à gemcitabina comumente apresentam níveis reduzidos de hENT1 e dCK (Giovannetti *et al.*, 2006; Kroep *et al.*, 2002; Ruiz van Haperen *et al.*, 1994) ou aumentados de ribonucleotídeo redutase (RNR) (Bergman *et al.*, 2005; Nakahira *et al.*, 2007; Duxbury *et al.*, 2004). Diversos outros genes e vias celulares também já foram relacionados à resistência a gemcitabina, porém os mecanismos que levam a esse fenótipo são pouco compreendidos.

Por meio de análise quantitativa de fenótipo (Bar-Seq), identificamos diversos genes que podem estar relacionados à resposta a gemcitabina. Partindo do princípio de que os mutantes da coleção YKO que apresentaram a maior sensibilidade a droga carregam deleções de genes que tornam as células resistentes a gemcitabina, e vice-versa, destacamos cinco genes que conferem resistência e cinco que aumentam a sensibilidade a este antitumoral. Entre esses genes, não encontramos os homólogos de hENT1 (*FUN26*) e dCK (*URK1*), os quais não foram mapeados no sequenciamento, provavelmente por terem baixa taxa de crescimento nas condições utilizadas no ensaio. Verificamos que os mutantes $\Delta gmc2$ ($\Delta ylr445w$), $\Delta acf4$, $\Delta frt2$, $\Delta rnr3$ e $\Delta vnx1$ apresentaram a maior resistência ao tratamento com

10mM de gemcitabina e, portanto, sugerimos os respectivos genes como importantes alvos de ação desse antitumoral. Para melhor compreensão da relação metabólica entre os diferentes alvos, utilizando a ferramenta de bioinformática GENEMANIA (<http://genemania.org>), foi criada uma rede de interações entre esses genes (Figura 39).

Figura 39: Mapa de interações entre os cinco genes identificados que conferem maior resistência a gemcitabina (*YLR445W*, *ACF4*, *FRT2*, *RNR3* e *VNX1*), além de outros relacionados, gerado usando a ferramenta GENEMANIA. As linhas representam co-expressão (lilás), co-localização (azul), interação gênica (verde), interação física (rosa), compartilhamento de domínios proteicos (bege), predição (laranja) e outras relações não especificadas (cinza). Os genes destacados em vermelho tem função relacionada ao metabolismo de nucleotídeos.

Dentre as funções relacionadas no mapa de interações biológicas da figura 39, destaca-se o metabolismo de nucleotídeos, o que está de acordo com diversos dados da literatura que indicam que proteínas dessa via estão entre as mais diretamente relacionadas a resposta celular à gemcitabina. Contudo, dentre os cinco genes destacados, apenas *RNR3* está diretamente relacionado ao metabolismo de nucleotídeos, o qual será discutido mais a frente; as funções dos outros quatro genes identificados são ainda pouco conhecidas e pela primeira vez relacionadas a esse antitumoral.

O gene *GMC2* foi recentemente relacionado à formação do complexo sinaptonemal, essencial para a progressão meiótica (Humphryes *et al.*, 2013). Além de ainda ser pouco caracterizado, *GMC2* não possui ortólogos conhecidos em outros organismos. *ACF4* tem função desconhecida, bem como *FRT2*; contudo, o produto deste último está possivelmente relacionado à resposta a algumas condições de estresse, como alta salinidade e pH alcalino, mediada pela serina/treonina fosfatase calcineurina (Heath *et al.*, 2004). Já *VNX1* foi descrito como um transportador de cátions vacuolar (Cagnac *et al.*, 2007). Embora *Acf4*, *Fr2* e *Vnx1* não possuam ortólogos humanos descritos e não haja qualquer relação conhecida na literatura entre as funções desses genes e a resposta a qualquer agente genotóxico, todos eles já foram identificados como possíveis substratos de Cdc28 (Ubersax *et al.*, 2003). Cdc28 é a única Cdk em *S. cerevisiae*, atuando não apenas na ativação de fatores de transcrição específicos do ciclo celular, mas também regulando a transcrição basal de diversos genes (Chymkowitch *et al.*, 2012). Dados da literatura sugerem uma maior atividade de Cdc28 em resposta a danos ao DNA, provavelmente por meio da hiperfosforilação de Rad9 (Enserink *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2013). Um trabalho recente demonstrou que a utilização de um inibidor de Cdk4 aumenta a taxa de apoptose induzida por gemcitabina em células cancerosas de pâncreas (Subramaniam *et al.*, 2012). Embora estudos mais aprofundados sejam necessários para compreender melhor as vias envolvidas, é possível que a resistência a gemcitabina observada em células $\Delta acf4$, $\Delta frt2$ e $\Delta vnx1$ esteja relacionada à atividade de Cdc28.

Os cinco mutantes que apresentaram maior sensibilidade à gemcitabina no ensaio Bar-Seq foram $\Delta rnp1$, $\Delta ylr415c$, $\Delta hmt1$, *csi1* e $\Delta pus4$, portanto, nossos resultados sugerem que esses genes seriam importantes para resistência celular à gemcitabina. Um mapa de interações entre esses genes está representado na figura 40.

Figura 40: Mapa de interações entre os cinco genes identificados que conferem resistência a gemcitabina (*RNP1*, *YLR415C*, *HMT1*, *CS1* e *PUS4*), além de outros relacionados, gerada usando a ferramenta GENEMANIA. As linhas representam co-expressão (lilás), co-localização (azul), interação gênica (verde), interação física (rosa), compartilhamento de domínios proteicos (bege), predição (laranja) e outras relações não especificadas (cinza). Os genes destacados em vermelho tem função relacionada a regulação da ubiquitinação de proteínas.

Entre esses, *YLR415C* tem função desconhecida e não existem dados na literatura relacionando essa ORF a qualquer atividade celular. Rnp1 é uma ribonucleoproteína também pouco conhecida que foi recentemente relacionada à supressão dos efeitos tóxicos causados pela superexpressão de *SRS2*, que codifica uma DNA helicase envolvida no reparo de DNA (Léon Ortiz *et al.*, 2011; Yeung & Durocher, 2011). Rnp1 possui sítios de ligação ao RNA bastante conservados, embora não possua ortólogos conhecidos em mamíferos. Já *PUS4* codifica uma pseudouridina (Ψ) sintase que catalisa a formação de Ψ -55, uma modificação no tRNA altamente conservada evolutivamente (Becker *et al.*, 1997). É difícil estabelecer uma relação entre *PUS4* e a resposta à gemcitabina, uma vez que as próprias funções de pseudouridina ainda não estão totalmente elucidadas. Entretanto, Gu *et al.* (2008) demonstraram que mutações na disquerina, ortóloga a pseudouridina sintase Cbf5 de *S. cerevisiae*, resultam numa resposta mais acentuada a danos ao DNA. Pus4, ao contrário de

Cbf5, não possui ortólogos caracterizados em mamíferos. Esses resultados, em conjunto com as nossas observações, podem indicar que as pseudouridina sintases tenham alguma relação com o estresse replicativo.

