**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 e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular

Graziele Fonseca de Sousa

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof[a]. Dr[a]. 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 e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular

Graziele Fonseca de Sousa

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof[a]. Dr[a]. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2013

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

Sousa, Graziele Fonseca de
S725i Identificação de alvos moleculares associados à resistência e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular / Graziele Fonseca de Sousa. -- São Paulo, 2013.
121p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Souza, Gisele Monteiro de

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Biologia molecular 3. Microbiologia médica I. T. II. Souza, Gisele Monteiro de, orientador.

615.1 CDD

Graziele Fonseca de Sousa

Identificação de alvos moleculares associados à resistência e a sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof[a]. Dr[a]. Gisele Monteiro de Souza
Orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo,_____de_____.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha saúde e proteção durante essa caminhada.

Aos meus pais e familiares pela paciência compreensão e pelo auxílio apesar dos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo Marcos que foi um dos maiores incentivadores do meu crescimento profissional.

À minha orientadora Prof$^{a}$. Dr$^{a}$. Gisele Monteiro de Souza pela oportunidade, auxílio e compreensão.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório e principalmente o Lucas, que me ajudaram em toda a parte experimental e que me incentivaram nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que apesar da distância e falta de tempo sempre estiveram presentes em minha vida.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

E a todos que me ajudaram direta ou indiretamente nesse projeto.

# RESUMO

Sousa, G.F. **Identificação de alvos moleculares associados à resistência e a sensibilidade aos antitumorais Carboplatina e análogos de Rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular.** 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Existe um grande interesse das indústrias farmacêuticas em encontrar um tratamento adequado para os pacientes com câncer que apresentaram resistência aos medicamentos comumente utilizados para o combate dessa neoplasia. Sendo assim, se faz necessário a busca de novos marcadores genéticos que estejam associados à predisposição do paciente a reagir ao efeito da droga de maneira diferente do esperado. Para isso, vários estudos vêm sendo desenvolvidos, baseados nos medicamentos anticancerígenos. Entre esses medicamentos podemos destacar os agentes quimioterápicos a base de platina, como a carboplatina, cisplatina, oxaliplatina e a nedaplatina, que agem eliminando as células cancerosas através da formação de adutos nas bases de purina do DNA nuclear e a rebecamicina, um antitumoral que possui a capacidade de inibir a ação catalítica das topoisomerases I, ainda em teste clínico. Desse modo, este estudo teve a perspectiva de encontrar mutantes de leveduras resistentes a carboplatina e análogos de rebecamicina. Como resultado, identificamos 19 genes associados à resistência a carboplatina, sendo que 6 deles possuem genes ortólogos em humanos associados principalmente ao mecanismo de reparo de DNA e ao transporte celular. Foram também identificadas 9 linhagens que estavam associadas a sensibilidade a carboplatina sendo que 3 delas possuem deleções em genes com ortólogos humanos, que estão associados ao transporte endossomal, ao ribossomo e ao bloqueio do ciclo celular na fase G1. Na busca por um novo composto antitumoral derivado de rebecamicina, identificamos Reb C como um análogo promissor, já que apresentou 9 genes associados a resistência, dos quais 2 deles possuem ortólogos humanos relacionados ao ribossomo e ao proteassoma.



**Palavras-chave:** carboplatina, análogos de rebecamicina, levedura, câncer.

## ABSTRACT

Sousa, G.F. **Identification of molecular targets associated to resistance and sensitivity to anticancer Carboplatin and analogs of rebeccamycin using *Saccharomyces cerevisiae* as a model cell.** 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

There is a strong interest from pharmaceutical companies in finding an appropriate treatment for patients with cancer who had resistance to drugs commonly used to fight this disease. Therefore, it is necessary to search for new genetic markers that are associated with the patient's predisposition to react to the drug differently than expected. Aiming this, several studies have been developed based on anticancer drugs. Among these drugs can be highlighted the chemotherapeutic agents based on platinum, such as carboplatin, cisplatin, oxaliplatin and nedaplatin, which act by eliminating cancer cells through the formation of adducts with the purine bases of nuclear DNA and the rebeccamycin, an antitumor that has the ability to inhibit the catalytic action of topoisomerase I, still in clinical trial. This study aimed to find yeast resistant mutants to carboplatin and rebeccamycin analogs. As a result, we identified 19 genes associated with resistance to carboplatin, 6 of them presenting orthologous genes in humans, which are mainly associated to the mechanism of DNA repair and to cellular transport. 9 strains were also identified which are associated with carboplatin sensitivity, 3 possessing their orthologous in humans associated with endosomal transport, ribosome and cell cycle arrest in the G1 phase. In a search for a new antitumor compound derived from rebeccamycin, we identified the Reb C analog as promising, since it featured nine genes associated with resistance to it, among 2 of them have human counterparts related to the ribosome and the proteasome.



**Keywords:** carboplatin, rebeccamycin analogs, yeast, cancer.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia de PCR para exclusão das ORFs alvo de levedura. 17

Figura 2: Porcentagem das ORFs já verificadas até o dia 07 de setembro de 2013. 19

Figura 3: Estrura química da Cisplatina e Transplatina. 20

Figura 4: Estrura química da Carboplatina, Oxaliplatina e Nedaplatina (Adaptado de Wozniak & Blasiak, 2002). 21

Figura 5: Hidrólise intracelular da carboplatina. 22

Figura 6: Representação esquemática de uma cadeia de DNA mostrando os locais disponíveis para a ligação de derivados de platina. 23

Figura 7: Mecanismo de ação da carboplatina dentro da célula. 24

Figura 8: Estrutura química da rebecamicina, estaurosporina e UCN-01 (Adaptado de Sánchez *et al.*, 2006). 26

Figura 9: Análogos de rebecamicina sintetizados no laboratório do Prof. Dr. Carlos Roque do IQ-UNICAMP. 32

Figura 10: Teste de viabilidade por diluição seriada. 33

Figura 11: Montagem da placa de 96 poços de acordo com a organização da tabela 2. 37

Figura 12: Viabilidade das linhagens mutantes que apresentaram maior defeito de *fitness* quando expostas a carboplatina nos estudos de Hillenmeyer et al. (2008). 42

Figura 13: Distribuição nos compartimentos celulares dos produtos gênicos responsáveis pelas respostas de sensibilidade ou resistência a carboplatina. 44

Figura 14: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *PHO90, AGC1 e AQY1* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. 49

Figura 15: Tratamento de *Δpho90* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 51

Figura 16: Tratamento de *Δagc1* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 52

Figura 17: Tratamento de *Δaqy1* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 53

Figura 18: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *AQY1* da levedura *S. cerevisiae* com AQP1 de humanos. 54

Figura 19: Tratamento do *Δvps21* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 55

Figura 20: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *VPS21* da levedura *S. cerevisiae* com RAB5B de humanos. 56

Figura 21: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *RIM101* e *HSP150* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. 58

Figura 22: Tratamento do *Δrim101* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 59

Figura 23: Tratamento do *Δhsp150* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 61

Figura 24: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *TRM7, MUS81* e *YBL055C* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. 62

Figura 25: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *CIN2, EAF3, TOD6 (YBL954W)* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. 63

Figura 26: Tratamento do *Δtrm7* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 64

Figura 27: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *TRM7* da levedura *S. cerevisiae* com FTSJ1 de humanos. 65

Figura 28: Tratamento do *Δmus81* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 66

Figura 29: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *MUS81* da levedura *S. cerevisiae* com MUS81 de humanos. 67

Figura 30: Tratamento do *Δybl055c* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 68

Figura 31: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *YBL055C* da levedura *S. cerevisiae* com TATDN1 de humanos. 69

Figura 32: Tratamento do *Δtod6* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 71

Figura 33: Tratamento do *Δcin2* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 73

Figura 34: Tratamento do *Δeaf3* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. 74

Figura 35: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *EAF3* da levedura *S. cerevisiae* com MORF4L1 de humanos. 75

Figura 36: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *NSG1, DID4* e *SAS3* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. 76

Figura 37: Tratamento do *Δnsg1* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 78

Figura 38: Tratamento do *Δdid4* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 79

Figura 39: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *DID4* da levedura *S. cerevisiae* com CHMP2A de humanos. 80

Figura 40: Tratamento do *Δsas3* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 82

Figura 41: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *PIN4* e *KTI12* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. 83

Figura 42: Tratamento do *Δpin4* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 84

Figura 43: Tratamento do *Δkti12* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 86

Figura 44: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *KTI12* da levedura *S. cerevisiae* com KTI12 de humanos. 87

Figura 45: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *RPL15B, RSM28* e *UBX3* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. 88

Figura 46: Tratamento do *Δrpl15b* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 89

Figura 47: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *RPL15B* da levedura *S. cerevisiae* com RPL25 de humanos. 90

Figura 48: Tratamento do *Δrsm28* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 91

Figura 49: Tratamento do *Δubx3* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. 92

Figura 50: Teste de viabilidade da linhagem selvagem. 93

Figura 51: Taxas de crescimento da linhagem selvagem com 0,1 mM de Reb C em comparação com a amostra controle (sem Reb C). 94

Figura 52: Viabilidade das linhagens mutantes da placa 13 que apresentaram maior sensibilidade quando expostas a Reb C. 95

Figura 53: Viabilidade das linhagens mutantes da placa 30 que apresentaram maior sensibilidade quando expostas a Reb C. 96

Figura 54: Diluição seriada das linhagens mutantes sensíveis das placas 13 e 30, expostas a 0,1mM, 10µM, 1µM e 100nM de Reb C. 97