Hmt1 é uma arginina metiltransferase que tem importante papel no núcleo, regulando a atividade de proteínas envolvidas na transcrição, processamento e exportação de mRNA e na modificação de histonas (Wong *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 1998; Milliman *et al.*, 2012). Essa proteína possui um ortólogo humano – PRMT1, a principal arginina metiltransferase humana –, a qual tem sido relacionada ao reparo de DNA, além de ter um possível papel na regulação da transcrição durante a progressão tumoral (Nicholson *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que o mutante *Δhmt1* tem maior sensibilidade a gemcitabina, isto é, a proteína atua na resistência celular à gemcitabina. As outras linhagens com deleção de metiltransferases estudadas (*Δrmt2*, *Δhsl7* e *Δsfm1*) não apresentaram, do mesmo modo que *Δhmt1*, alteração na viabilidade celular após tratamento com gemcitabina. Isso indica que a gemcitabina não apresenta efeito de inibição de crescimento, mas não tóxico, nessas linhagens – o que pode também ser uma adaptação em resposta ao estresse que a droga pode causar. Enquanto Rmt2 e Sfm1 não possuem ortólogos em humanos, Hsl7, ortólogo a PRMT5 humana, é também uma arginina metiltransferase relacionada à regulação temporal e progressão do ciclo celular (Shulewitz *et al.*, 1999). Dessa forma, é possível que as arginina metiltransferases desempenhem um papel importante na regulação de diversas vias em resposta a agentes genotóxicos, especialmente à gemcitabina.

6.2.1. O papel de ribonucleotídeo redutase e das proteínas do Cop9 sinalossomo na resposta à gemcitabina

Nos mapas de interações das figuras 39 e 40 destacamos as funções relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos e da ubiquitinação de proteínas por parte dos complexos enzimáticos ribonucleotídeo redutase (RNR) e Cop9 sinalossomo (CSN), respectivamente. Ambas as funções já foram apontadas como importantes na resposta à gemcitabina. Diversos estudos da literatura apontam RNR como um dos principais fatores relacionados à resistência a gemcitabina. Em humanos, os genes RRM1 e RRM2 codificam para as subunidades catalítica (grande) e regulatória (pequena), respectivamente, da ribonucleotídeo redutase. A holoenzima é composta pelos homodímeros RRM1 e RRM2. Em *S. cerevisiae*, existem

quatro genes que codificam para subunidades de RNR: *RNR1* e *RNR3* para a catalítica e *RNR2* e *RNR4* para a regulatória, sendo que apenas *RNR3* não é essencial. A holoenzima é formada principalmente por um heterodímero Rnr2/Rnr4 na subunidade pequena e um homodímero Rnr1 compondo a subunidade grande. Rnr3 possui uma atividade catalítica muito mais baixa em comparação com Rnr1; entretanto, a formação de um heterodímero Rnr1/Rnr3 aumenta consideravelmente a atividade do complexo *in vitro* (Domkin *et al.*, 2002). O aumento de expressão de RRM1, homólogo a *RNR1*, é considerado o principal fator que relaciona RNR a resistência à gemcitabina em células humanas (Bergman *et al.*, 2005; Nakahira *et al.*, 2007). Em *S. cerevisiae*, *RNR3*, cujo produto proteico apresenta níveis praticamente indetectáveis durante todo o ciclo celular, tem sua transcrição fortemente induzida em resposta a danos ao DNA, ao passo que a indução de *RNR1* nessas condições é muito menor; além disso, a superexpressão de *RNR3* é capaz de reverter a letalidade causada pela deleção de *RNR1* (Elledge & Davis, 1990). Nossos resultados demonstraram que o mutante *Arnr3* é resistente à gemcitabina. Dessa forma, podemos sugerir que a deleção de *RNR3* possa estar relacionada a um aumento da expressão de *RNR1* em resposta ao tratamento, resultando na resistência a gemcitabina observada.

Porém, esse mecanismo de resistência pode ser também dependente da regulação de RNR em outro nível que não apenas transcricional. Em *S. cerevisiae*, Sml1 é um conhecido inibidor de RNR que atua sobre a localização celular de Rnr2 e Rnr4. Durante o ciclo celular, ambas as proteínas localizam-se predominantemente no núcleo e Rnr1 e Rnr3, no citosol (Yao *et al.*, 2003). Entretanto, especialmente sob condições de estresse genotóxico, as proteínas da subunidade pequena migram para o citosol, o que depende da degradação de Sml1, a qual pode ser regulada pelo Cop9 sinalossomo (CSN) (Liu *et al.*, 2003).

O CSN é um complexo proteico altamente conservado em eucariotos e bastante relacionado com o proteassomo 26S. É composto por oito subunidades em mamíferos e sete em *S. cerevisiae*: Csn1-7, homólogos Csn9, Rri2, Pci8, Csn12, Rri1, Csi1 e Rpn5, respectivamente, além da presença adicional de Csn8 em alguns eucariotos superiores (Wei & Deng, 2003; Pick, *et al.*, 2012). A principal função conhecida do CSN é a regulação de complexos CRL (*Cullin-RING ubiquitin Ligase*), uma superfamília de ubiquitina ligases E3, por meio da desconjugação de Rub1 (Nedd8 em humanos) (Wei *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2003) mostraram em *S. pombe* que a degradação de Sml1 depende de Csn9 e Rri2, mas não das outras subunidades do CSN. Isso pode estar relacionado com o controle da localização celular das subunidades de RNR e, conseqüentemente, da atividade da holoenzima.

Entretanto, a degradação de Sml1 não depende apenas da atividade de CRL regulada pelo CSN. Em *S. cerevisiae*, a cascata de sinalização Mec1/Rad53/Dun1 é conhecida por estar relacionada a danos ao DNA (Zhao & Rothstein, 2002). Um dos alvos dessa via é justamente Sml1, a qual é fosforilada, ubiquitinada por Ubr2/Rad6/Mub1 e em seguida degradada no proteassomo 26S (Andreson *et al.*, 2010).

Em nossos resultados mostramos que *Acsi1* apresenta importante inibição de crescimento na presença de gemcitabina. Esses resultados podem estar relacionados a diversas vias celulares que podem ser afetadas por um desbalanço na degradação de proteínas ubiquitinadas. Já foi verificado em várias linhagens de células cancerosas que a gemcitabina induz um aumento de expressão de UBE2M, responsável pela conjugação de Nedd8, importante para a modulação de atividade de CRL e, conseqüentemente, da ubiquitinação e degradação de proteínas (Huang *et al.*, 2011). UBE2M e Nedd8 possuem os ortólogos Ubc12 e Rub1, respectivamente, em *S. cerevisiae*. Isso indica que a atividade do CSN pode ter papel importante na resposta à gemcitabina. Além disso, vários estudos recentes têm relacionado um aumento de expressão de Csn6 (ortólogo de Csi1 encontrado em nosso estudo) à oncogênese, através da regulação de diversas proteínas – incluindo p57^{Kip2}, 14-3-3 σ e MDM2/p53 (Choi *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Esse efeito aparentemente não tem relação com a atividade isopeptidásica do CSN, indicando que Csn6 tem outras importantes funções regulatórias. Foi demonstrado também que a inibição da atividade de Csn5 diminui a proliferação de linhagens de células cancerosas de pâncreas, aumentando também a sensibilidade dessas células a gemcitabina (Li *et al.*, 2009). Esses dados, em conjunto com as nossas observações, demonstram que proteínas do CSN podem ter importante relação com a proliferação celular e a resistência a gemcitabina.

6.3. Identificação de genes associados à resposta ao análogo de rebecamicina RebC

Os indolocarbazóis, como rebecamicina e estaurosporina, são moléculas conhecidas pelas suas atividades inibitórias sobre topoisomerase I e proteína quinases, especialmente PKC (Prudhomme, 2000). Apesar de possuírem importante atividade inibitória sobre várias linhagens de células tumorais, a baixa solubilidade em meio aquoso e a pouca especificidade na inibição sobre proteínas quinases, especialmente de estaurosporina, fez com que houvesse

um grande interesse na síntese ou semi-síntese de estruturas relacionadas a esses indolocarbazóis (Pereira *et al.*, 1996; Prudhomme, 2000). Diversos análogos de rebecamicina já foram sintetizados e todos eles, quando apresentam atividade biológica, o fazem pela inibição de topoisomerase I ou de proteínas quinases, o que indica que propriedades estruturais específicas direcionam essas moléculas a diferentes alvos dentro da célula.