Figura 55: Distribuição nos compartimentos celulares dos produtos gênicos responsáveis pelas respostas de sensibilidade a Reb C. 99

Figura 56: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *FCY21* e *LSB1* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a rebecamicina. 100

Figura 57: Viabilidade da linhagem mutante para *YER060W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 101

Figura 58: Viabilidade da linhagens mutante para *YGR136W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 102

Figura 59: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *FHN1* e *PRE9* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a rebecamicina. 103

Figura 60: Viabilidade da linhagem mutante para *YGR131W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 104

Figura 61: Viabilidade da linhagem mutante para *YGR135W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 105

Figura 62: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *PRE9* da levedura *S. cerevisiae* com PSMA4 de humanos. 106

Figura 63: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes *CCM1* e *RPL24B* que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a rebecamicina. 107

Figura 64: Viabilidade da linhagem mutante para *YGR150C* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 108

Figura 65: Viabilidade da linhagem mutante para *YGR148C* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. 109

Figura 66: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *RPL24B* da levedura *S. cerevisiae* com RPL24 de humanos. 110

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutantes de ORFs selecionadas do trabalho de Hillenmeyer *et al*. (2008) que apresentaram maior defeito na taxa de crescimento na presença de 250µM de carboplatina. ..... 36

Tabela 2: Ordem dos mutantes selecionados para análise de viabilidade na presença de carboplatina..... 38

Tabela 3: Linhagens mais sensíveis a carboplatina tanto na taxa de decrescimento (leitura em OD $_{600nm}$.) quanto na viabilidade medida pelo crescimento em placa..... 43

Tabela 4: Linhagens mais resistentes a carboplatina tanto na taxa de crescimento (leitura em OD $_{600nm}$) quanto na viabilidade medida pelo crescimento em placa. .....**Erro! Indicador não definido.**4

Tabela 5: Agrupamento por processo biológico dos genes identificados que apresentaram alta sensibilidade a carboplatina..... 46

Tabela 6: Agrupamento por processos biológica dos genes identificados que apresentaram alta resistência a carboplatina. .....48**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7: Agrupamento por componentes celulares dos genes identificados que apresentaram alta sensibilidade a rebecamicina. .....**Erro! Indicador não definido.**8

Tabela 8: Agrupamento por processos biológicos dos genes identificados que apresentaram alta sensibilidade a rebecamicina. .....**Erro! Indicador não definido.**8

## LISTA DE ABREVIATURAS

**OMS –** Organização Mundial da Saúde

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer

**PCR – Reação em** Cadeia da Polimerase

**ORF** – *Open Reading Frame*

**ISC** – *Inter Strand Cross-link*

**GSH** – Glutationa

**MT –** Metalotioneína

**GSTs** – Glutationa-S-Transferases

**YKO –** Yeast Knock Out

**Chk1** – Proteína quinase serina/treonina

**NER** – Reparo por Excisão de nucleotídeos

**$OD_{600nm}$** – Densidade ótica a 600 nanômetros

**CARB** – Carboplatina

**REB** – Rebecamicina

**tRNA** – RNA transportador

**ESCR-T-III** – Complexo de triagem endossomal III

**MVBs** – Corpos Multivesiculares endocíticos

**Mcms-5** – Metoxicarbonilmetil

**Ncms-5** – Carbamoilmetil

**DSC** – Complexo ubiquitina ligase

**PPR** - Pentetricopeptídeo

**SUMÁRIO**


1. ***INTRODUÇÃO*** 13
2. ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*** 16
2.1. *Saccharomyces cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO 16
2.2. CARBOPLATINA 19
2.2.1. **Histórico** 19
2.3. REBECAMICINA 25
3. ***JUSTIFICATIVA*** 28
4. ***OBJETIVO*** 30
4.1. GERAL 30
4.2. ESPECÍFICO 30
5.***MATERIAL E MÉTODOS*** 31
5.1. LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA 31
5.2. FONTE DE CARBOPLATINA E ANÁLOGOS DE REBECAMICINA 31
5.3. ADMINISTRAÇÃO DE CARBOPLATINA E ANÁLOGOS DE REBECAMICINA 32
5.4. TESTE DE VIABILIDADE POR DILUIÇÃO SERIADA 33
5.5. FERRAMENTAS UTILIZADAS PARA A BUSCA DAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS, MAPAS DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANOTAÇÃO DO PROCESSO BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE GENES DE LEVEDURA 34
5.5. 1. **Blast e Homologene** 34
5.5.2. **GeneMania** 35
5.5.3 **SGD Gene Ontology** 35
5.6. ***SELEÇÃO DOS MUTANTES SENSÍVEIS À CARBOPLATINA*** 35
6. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 38
6.1. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA DOS ANÁLOGOS DE CARBOPLATINA DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS 38
6.1.1. **Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos no mecanismo de transporte celular** 49
6.1.2. **Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos na biogênese de parede celular** 57
6.1.3. **Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos na resposta a danos no DNA** 62
6.1.4. **Genes associados à sensibilidade a carboplatina envolvidos na degradação de proteínas** 76
6.1.5. **Genes associados à sensibilidade a carboplatina envolvidos na progressão do ciclo celular** 82
6.1.6. **Genes associados à sensibilidade a carboplatina envolvidos com o ribossomo** 88
6.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA DOS ANÁLOGOS DE REBECAMICINA 93
6.2.1. **Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com o transporte transmembranar e organização** 100

**de citoesqueleto**
6.2.2. **Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com a biogênese de proteínas** 103
6.2.3. **Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com a tradução de proteínas** 107
7. **CONCLUSÃO** 111
8. **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS** 112

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o índice de novos casos de câncer tem ganhado maiores dimensões, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, são esperados 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas anualmente acometidas com a doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA, 2011).

A medicina através de diversos estudos tem buscado encontrar alternativas para combater o câncer que, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é a segunda doença que mais causa mortes na população brasileira desde 2003, representando cerca de 17% dos óbitos de causas conhecidas. Segundo o relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS), no ano de 2008 ocorreram cerca de 12 milhões de casos novos da doença, ocasionando 7 milhões de óbitos (INCA, 2009).

Um dos principais problemas encontrados no tratamento de tumores é o fato de alguns pacientes responderem aos medicamentos no início do tratamento, mas depois desenvolverem resistência aos mesmos. Essa resistência pode estar relacionada a mutações e alterações epigenéticas que podem ser causadas por diversos fatores (STEWART, 2007).

Anomalias cromossômicas incluindo translocações, deleções e aneuploidia (número inadequado de cromossomos) são fatores que estão relacionados à instabilidade genômica e, consequentemente, ao câncer, podendo ser um evento inicial do desenvolvimento de um tumor ou consequência dele (KOLODNER *et al.,* 2011). Sheltzer *et al.* (2011) demonstraram recentemente que a aneuploidia leva à instabilidade genômica em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Essa instabilidade genômica pode beneficiar células que estão sobre pressão seletiva, facilitando o crescimento e a proliferação destas, de forma semelhante a que ocorre em células tumorais.

Os agentes quimioterápicos baseados em platina estão entre os mais utilizados e eficazes desde 1970. Entre eles encontram-se a carboplatina, a cisplatina, a oxaliplatina

e a nedaplatina, agentes alquilantes que eliminam as células cancerosas através da formação de adutos nas bases de purina do DNA nuclear, interferindo no mecanismo de reparo da célula, o que eventualmente levará a morte devido ao bloqueio da replicação do DNA, da síntese do RNA e das proteínas celulares (BLAIR *et al*., 2009). No entanto, ainda não está claro qual é o mecanismo responsável pela entrada da droga na célula e posteriormente sua internalização no núcleo. Acredita-se que há uma forte correlação entre a sensibilidade da droga e seu acúmulo, pois células que possuem maior resistência à droga acumulam menos o fármaco (SONG *et al*., 2004).

A carboplatina é indicada para o tratamento de carcinoma no ovário, pulmão, colorretal, mama, cabeça, pescoço e trato genito-urinário. No entanto, a eficácia da droga à base de platina é constantemente comprometida por causa do risco substancial de toxicidade grave, podendo resultar em uma debilitação aguda ou crônica (MCWHINNEY *et al*., 2009).

A rebecamicina, um antitumoral natural, halogenado derivado da família dos indolocarbazóis, foi descoberto na década de 70 pela companhia farmacêutica *Bristol-Myers* e produzido pela primeira vez através de fermentações utilizando o microrganismo actinomicete, *Saccharothrix aerocolonigenes* (SÁNCHEZ *et al*., 2002). A rebecamicina possui um amplo espectro de atividade antitumoral *in vitro* graças a sua capacidade de inibir a ação catalítica da topoisomerase I. Esse composto atua na quebra das ligações ou através de intercalação das fitas do DNA impedindo a replicação e o reparo do material genético (BURSTEIN *et al*., 2007).

Os tecidos tumorais apresentam maior expressão das topoisomerases do que as células de metabolismo normal (KIM *et al*., 1991). As topoisomerases são enzimas nucleares que controlam e modificam o estado topológico do DNA. Assim, as topoisomerases são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas, principalmente para as que apresentam atividade anticâncer e antiviral. Nos seres humanos podem ser encontrados dois tipos principais de topoisomerases, as topoisomerases I e II (GOODWIN *et al*., 1999), sendo a isoforma I responsável por catalisar o relaxamento e a clivagem da fita simples do DNA e a isoforma II responsável pela quebra da fita dupla de DNA, levando a eventos como liberação da fita do DNA enovelado, transcrição, condensação dos cromossomos e recombinação (HANDE, 2008). Derivados de rebecamicina (análogos) estão em fase II de testes clínicos para

tratamento de diversos tipos de câncer (BURSTEIN *et al*., 2007; DOWLATI *et al*., 2005).