Neste trabalho, analisamos a atividade biológica de nove compostos análogos à rebecamicina (RebA-I); dentre eles, verificamos que três (RebC, RebF e RebI) apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de *S. cerevisiae*. Entretanto, RebF e RebI demonstraram ser moléculas pouco estáveis em meio de cultura. Dessa forma, centramos nossos estudos na busca de alvos moleculares associados à resposta ao composto RebC. Num *screening* em escala genômica, identificamos inicialmente quatro genes não essenciais cuja deleção resultou em citotoxicidade, utilizando a concentração de 100µM de RebC. Esses genes são *RPD3*, *JHD2*, *SLG1* e *ARG2*. A criação de um mapa de interações entre esses genes revela que a função mais proeminente encontrada nesse conjunto está relacionada à modificação covalente da cromatina (Figura 41).

Figura 41: Mapa de interações entre os quatro genes identificados que conferem resistência a RebC (*RPD3*, *JHD2*, *SLG1* e *ARG2*) gerada usando a ferramenta GENEMANIA. As linhas representam co-expressão (lilás), co-localização (azul), interação gênica (verde), interação física (rosa), compartilhamento de domínios proteicos (bege), predição (laranja) e outras relações não especificadas (cinza). Os genes destacados em vermelho tm função relacionada à modificação covalente da cromatina.

A posição central de *RPD3* nesse mapa é devida a interação desse gene ou de seu produto com todos os demais representados, exceto *ARG2* e *ARG5,6*. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que Rpd3 tem papel no controle geral da transcrição (Vidal & Gaber, 1991). Rpd3 é uma lisina deacetilase (KDAC) que possui um domínio altamente conservado evolutivamente, com alto grau de similaridade com as histonadeacetilases humanas HDAC1, -2, -3 e -8. Apesar de diversas KDACs terem sido inicialmente descritas como histonadeacetilases, é notável o acúmulo de evidências que apontam que as KDACs não apenas tem papel fundamental na regulação da transcrição, mas na modulação da atividade de diversas outras proteínas que não histonas (Yang & Seto, 2008). Interessantemente, Rpd3 já foi relacionada à resistência a alguns antifúngicos por dois mecanismos distintos. Robbins *et al.* (2012) demonstraram recentemente que a inibição ou deleção das KDACs Rpd3 e Hda1 diminui a resistência a alguns azóis mediada pela chaperona Hsp90. A resistência a essa classe de antifúngicos também está relacionada a uma maior atividade de Pdr5, um

transportador do tipo ABC, o qual tem sua expressão diminuída em mutantes *Arpd3* (Borecka-Melkusova *et al.*, 2008). Um aumento de expressão de ABCG2 (ortólogo a Pdr5), induzido pelo análogo de rebecamicina becatecarina, já foi relacionado a uma maior resistência a esse composto em células de carcinoma de pulmão (Robey *et al.*, 2009). Apesar desses serem mecanismos gerais de resistência a drogas, a atividade regulatória de Rpd3 e de outras KDACs, tanto em nível transcricional quanto pós-traducional, pode ser de grande relevância para a resistência a indolocarbazóis em geral, incluindo RebC. Observamos que o mutante *Arpd3* apresenta viabilidade bastante comprometida especialmente na concentração de 0,1µM de RebC, a qual é recuperada com o aumento da concentração. Uma possível explicação para isso é que, quando em altas concentrações, RebC poderia induzir um aumento da expressão de transportadores de resistência multidroga, o que não aconteceria nas concentrações mais baixas do composto, reduzindo seu efluxo. Contudo, uma análise da expressão gênica durante a exposição ao composto é necessária para confirmar essa hipótese.

Jhd2 faz parte de uma classe de histona demetilases recentemente descrita que catalisa especificamente a remoção de grupos metila da lisina 4 na histona H3 (Liang *et al.*, 2007). Essa classe, conhecida como JARID1, possui domínios conservados evolutivamente em vários grupos de eucariotos, incluindo humanos (Klose *et al.*, 2006). A função dessa atividade H3K4 demetilase altamente específica ainda não é bem compreendida, apesar das prováveis implicações no controle epigenético da expressão gênica. Yamane *et al.* (2007) verificaram que a atividade H3K4 demetilase da proteína PLU-1 está relacionada à repressão transcricional de BRCA1, contribuindo para a proliferação de células cancerosas de mama. Além disso, um estudo mostrou que a região promotora de ABCG2 mostrou-se hipometilada na H3K4 em células tronco de câncer de próstata que apresentavam resistência multidroga (Liu *et al.*, 2010). Consistente com essas observações, níveis elevados de PLU-1 foram encontrados em células de melanoma resistentes a diversos antitumorais (Roesch *et al.*, 2013). Apesar da necessidade de mais estudos para compreender o papel dessas novas proteínas, é provável que as JARID1 estejam relacionadas à regulação da transcrição de genes envolvidos na resistência multidroga.

Slg1 (também conhecida como Wsc1) é uma proteína integral da membrana plasmática inicialmente descrita como um sensor da integridade da parede celular (Philip & Levin, 2001). Mais tarde, foi observado que essa proteína tem papel na transdução de sinal em resposta a diversos tipos de estresse através da via Pkc1/Mpk1 (proteína quinase C / MAP-quinase), tendo sua expressão diferentemente regulada dependendo da natureza do estresse

(Bermejo *et al.*, 2010). Slg1 aparentemente não possui ortólogos em humanos; porém, um domínio conservado (WSC) foi identificado na policistina-1 humana (Ponting *et al.*, 1999). Embora haja pouca informação na literatura, essa proteína já foi relacionada à ativação de NF- κ B via PKC α (Banzi *et al.*, 2006).

Boa parte dos indolocarbazóis, incluindo análogos de rebecamicina e estaurosporina, apresentam atividade inibitória sobre PKC. Contudo, o efeito da variação de expressão de componentes *upstream* na via de sinalização em resposta a inibidores de PKC são pouco estudados. Um dos poucos estudos acerca disso mostrou que a superexpressão de Slg1 conferia resistência ao choque térmico e a estaurosporina, por mecanismos desconhecidos, numa linhagem termossensível que carregava uma mutação no gene *STH1*, que faz parte do complexo remodelador da cromatina RSC (Chai *et al.*, 2002). Como Slg1 também é conhecida por ter papel na resposta ao choque térmico (Imazu & Sakurai, 2005), é possível que proteínas envolvidas na resposta a esse tipo de estresse tenham relação com essas observações. LaFayette *et al.* (2010) verificaram que Hsp90 pode estar relacionada à estabilização da MAPK terminal da via PKC de *Candida albicans*. A inibição de PKC por estaurosporina ou de Hsp90 resultaram em maior sensibilidade a antifúngicos inibidores da biossíntese de ergosterol nesse organismo (LaFayette *et al.*, 2010). É provável, portanto, que a maior sensibilidade a RebC por parte do mutante Δ slg1 que observamos, especialmente na faixa entre 0,1 e 10 μ M, ocorra por um desbalanço na via de sinalização de Pkc1, sensibilizando as células ao composto mesmo em baixas concentrações.

Também verificamos que, ao variarmos a concentração de RebC, o mutante Δ arg2 não apresenta diferenças significativas de viabilidade. ARG2 codifica acetilglutamato sintase, uma enzima mitocondrial envolvida na biossíntese de glutamato (Jauniaux, *et al.*, 1978). Embora Arg2 não possua grande similaridade com nenhuma proteína humana, um alinhamento de sequência revelou um domínio conservado (DUF619) relacionado à atividade acetilglutamato sintase (Figura 42).

Figura 42: Domínio conservado DUF619, encontrado em acetilglutamato sintases, enzima envolvida na biossíntese de arginina em vários níveis taxonômicos, incluindo fungos, peixes e humanos. O alinhamento de sequências foi gerado por BLASTp (*Basic Local Alignment Tool* for protein).

Apesar de não haver dados na literatura que relacionem a biossíntese de aminoácidos com a atividade de indolocarbazóis, é possível que Arg2 esteja envolvida com outras vias moleculares. Estudos em larga escala relacionaram a deleção de *ARG2* com o encurtamento de telômeros e com a resistência aos efeitos citotóxicos, especialmente por estresse oxidativo, desencadeados pela proteína humana α -sinucleína (Askree *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2008). Além disso, a arginina é um precursor na síntese de óxido nítrico (NO), o qual pode levar à apoptose, em condições de estresse, quando em baixas concentrações (Almeida *et al.*, 2007). É também conhecido que a depleção de aminoácidos tem importante papel antiproliferativo e é terapeuticamente usado, como no caso de aplicação de asparaginase. Acredita-se que a depleção de asparagina leve células tumorais, especialmente as leucêmicas, a entrar em processo apoptótico (Avramis, 2012).

7. CONCLUSÕES

Diante de nossos resultados e de acordo com dados da literatura, podemos concluir que:

- A atividade de arginina metiltransferases e da via Cop9 sinalossomo (CSN) são importantes para a resposta à gemcitabina. Verificamos que os genes *HMT1* e *CSII* de *Saccharomyces cerevisiae* têm relação com a resistência à droga, sendo que ambos possuem ortólogos humanos: PRMT1 e CSN6, respectivamente. O papel de Hmt1 e outras arginina metiltransferases na resposta à droga provavelmente se deve a alterações no controle epigenético da expressão gênica. Csi1, e possivelmente outras proteínas do CSN, como Rri1/Csn5, tem papel considerável na resposta à gemcitabina. A atividade isopeptidásica do complexo CSN é importante para a degradação de proteínas intracelulares, regulando a atividade de enzimas chave no metabolismo da gemcitabina, como ribonucleotídeo redutase. Nossos dados sugerem que o uso de antitumorais baseados em inibidores do CSN talvez sejam eficazes em sensibilizar células cancerígenas resistentes à gemcitabina.

- Os genes *RPD3*, *JHD2* e *SLG1* são importantes para a resistência ao análogo de rebecamicina RebC. As atividades lisina deacetilase e demetilase de Rpd3 e Jhd2, respectivamente, podem ser importantes para o controle da expressão de genes de resistência multidroga – notadamente Pdr5, ortólogo ao já conhecido ABCG2 – responsáveis pela resistência a alguns indolocarbazóis. Os efeitos exatos da transdução de sinal por Slg1 pela via de Pkc1 são pouco conhecidos. Além disso, a atividade de Hsp90, a qual é modulada por Rpd3, tem efeitos significativos para o aumento da sensibilidade a outros compostos. Conjuntamente, a resistência a RebC devida a Rpd3, Jhd2 e Slg1 deve ter relação com a atividade de Pdr5 e Hsp90. Bem como acontece para outros indolocarbazóis, acreditamos que RebC também tenha efeito inibitório sobre Pkc1. RebC pode ser um

composto promissor para desenvolvimento de um novo antitumoral eficaz em células tumorais com baixa expressão de ABCG2.

8. REFERÊNCIAS

ABREU C.M., KUMAR R., HAMILTON D., DAWDY A.W., CREAVIN K., EIVERS S., FINN K., BALSBAUGH J.L., O'CONNOR R., KIELY P.A., SHABANOWITZ J., HUNT D.F., GRENON M., LOWNDES N.F. Site-specific phosphorylation of the DNA damage response mediator rad9 by cyclin-dependent kinases regulates activation of checkpoint kinase 1. *PLoS Genet.* 2013 Apr;9(4):e1003310. doi: 10.1371/journal.pgen.1003310. Epub 2013 Apr 4.

ALMEIDA B, BUTTNER S, OHLMEIER S, SILVA A, MESQUITA A, SAMPAIO-MARQUES B, OSÓRIO NS, KOLLAU A, MAYER B, LEÃO C, LARANJINHA J, RODRIGUES F, MADEO F, LUDOVICO P. NO-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci.* 2007 Sep 15;120(Pt 18):3279-88. Epub 2007 Aug 28.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society; 2013.

ANDERSSON R.; AHO U.; NILSSON B.I.; PETERS G.J.; PASTOR-ANGLADA M.; RASCH W.; SANDVOLD M.L. Gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer: Molecular mechanisms and potential solutions. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. v. 44, n. 7, p. 782-786. ago. 2009.

ANDRESON BL, GUPTA A, GEORGIEVA BP, ROTHSTEIN R. The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2010 Oct;38(19):6490-501. doi: 10.1093/nar/gkq552. Epub 2010 Jun 21.

ARLT A., GEHRZ A., MÜERKÖSTER S., VORNDAMM J., KRUSE M-L., FÖLSCH U.R., SCHÄFER H. Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene*. v. 22, n. 21, p. 3243-3251. mai. 2003.

ASKREE S.H., YEHUDA T., SMOLIKOV S., GUREVICH R., HAWK J., COKER C., KRAUSKOPF A., KUPIEC M., MCEACHERN MJ. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 8;101(23):8658-63. Epub 2004 May 25.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., AND STRUHL, K. (eds.) 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.

AVRAMIS V.I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res*. 2012 Jul;32(7):2423-37.

BAILLY C., COLSON P., HOUSIER C., RODRIGUES-PEREIRA E., PRUDHOMME M., WARING M.J. Recognition of specific sequences in DNA by a topoisomerase I inhibitor derived from the antitumor drug rebeccamycin. *Molecular Pharmacology*. v. 53, n. 1, p. 77-87. jan. 1998.

BAILLY C.; QU X.; ANIZON F.; PRUDHOMME M.; RIOU J.F.; CHAIRES J.B. Enhanced binding to DNA and topoisomerase I inhibition by an analog of the antitumor antibiotic rebeccamycin containing an amino sugar residue. *Molecular Pharmacology*. v. 55, n. 2, p. 377-385. fev. 1999.

BANZI M., AGUIARI G., TRIMI V., MANGOLINI A., PINTON P., WITZGALL R., RIZZUTO R., DEL SENNO L. Polycystin-1 promotes PKC α -mediated NF- κ B activation in kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Nov 17;350(2):257-62. Epub 2006 Sep 18.

BECKER H.F., MOTORIN Y., PLANTA R.J., GROSJEAN H. The yeast gene YNL292w encodes a pseudouridine synthase (Pus4) catalyzing the formation of psi55 in both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Nov 15;25(22):4493-9.

BENHAR M., DALYOT I., ENGELBERG D., LEVITZKI A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-

activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Molecular and Cell Biology*. v. 21, n. 20, p. 6913-6926. out. 2001.

BERGMAN A.M.; PINEDO H.M.; PETERS G.J. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resistance Updates*. v. 5, n. 1, p. 19-33. fev. 2002.

BERMEJO C, GARCÍA R, STRAEDE A, RODRÍGUEZ-PEÑA JM, NOMBELA C, HEINISCH JJ, ARROYO J. Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS*. 2010 Dec;14(6):679-88. doi: 10.1089/omi.2010.0060. Epub 2010 Oct 20.

BORECKA-MELKUSOVA S, KOZOVSKA Z, HIKKEL I, DZUGASOVA V, SUBIK J. RPD3 and ROM2 are required for multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2008 May;8(3):414-24. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00352.x. Epub 2008 Jan 16.

BORRIELLO A, BENCIVENGA D, CRISCUOLO M, CALDARELLI I, CUCCIOLLA V, TRAMONTANO A, BORGIA A, SPINA A, OLIVA A, NAVIGLIO S, DELLA RAGIONE F. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:677-93.