Nesse estudo usamos a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilidade à droga em eucariontes, tendo como objetivo encontrar novos marcadores genéticos (os ortólogos humanos) que estejam associados à resistência a carboplatina e aos análogos de rebecamicina. Após o estabelecimento desses marcadores preditivos, abre-se a possibilidade da realização de uma terapia individualizada que poderá melhorar a sobrevida, gerando resultados com potenciais implicações clínicas para o tratamento de pacientes que possuem tais genes modificados, já que a resistência à quimioterapia continua sendo um obstáculo importante no tratamento de tumores. Os dados gerados por nosso estudo podem ainda ser utilizados para melhorar a estrutura química desses compostos, tornando-os mais específicos e possivelmente com menores efeitos colaterais.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

## 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO

A utilização da *S. cerevisiae* como organismo modelo tem trazido importantes resultados para a comunidade científica, pois as informações obtidas podem ser extrapoladas para organismos eucariotos superiores pela conservação evolutiva dos genes e proteínas, bem como sua funcionalidade nos organismos. Após a publicação da sequência genômica da levedura em 1996, foi criado o *"Saccharomyces Genome Project"*, uma comunidade que organizou um esforço cooperativo para produzir um conjunto quase completo de deleções de cada quadro aberto de leitura (*Open Reading Frames*) (WINZELER *et al*., 2011; GIAEVER *et al*., 2002).

Em 1998, essa comunidade científica utilizou métodos para a introdução de mutações no genoma da levedura, para que se tornasse particularmente fácil de estudar, não só a função bioquímica dos produtos gênicos, mas também as consequências biológicas da insuficiência desses genes. Das 5800 ORFs reveladas, cerca de 1000 genes (ou seja, 17%) são membros de famílias gênicas associadas à ortólogos humanos. Para a maioria destes genes seu ortólogo de mamífero é funcional na levedura e complementa a função no mutante deletado da levedura (HEINICKE *et al*., 2007).

A supressão de um gene específico de levedura envolveu a geração de um cassete de supressão feito pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e aproveitou-se da vantagem de existir naturalmente um elevado nível de recombinação homóloga em leveduras. Entre o cassete de eliminação e a ORF foram introduzidas alterações que podem marcar o gene específico com um código molecular (*"barcode"*) que permite identificar os fenótipos da estirpes mutantes quando testadas em paralelo (*pool*). Foram introduzidos no cassete de deleção dois códigos de barras moleculares (UPTAG e DOWNTAG) com 20 pares de bases e oligonucleotideos universais que flanqueiam as sequências de iniciação e terminação, circundando o marcador de resistência a drogas (KanMX). Os cassetes de deleção foram projetados para remover toda a codificação de uma determinada ORF, deixando apenas o início e a terminação do gene intacta. Na segunda rodada de PCR foram utilizados iniciadores com 45 bases homólogas à região a

montante e a jusante da ORF alvo (figura 1) (KELLY *et al*., 2001; HO *et al*., 2011; WINZELER *et al.*, 2011).

Portanto, o objetivo do "*Saccharomyces Genome Project*" foi gerar um conjunto tão completo quanto possível de linhagens mutantes de leveduras por deleção de modo a atribuir a função às ORFs através da análise fenotípica dos mutantes com ausência do gene (GUTHRIE & FINK, 1991).