BORTHAKUR G., ALVARADO Y., RAVANDI-KASHANI F., CORTES J., ESTROV Z., FADERL S., IVY P., BUESO-RAMOS C., NEBIYOU BEKELE B., GILES F. Phase 1 study of XL119, a rebeccamycin analog, in patients with refractory hematologic malignancies. *Cancer*. v. 113, n. 2, p. 360-366. jul. 2008.

BOTSTEIN D, FINK GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*. n. 189, n. 3, p. 695-704. nov. 2011.

BURSTEIN H.J.; OVERMOYER B.; GELMAN R.; SILVERMAN P.; SAVOIE J.; CLARKE K.; DUMADAG L.; YOUNGER J.; IVY P, WINER E.P. Rebeccamycin analog for refractory breast cancer: a randomized phase II trial of dosing schedules. *Investigational New Drugs*. v. 25, n. 2, p. 161-164. abr. 2007.

BUSH J.A.; LONG B.H.; CATINO J.J.; BRADNER W.T.; TOMITA K. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *The Journal of Antibiotics* v. 40, n. 5, p. 668-678. mai. 1987.

CAGNAC O, LETERRIER M, YEAGER M, BLUMWALD E. Identification and characterization of Vnx1p, novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24284-93. Epub 2007 Jun 22.

CASSIDY LD, VENKITARAMAN AR. Genome instability mechanisms and the structure of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2012 Feb;22(1):10-3. doi: 10.1016/j.gde.2012.02.003. Epub 2012 Feb 25.

CHAI B, HSU JM, DU J, LAURENT BC. Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. *Genetics*. 2002 Jun;161(2):575-84.

CHEN Z., ZHOU J., ZHANG Y., BEPLER G. Modulation of the ribonucleotide reductase M1-gemcitabine interaction in vivo by N-ethylmaleimide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 413, n. 2, p. 383-388. set. 2011.

CHOI HH, GULLY C, SU CH, VELAZQUEZ-TORRES G, CHOU PC, TSENG C, ZHAO R, PHAN L, SHAIKEN T, CHEN J, YEUNG SC, LEE MH. COP9 signalosome subunit 6 stabilizes COP1, which functions as an E3 ubiquitin ligase for 14-3-3 σ . *Oncogene*. 2011 Dec 1;30(48):4791-801. doi: 10.1038/onc.2011.192. Epub 2011 May 30.

CHU I.M., HENGST L., SLINGERLAND J.M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. v. 8, n. 4, p. 253-267. abr. 2008

CHYMKOWITCH P, ELDHOLM V, LORENZ S, ZIMMERMANN C, LINDVALL JM, BJØRÅS M, MEZA-ZEPEDA LA, ENSERINK JM. Cdc28 kinase activity regulates the basal transcription machinery at a subset of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 26;109(26):10450-5. doi: 10.1073/pnas.1200067109. Epub 2012 Jun 11.

DAVIES S.P.; REDDY H.; CAIVANO M.; COHEN P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical Journal*. v. 351, n. 1, p. 95-105. out. 2000.

DOMKIN V, THELANDER L, CHABES A. Yeast DNA damage-inducible Rnr3 has a very low catalytic activity strongly stimulated after the formation of a cross-talking Rnr1/Rnr3 complex. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18574-8. Epub 2002 Mar 13.

DOS SANTOS S.C., SÁ-CORREIA, I. Genomewide identification of genes required for yeast growth under imatinib stress: vacuolar H⁺-ATPase function is an important target of this anticancer drug. *OMICS*. 2009 Jun;13(3):185-98. doi: 10.1089/omi.2008.0086.

DOS SANTOS SC, TEIXEIRA MC, CABRITO TR, SÁ-CORREIA I. Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Frontiers in Genetics*. v. 3, n. 63. doi: 10.3389/fgene.2012.00063. abr. 2012

DOWLATI A.; CHAPMAN R.; SUBBIAH S., FU P.; NESS A.; CORTAS T.; PATRICK L.; REYNOLDS S.; XU N.; LEVITAN N.; IVY P.; REMICK S.C. Randomized phase II trial of different schedules of administration of rebeccamycin analogue as second line therapy in non-small cell lung cancer. *Investigational New Drugs*. v. 23, n. 6, p. 563-567. dez. 2005.

DOWLATI A., POSEY J., RAMANATHAN R.K., RATH L., FU P., CHAK A., KRISHNAMURTHI S., BRELL J., INGALLS S., HOPPEL C.L., IVY P., REMICK S.C. Phase II and pharmacokinetic trial of rebeccamycin analog in advanced biliary cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. v. 65, n. 1, p. 73-78. dez. 2009.

DUXBURY MS, ITO H, ZINNER MJ, ASHLEY SW, WHANG EE. RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 2004;23:1539–48.

ELLEDGE SJ, DAVIS RW. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev*. 1990 May;4(5):740-51.

ENSERINK JM, HOMBAUER H, HUANG ME, KOLODNER RD. Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2009 May 4;185(3):423-37. doi: 10.1083/jcb.200811083. Epub 2009 Apr 27.

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C AND PARKIN DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, acessado em 29 de julho de 2013.

FUSCO A, FEDELE M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:899–910.

GANDHI V, LEGHA J, CHEN F, HERTEL LW, Plunkett W. Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Res* 1996;56:4453–9.

GIAEVER G, CHU AM, NI L, CONNELLY C, RILES L, VÉRONNEAU S, DOW S, LUCAU-DANILA A, ANDERSON K, ANDRÉ B, ARKIN AP, ASTROMOFF A, EL-BAKKOURY M, BANGHAM R, BENITO R, BRACHAT S, CAMPANARO S, CURTISS M, DAVIS K, DEUTSCHBAUER A, ENTIAN KD, FLAHERTY P, FOURY F, GARFINKEL DJ, GERSTEIN M, GOTTE D, GÜLDENER U, HEGEMANN JH, HEMPEL S, HERMAN Z, JARAMILLO DF, KELLY DE, KELLY SL, KÖTTER P, LABONTE D, LAMB DC, LAN N, LIANG H, LIAO H, LIU L, LUO C, LUSSIER M, MAO R, MENARD P, OOI SL, REVUELTA JL, ROBERTS CJ, ROSE M, ROSS-MACDONALD P, SCHERENS B, SCHIMMACK G, SHAFER B, SHOEMAKER DD, SOOKHAI-MAHADEO S, STORMS RK, STRATHERN JN, VALLE G, VOET M, VOLCKAERT G, WANG CY, WARD TR, WILHELMY J, WINZELER EA, YANG Y, YEN G, YOUNGMAN E, YU K, BUSSEY H, BOEKE JD, SNYDER M, PHILIPPSEN P, DAVIS RW, JOHNSTON M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome *Nature*. v. 418, n. 6896, p. 387-391. jul. 2002.

GIAEVER G, FLAHERTY P, KUMM J, PROCTOR M, NISLOW C, JARAMILLO DF, CHU AM, JORDAN MI, ARKIN AP, DAVIS RW. Chemogenomic profiling: identifying the

functional interactions of small molecules in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 20;101(3):793-8. Epub 2004 Jan 12.

GREAVES M, MALEY CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):306-13. doi: 10.1038/nature10762.

GREENHALF W., THOMAS A. Combination therapy for the treatment of pancreatic cancer. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. v. 11, n. 5, p. 418-426. jun. 2011.

GROOM K., BHATTACHARYA A., ZECHEL D.L. Rebeccamycin and staurosporine biosynthesis: insight into the mechanisms of the flavin-dependent monooxygenases RebC and StaC. *Chembiochem*. v. 12, n. 3, p. 396-400. fev. 2011.