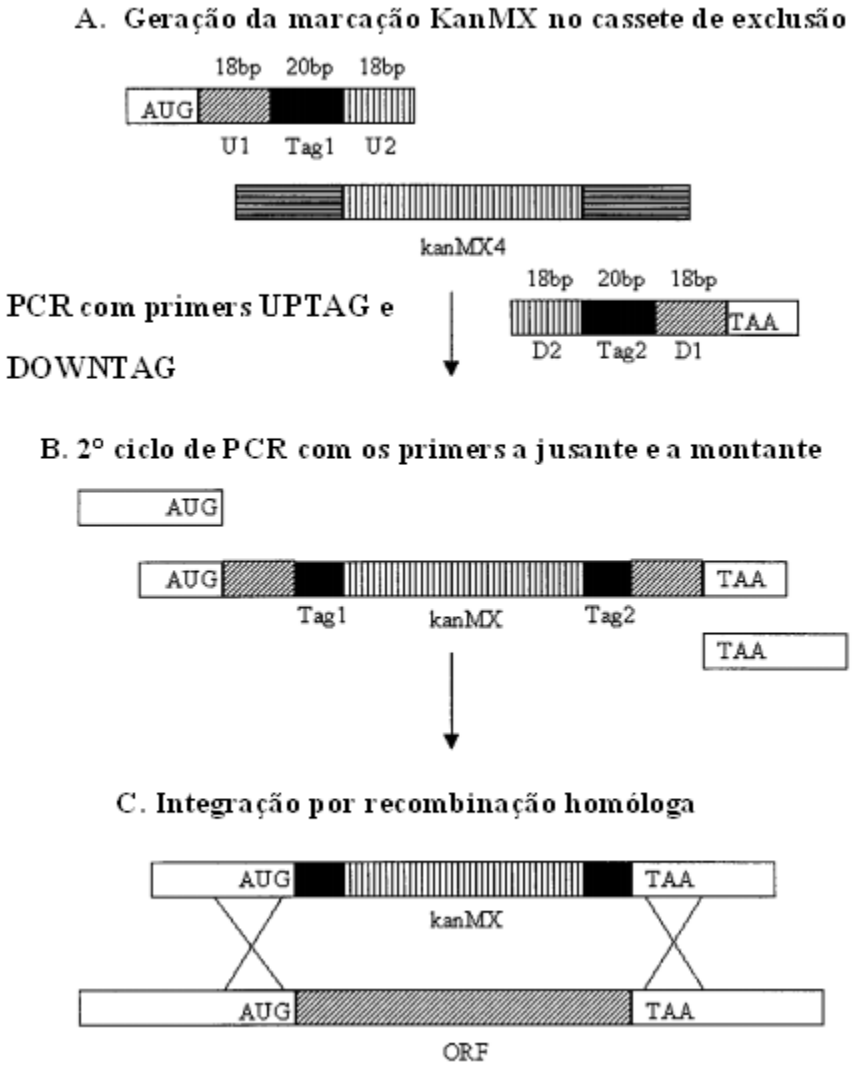



Figura 1: Estratégia de PCR para exclusão das ORFs alvo de levedura. A) Primeira rodada PCR atribui as sequências UPTAG e DOWNTAG. B) Segunda rodada PCR adiciona a sequência de 45 pares de bases homóloga ao gene alvo. C) Na sequência, transformação do módulo *KanMX* com as sequências tags recombinadas no *locus* cromossômico de gene alvo *(* Adaptado de KELLY *et al.,* 2001*).*

A comparação das sequências genômicas da levedura com as de outros organismos, incluindo o humano, levou à constatação de que tanto as sequências de aminoácidos das proteínas como suas funções têm sido conservadas. Sendo assim, anotações de funções biológicas em organismos eucariotos inferiores podem ser, freqüentemente, transferíveis de uma espécie para a outra (STRATHERN *et al*.,1981; BROACH *et al*., 1991).

*S. cerevisiae* é um modelo eucariótico estabelecido e amplamente utilizado para os estudos de biologia molecular e celular. Levedura também desempenha um papel significativo na área da biotecnologia, em que é utilizado como uma fábrica celular com diversas aplicações. Existem várias características inerentes à levedura que a tornam um modelo celular eficiente: é um microrganismo não patogênico unicelular com um crescimento rápido e de baixo custo, passível de manipulação genética. A análise de todo o genoma está implementada, com uma vasta gama de ferramentas experimentais e de material biológico facilmente disponível. Adicionalmente, possui um elevado nível de conservação funcional dentro do genoma humano e de outros eucariotos superiores, e tem a vantagem única de possuir informações funcionais disponíveis para mais de 80% dos genes (BOTSTEIN & FINK, 2011).

Hoje, é possível acompanhar a evolução dos estudos dos genes codificadores identificados pelo website "*Saccharomyces Genome Database"* (SGD<http://www.yeastgenome.org/>) usando a ferramenta "*Snapshot Genome*" (http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/genomeSnapShot.pl) que fornece informações sobre cada gene de levedura com base em estudos sistemáticos de cada um deles, mesmo os de função ainda desconhecida. Por esta ferramenta, até a última verificação, viam-se os dados mostrados na figura 2 em relação às ORFs identificadas.

Desde 1996, a fração dos cerca de 5800 genes codificadores de *Saccharomyces* que evoluiram de um entendimento rudimentar de seu papel biológico para função conhecida passou de ~ 30% para ~ 85%. Esta fração é muito maior para a levedura do que para qualquer outro eucarioto descrito (BOTSTEIN & FINK, 2011).