GU BW, BESSLER M, MASON PJ. A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10173-8. doi: 10.1073/pnas.0803559105. Epub 2008 Jul 14.

HABIRO A.; TANNO S.; KOIZUMI K.; IZAWA T.; NAKANO Y.; OSANAI M.; MIZUKAMI Y.; OKUMURA T.; KOHGO Y. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 316, n. 1, p. 71-77. mar. 2004.

HAN J., TALORETE T.P., YAMADA P., ISODA H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. v. 59, n.1, p. 45-53. jan. 2009.

HAN T.X., XU X.Y., ZHANG M.J., PENG X., DU L.L. Global fitness profiling of fission yeast deletion strains by barcode sequencing. *Genome Biol*. 2010;11(6):R60. doi: 10.1186/gb-2010-11-6-r60. Epub 2010 Jun 10.

HATZIS P.; AL-MADHOON A.S.; JÜLLIG M.; PETRAKIS T.G.; ERIKSSON S.; TALIANIDIS I. The intracellular localization of deoxycytidine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 46, p. 30239-30243. nov. 1998.

HEATH VL, SHAW SL, ROY S, CYERT MS. Eukaryot Cell. 2004 Jun;3(3):695-704. Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurina-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*.

HEINEMANN V.; SCHULZ L.; ISSELS R.D. Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Seminars in Oncology* v. 22, n. 11. 1995.

HEINEMANN V.; XU Y.Z.; CHUBB S. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potentialiation. *Cancer Research* v. 52, p. 533-539. 1992.

HILLENMEYER ME, FUNG E, WILDENHAIN J, PIERCE SE, HOON S, LEE W, PROCTOR M, ST ONGE RP, TYERS M, KOLLER D, ALTMAN RB, DAVIS RW, NISLOW C, GIAEVER G. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):362-5. doi: 10.1126/science.1150021.

HODGE L.S., TAUB M.E., TRACY T.S. The deaminated metabolite of gemcitabine, 2',2'-difluorodeoxyuridine, modulates the rate of gemcitabine transport and intracellular phosphorylation via deoxycytidine kinase. *Drug Metabolism Disposition*. v. 39, n. 11, p. 2013-2016. nov. 2011

HOON S, ST ONGE RP, GIAEVER G, NISLOW C. Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Oct;29(10):499-504. doi: 10.1016/j.tips.2008.07.006. Epub 2008 Aug 26.

HUANG P.; CHUBB S.; HERTEL L.W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Research* v. 51, p. 6110-6117. 1991.

HUANG AM, KAO YT, TOH S, LIN PY, CHOU CH, HU HT, LU CY, LIOU JY, CHAO SY, HOUR TC, PU YS. UBE2M-mediated p27(Kip1) degradation in gemcitabine cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 2011 Jul 1;82(1):35-42. doi: 10.1016/j.bcp.2011.03.026. Epub 2011 Apr 6.

HUMPHRYES N, LEUNG WK, ARGUNHAN B, TERENCEV Y, DVORACKOVA M, TSUBOUCHI H. The Ecm11-Gmc2 complex promotes synaptonemal complex formation

through assembly of transverse filaments in budding yeast. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003194. doi: 10.1371/journal.pgen.1003194. Epub 2013 Jan 10.

IMAZU H, SAKURAI H. *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor regulates cell wall remodeling in response to heatshock. *Eukaryot Cell.* 2005 Jun;4(6):1050-6.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa/2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2011.

ISHIDA S, LEE J, THIELE DJ, HERSKOWITZ I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14298-302. Epub 2002 Oct 7.

IWASAKI H., HUANG P., KEATING M.J., PLUNKETT W. Differential incorporation of ara-C, gemcitabine, and fludarabine into replicating and repairing DNA in proliferating human leukemia cells. *Blood.* v. 90, n. 1, p. 270-278. jul. 1997.

JAUNIAUX JC, URRESTARAZU LA, WIAME JM. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *J Bacteriol.* 1978 Mar;133(3):1096-1107.

JEMAL A, CENTER MM, DESANTIS C, WARD EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug;19(8):1893-907. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0437. Epub 2010 Jul 20.

KAISER, J. Combining Targeted Drugs To Stop Resistant Tumors. *Science.* v. 331, n. 6024, p. 1542-1545. mar. 2011.

KIM M-K., JEON Y-K., WOO J-K., CHOI Y., CHOI D-H., KIM Y-H., KIM C-W. The C-terminal region of Bfl-1 sensitizes non- small cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis by suppressing NF- B activity and down-regulating Bfl-1. *Molecular Cancer.* v. 10, n. 98. doi: 10.1186/1476-4598-10-98. ago. 2011.

KLOSE RJ, KALLIN EM, ZHANG Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet.* 2006 Sep;7(9):715-27.

KOMORI S.; OSADA S.; MORI R.; MATSUI S.; SANADA Y.; TOMITA H.; TOKUYAMA Y.; TAKAHASHI T.; YAMAGUCHI K.; YOSHIDA K. Contribution of thymidylate synthase to gemcitabine therapy for advanced pancreatic cancer. *Pancreas*. v. 39, n. 8, p. 1284-1292. nov. 2010.

KROEP J.R., GIACCONE G., TOLIS C., VOORN D.A., LOVES W.J., GROENINGEN C.J., PINEDO H.M., PETERS G.J. Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. v. 83, n. 8, p. 1069-1076. out. 2000.

KROEP J.R.; LOVES W.J.; VAN DER WILT C.L.; ALVAREZ E.; TALIANIDIS I.; BOVEN E.; BRAAKHUIS B.J.; VAN GROENINGEN C.J.; PINEDO H.M.; PETERS G.J. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 1, n. 6, p. 371-376. abr. 2002.

LAFAYETTE SL, COLLINS C, ZAAS AK, SCHELL WA, BETANCOURT-QUIROZ M, GUNATILAKA AA, PERFECT JR, COWEN LE. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog*. 2010 Aug 26;6(8):e1001069. doi: 10.1371/journal.ppat.1001069.

LAU JP, WEATHERDON KL, SKALSKI V, HEDLEY DW. Effects of gemcitabine on APE/ref-1 endonuclease activity in pancreatic cancer cells, and the therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *Br J Cancer* 2004;91:1166–73.

LEÓN ORTIZ AM, REID RJ, DITTMAR JC, ROTHSTEIN R, NICOLAS A. Srs2 overexpression reveals a helicase-independent role at replication forks that requires diverse cell functions. *DNA Repair (Amst)*. 2011 May 5;10(5):506-17. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.02.004. Epub 2011 Apr 1.

LI J, WANG Y, YANG C, WANG P, OELSCHLAGER DK, ZHENG Y, TIAN DA, GRIZZLE WE, BUCHSBAUM DJ, WAN M. Polyethylene glycosylated curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth through inactivation of Jab1. *Mol Pharmacol*. 2009 Jul;76(1):81-90. doi: 10.1124/mol.109.054551. Epub 2009 Apr 24.

LIANG G, KLOSE RJ, GARDNER KE, ZHANG Y. Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Mar;14(3):243-5. Epub 2007 Feb 18.

LIANG J, CLARK-DIXON C, WANG S, FLOWER TR, WILLIAMS-HART T, ZWEIG R, ROBINSON LC, TATCHELL K, WITT SN. Novel suppressors of alpha-synuclein toxicity identified using yeast. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3784-95. doi: 10.1093/hmg/ddn276. Epub 2008 Sep 4.

LIAU S.S.; WHANG E. HMGA1 is a molecular determinant of chemoresistance to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research.* v. 14, n. 5, p. 1470-1477. mar. 2008.

LIN Y.W.; TSAI M.S.; KUO Y.H.; CHIU Y.F.; SU Y.C. Downregulation of Rad51 expression overcomes drug resistance to gemcitabine in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* v. 335, n. 3, p. 830-840. set. 2010.

LIU C, POWELL KA, MUNDT K, WU L, CARR AM, CASPARI T. Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev.* 2003 May 1;17(9):1130-40. Epub 2003 Apr 14.

LIU T, XU F, DU X, LAI D, LIU T, ZHAO Y, HUANG Q, JIANG L, HUANG W, CHENG W, LIU Z. Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem.* 2010 Jul;340(1-2):265-73. doi: 10.1007/s11010-010-0426-5. Epub 2010 Mar 12.

MACKEY JR, MANI RS, SELNER M, MOWLES D, YOUNG JD, BELT JA, CRAWFORD CR, CASS CE. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998;58:4349–57.

MARMINON C.; ANIZON F.; MOREAU P.; PFEIFFER B.; PIERRÉ A.; GOLSTEYN R.M.; PEIXOTO P.; HILDEBRAND M.P.; DAVID-CORDONNIER M.H.; LOZACH O.; MEIJER L.; PRUDHOMME M. Rebeccamycin derivatives as dual DNA-damaging agents

and potent checkpoint kinase 1 inhibitors. *Molecular Pharmacology*. v. 74, n. 6, p. 1620-1629. dez. 2008.

MELLOR H., PARKER P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal*. v. 332, n. 2, p. 281-292. jun. 1998.

MILLIMAN EJ, YADAV N, CHEN YC, MUDDUKRISHNA B, KARUNANITHI S, YU MC. Recruitment of Rpd3 to the telomere depends on the protein arginine methyltransferase Hmt1. *PLoS One*. 2012;7(8):e44656. doi: 10.1371/journal.pone.0044656. Epub 2012 Aug 31.

MINI E.; NOBILI S.; CACIAGLI B.; LANDINI I.; MAZZEI T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*. v. 7, s. 5, p. v7-v12. mai. 2006.

MOLINA-ARCAS M, CASADO FJ, PASTOR-ANGLADA M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009 Oct;7(4):426-34. Review.

NAGOURNEY R.A.; FLAM M.; LINK J.; HAGER S.; BLITZER J.; LYONS W.; SOMMERS B.L.; EVANS S. Carboplatin plus gemcitabine repeating doublet therapy in recurrent breast cancer. *Clinical Breast Cancer*. v. 8, n.5, p. 432-435. out. 2008.

NAKAGAWA H, AKAMATSU S, TAKATA R, TAKAHASHI A, KUBO M, NAKAMURA Y. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):607-13. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02193.x. Epub 2012 Jan 29.

NAKAHIRA S, NAKAMORI S, TSUJIE M, TAKAHASHI Y, OKAMI J, YOSHIOKA S, YAMASAKI M, MARUBASHI S, TAKEMASA I, MIYAMOTO A, TAKEDA Y, NAGANO H, DONO K, UMESHITA K, SAKON M, MONDEN M. Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1355–63.

NICHOLSON TB, CHEN T, RICHARD S. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res*. 2009 Dec;60(6):466-74. doi: 10.1016/j.phrs.2009.07.006. Epub 2009 Jul 28.

NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.

PEREIRA E.R., BELIN L., SANCELME M., PRUDHOMME M., OLLIER M., RAPP M., SEVÈRE D., RIOU J.F., FABBRO D., MEYER T. Structure-Activity Relationships in a Series of Substituted Indolocarbazoles: Topoisomerase I and Protein Kinase C Inhibition and Antitumoral and Antimicrobial Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 39, n. 22, p. 4471-4477. out. 1996.

PHILIP B, LEVIN DE. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol*. 2001 Jan;21(1):271-80.

PIERCE SE, DAVIS RW, NISLOW C, GIAEVER G. Chemogenomic approaches to elucidation of gene function and genetic pathways. *Methods in Molecular Biology*. v. 548, p.115-143. doi: 10.1007/978-1-59745-540-4_7. 2009.

PONTING CP, HOFMANN K, BORK P.A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr Biol*. 1999 Aug 26;9(16):R585-8.

PRUDHOMME M. Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 38, n. 2, p. 123-140. fev. 2003.

PRUDHOMME M. Recent developments of rebeccamycin analogues as topoisomerase I inhibitors and antitumor agents. *Current Medicinal Chemistry*. v. 7, n. 12, p. 1189-1212. dez. 2000.

RAFFOUL JJ, HEYDARI AR, HILLMAN GG. DNA Repair and Cancer Therapy: Targeting APE1/Ref-1 Using Dietary Agents. *J Oncol* 2012;2012:370481.

RECK M.; VON PAWEL J.; ZATLOUKAL P.; RAMLAU R.; GORBOUNOVA V.; HIRSH V.; LEIGHL N.; MEZGER J.; ARCHER V.; MOORE N.; MANEGOLD C. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for

nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *Journal of Clinical Oncology*. v. 27, n. 8, p. 1227-1234. mar. 2009.

ROBBINS N, LEACH MD, COWEN LE. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance *Cell Rep*. 2012 Oct 25;2(4):878-88. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.035. Epub 2012 Oct 4.

ROBEY R.W.; OBRZUT T.; SHUKLA S.; POLGAR O.; MACALOU S.; BAHR J.C.; DI PIETRO A.; AMBUDKAR S.V.; BATES S.E. Becatecarin (rebeccamycin analog, NSC 655649) is a transport substrate and induces expression of the ATP-binding cassette transporter, ABCG2, in lung carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. v. 64, n. 3, p. 575-583. ago. 2009.

ROESCH A, VULTUR A, BOGESKI I, WANG H, ZIMMERMANN KM, SPEICHER D, KÖRBEL C, LASCHKE MW, GIMOTTY PA, PHILIPP SE, KRAUSE E, PÄTZOLD S, VILLANUEVA J, KREPLER C, FUKUNAGA-KALABIS M, HOTH M, BASTIAN BC, VOGT T, HERLYN M. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell*. 2013 Jun 10;23(6):811-25. doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.003.

RUIZ VAN HAPEREN V.W.; VEERMAN G.; VERMORKEN J.B.; PETERS G.J. 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical Pharmacology*. v. 46, n. 4, p. 762-766. ago. 1993.

RUIZ VAN HAPEREN VW, VEERMAN G, ERIKSSON S, BOVEN E, STEGMANN AP, HERMSEN M, VERMORKEN JB, PINEDO HM, PETERS GJ. Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res* 1994;54:4138-43.

RUIZ VAN HAPEREN VW, VEERMAN G, VERMORKEN JB, PINEDO HM, PETERS G. Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 1996;51:911-8

SAITO H.; AN R.; HIRANO H.; ISHIKAWA T. Emerging new technology: QSAR analysis and MO Calculation to characterize interactions of protein kinase inhibitors with the human ABC transporter, ABCG2 (BCRP). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. v. 25, n. 1, p. 72-83. 2010.

SCHENK PW, BROK M, BOERSMA AW, BRANDSMA JA, DEN DULK H, BURGER H, STOTER G, BROUWER J, NOOTER K. Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin- and doxorubicin-provoked cell kill. *Mol Pharmacol*. 2003 Aug;64(2):259-68.

SHEN EC, HENRY MF, WEISS VH, VALENTINI SR, SILVER PA, LEE MS. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):679-91.

SHEN H, LAIRD PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):38-55. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.008.

SHULEWITZ MJ, INOUE CJ, THORNER J. Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct;19(10):7123-37.

SLETTA H, KLINKENBERG G, WINNBERG A, KVITVANG HF, NILSEN MB, KROKAN HE, OTTERLEI M, BRUHEIM P. A new high resolution screening method for study of phenotype stress responses of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *J Microbiol Methods*. 2011 Dec;87(3):363-7. doi: 10.1016/j.mimet.2011.10.003. Epub 2011 Oct 8.