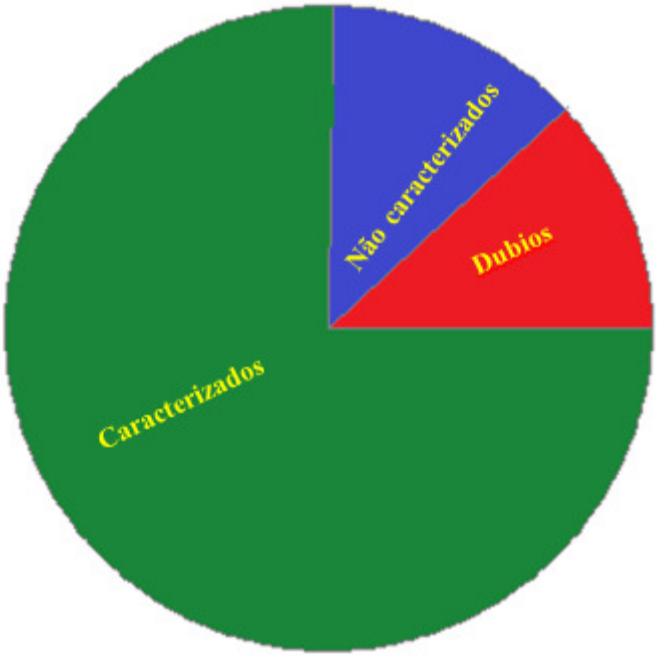



Figura 2: Porcentagem das ORFs já verificadas até o dia 07 de setembro de 2013. Classificados por ORFs: 76,65% foram verificados, 11,91% não são caracterizados e 11,44% têm funções incertas por falta de dados ou por estarem em processo de verificação (Fonte: <http://www.yeastgenome.org/cache/genomeSnapshot.html>).

## 2.2. CARBOPLATINA

### 2.2.1. Histórico

A carboplatina é um derivado da cisplatina, e possui um mecanismo de ação semelhante, diferindo apenas na estrutura e toxicidade. A atividade anticancerígena da cisplatina foi descoberta no inicio dos anos 60 pelo professor Barnett Rosenberg, da Universidade do Estado de Michigan (<http://onthebanks.msu.edu/Exhibit/1-6-8/barnett-rosenberg/>). Ele estava interessado em estudar os efeitos de campos elétricos sobre o crescimento bacteriano estabelecendo seu envolvimento no processo de divisão celular. Observou então que ao aplicar um campo elétrico em um conjunto de eletrodos de platina, imersos em uma solução contendo *Escherichia coli*, as bactérias não se dividiam normalmente, mas adquiriam um crescimento filamentoso de até 300 vezes acima do normal. Este efeito demonstrou não ter relação com o campo elétrico, mas sim com os produtos da eletrólise dos eletrodos de platina. Posterior análise química

detalhada identificou vários complexos de platina que induziam esse comportamento, e que enquanto o complexo bivalente *cis*-[Pt ($NH_3$)2 $Cl_2$] era ativo seu isômero *trans* era bem menos ativos (Figura 3) (ROSENBERG *et al*., 1965).

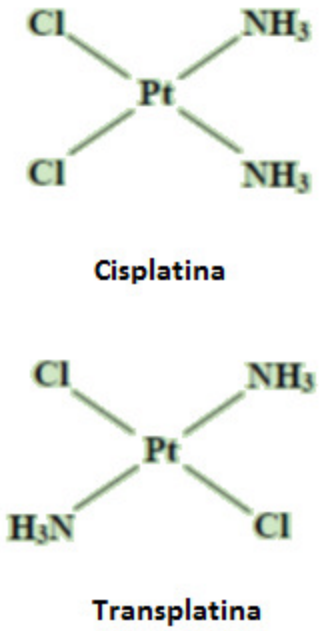



Figura 3: Estrura química da Cisplatina e Transplatina (Adaptado de GALEA & MURRAY, 2008).

Após os testes com bactérias, Rosenberg passou a trabalhar com a possibilidade de utilizar a cisplatina no tratamento de câncer devido a sua capacidade antiproliferativa. Os testes iniciais foram feitos com camundongos contaminados com tumores malignos do tipo Sarcoma 180. Após a aplicação de quantidades adequadas de cisplatina, verificou-se que a droga era um eficiente agente antitumoral; porém, em doses elevadas foi constatado que a cisplatina produzia efeitos colaterais como lesões nos rins, mal-estar, tontura, náuseas e vômito (CAROZZI *et al*., 2008). Em 1971, pacientes terminais foram submetidos ao tratamento com cisplatina e o resultado foi, mais uma vez, surpreendente. A cisplatina se mostrou muito eficiente em 28 diferentes tipos de tumores e cerca de 50% das pessoas foram praticamente curadas. Em 1978, a cisplatina foi aprovada como agente anticâncer pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos e liberada para uso médico no tratamento de

tumores de testículos, ovário, endométrio, pescoço, cabeça, bexiga, pulmões, linfomas, mama, esôfago, estômago e leucemia (FONTES *et al*., 2005).

Depois do trabalho pioneiro de Rosenberg, um número enorme de complexos metálicos, principalmente de platina, foi estudado. Até 1979, 1055 compostos de platina foram testados, dos quais 185 apresentaram atividade. Uma série de pesquisas foi desencadeada mundialmente e mais de 3000 compostos análogos já foram sintetizados; alguns desses novos compostos se mostraram menos tóxicos do que a cisplatina, sendo que somente três outros compostos foram aprovados para comercialização: a carboplatina, a oxaliplatina e a nedaplatina (Figura 4) (MCWHINNEY, *et al*., 2009).