SMITH AM, HEISLER LE, MELLOR J, KAPER F, THOMPSON MJ, CHEE M, ROTH FP, GIAEVER G, NISLOW C. Quantitative phenotyping via deep barcode sequencing. *Genome Research*. v. 19, n. 10, p. 1836-1842. out. 2009.

SMITH AM, HEISLER LE, ST ONGE RP, FARIAS-HESSON E, WALLACE IM, BODEAU J, HARRIS AN, PERRY KM, GIAEVER G, POURMAND N, NISLOW C. Highly-multiplexed barcode sequencing: an efficient method for parallel analysis of pooled samples. *Nucleic Acids Research* v. 38, n. 13, e142 doi: 10.1093/nar/gkq368. jul. 2010.

SMITH KL, ISAACS C. BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Cancer J*. 2011 Nov-Dec;17(6):492-9. doi: 10.1097/PPO.0b013e318238f579.

SPRATLIN J.; SANGHA R.; GLUBRECHT D.; DABBAGH L.; YOUNG J.D.; DUMONTET C.; CASS C.; LAI R.; MACKEY J.R. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. v. 10, n. 20, p. 6956-6961. out. 2004.

SRINIVAS G., ANTO R.J., SRINIVAS P., VIDHYALAKSHMI S., SENAN V.P., KARUNAGARAN D. (2003) Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *European Journal of Pharmacology*. v. 473, n. 2, p. 117-25. jul. 2003

SUBRAMANIAM D, PERIYASAMY G, PONNURANGAM S, CHAKRABARTI D, SUGUMAR A, PADIGARU M, WEIR SJ, BALAKRISHNAN A, SHARMA S, ANANT S. CDK-4 inhibitor P276 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jul;11(7):1598-608. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0102. Epub 2012 Apr 24.

TORRES EM, WILLIAMS BR, AMON A. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics*. 2008 Jun;179(2):737-46. doi: 10.1534/genetics.108.090878.

UBERSAX JA, WOODBURY EL, QUANG PN, PARAZ M, BLETHROW JD, SHAH K, SHOKAT KM, MORGAN DO. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):859-64.

VAN ROMPAY AR, JOHANSSON M, KARLSSON A. Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme. *Mol Pharmacol* 1999;56:562-9.

VELTKAMP S.A.; PLUIM D.; VAN EIJDHOVEN M.A.; BOLIJN M.J.; ONG F.H.; GOVINDARAJAN R.; UNADKAT J.D.; BEIJNEN J.H.; SCHELLENS J.H. New insights

into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine. *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 7, n. 8, p. 2415-2425. ago. 2008.

VICKERS M.F.; YAO S.Y.; BALDWIN S.A.; YOUNG J.D.; CASS C.E. Nucleoside transporter proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: Demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275, n. 34, p. 25931-25938. ago. 2000.

VIDAL M, GABER RF. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1991 Dec;11(12):6317-27.

VOLDOIRE A., MOREAU P., SANCELME M., MATULOVA M., LÉONCE S., PIERRÉ A., HICKMAN J., PFEIFFER B., RENARD P., DIAS N., BAILLY C., PRUDHOMME M. Analogues of antifungal tjipanazoles from rebeccamycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 12, n. 8, p. 1955-1962. abr. 2004.

WANG L.; MUNCH-PETERSEN B.; HERRSTRÖM SJÖBERG A.; HELLMAN U.; BERGMAN T.; JÖRNVALL H.; ERIKSSON S. Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Letters*. v. 442, n. 2, p. 170-174. jan. 1999.

WATANABE M, SHERIFF S, LEWIS KB, TINCH SL, CHO J, BALASUBRAMANIAM A, KENNEDY MA. HMGA-targeted phosphorothioate DNA aptamers increase sensitivity to gemcitabine chemotherapy in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett* 2012;315:18–27.

WEI N, DENG XW. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:261-86.

WEI N, SERINO G, DENG XW. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*. 2008 Dec;33(12):592-600. doi: 10.1016/j.tibs.2008.09.004. Epub 2008 Oct 14.

WINZELER EA, SHOEMAKER DD, ASTROMOFF A, LIANG H, ANDERSON K, ANDRE B, BANGHAM R, BENITO R, BOEKE JD, BUSSEY H, CHU AM, CONNELLY C, DAVIS K, DIETRICH F, DOW SW, EL BAKKOURY M, FOURY F, FRIEND SH, GENTALEN E, GIAEVER G, HEGEMANN JH, JONES T, LAUB M, LIAO H, LIEBUNDGUTH N, LOCKHART DJ, LUCAU-DANILA A, LUSSIER M, M'RABET N, MENARD P, MITTMANN M, PAI C, REBISCHUNG C, REVUELTA JL, RILES L, ROBERTS CJ, ROSS-MACDONALD P, SCHERENS B, SNYDER M, SOOKHAI-MAHADEO S, STORMS RK, VÉRONNEAU S, VOET M, VOLCKAERT G, WARD TR, WYSOCKI R, YEN GS, YU K, ZIMMERMANN K, PHILIPPSSEN P, JOHNSTON M, DAVIS RW. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* n. 285, v. 5429, p. 901-906. ago. 1999.

WONG A, SOO RA, YONG WP, Innocenti F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev* 2009;41:77–88.

WONG CM, TANG HM, KONG KY, WONG GW, QIU H, JIN DY, HINNEBUSCH AG. Yeast arginine methyltransferase Hmt1p regulates transcription elongation and termination by methylating Npl3p. *Nucleic Acids Res.* 2010 Apr;38(7):2217-28. doi: 10.1093/nar/gkp1133. Epub 2010 Jan 6.

WOO M.H., VANCE J.R., MARCOS A.R., BAILLY C., BJORNSTI M.A. Active site mutations in DNA topoisomerase I distinguish the cytotoxic activities of camptothecin and the indolocarbazole, rebeccamycin. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 277, n. 6, p. 3813-3822. fev. 2002.

XIONG GS, SUN HL, WU SM, MO JZ. Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro. *J Dig Dis* 2010;11:224–30.

XU H, FABER C, UCHIKI T, RACCA J, DEALWIS C. Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4028–33.

YAMANE K, TATEISHI K, KLOSE RJ, FANG J, FABRIZIO LA, ERDJUMENT-BROMAGE H, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, TEMPST P, ZHANG Y. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):801-12. Epub 2007 Mar 15.

YANG XJ, SETO E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):206-18. doi: 10.1038/nrm2346.

YAO R, ZHANG Z, AN X, BUCCI B, PERLSTEIN DL, STUBBE J, HUANG M. Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6628-33. Epub 2003 May 5.

YEUNG M, DUROCHER D. Srs2 enables checkpoint recovery by promoting disassembly of DNA damage foci from chromatin. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Dec 10;10(12):1213-22. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.09.005. Epub 2011 Oct 5.

ZHAO B.; BOWER M.J.; MCDEVITT P.J.; ZHAO H.; DAVIS S.T.; JOHANSON K.O.; GREEN S.M.; CONCHA N.O.; ZHOU B.B. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n. 48, p. 46609-46615. nov. 2002.

ZHAO R, YEUNG SC, CHEN J, IWAKUMA T, SU CH, CHEN B, QU C, ZHANG F, CHEN YT, LIN YL, LEE DF, JIN F, ZHU R, SHAIKENOV T, SARBASSOV D, SAHIN A, WANG H, WANG H, LAI CC, TSAI FJ, LOZANO G, LEE MH. Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):851-65. doi: 10.1172/JCI44111. Epub 2011 Feb 7.

ZHAO X, ROTHSTEIN R. The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3746-51.

ZHOU B.B.; BARTEK J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature Review Cancer*. v. 4, n. 3, p. 216-225. mar. 2004.