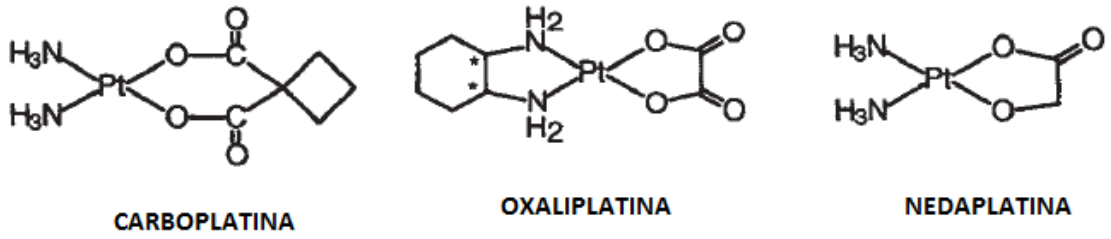



Figura 4: Estrura química da Carboplatina, Oxaliplatina e Nedaplatina (Adaptado de Wozniak & Blasiak, 2002).

A carboplatina é formada através da substituição do grupo cloreto da cisplatina por um ligante 1,1ciclobutanodicarboxilato, o que aumenta a estabilidade dos grupos de saída. Carboplatina tem maior estabilidade química em comparação com a cisplatina e, portanto, é menos reativa com o DNA, mas também menos tóxica do que a cisplatina. Em uma base molar, a carboplatina é 45 vezes menos citotóxica do que a cisplatina. Para ser ativada, a carboplatina precisa atravessar a membrana celular e uma vez dentro da célula, a molécula sofre hidrólise do grupo 1,1ciclobutanodicarboxilato, dando origem à forma ativa que pode ligar-se a ácidos nucleicos ou proteínas (figura 5). Esse processo se dá através de ligação covalente ao sítio N7 de bases purinicas, semelhante ao da cisplatina, formando interações do tipo DNA-proteínas ou do tipo DNA-DNA (EASTMAN, 1987; AMPTOULACH & TSAVARIS, 2011; RUGGIERO *et al*., 2013).

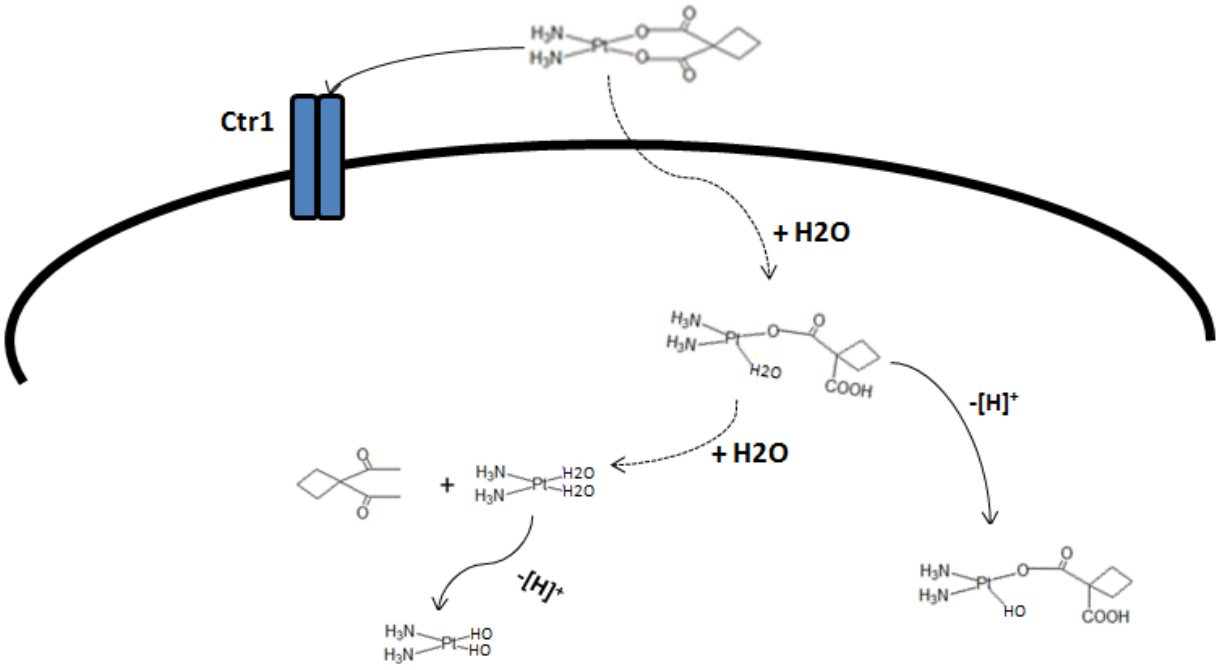



Figura 5: Hidrólise intracelular da carboplatina.

As ligações entre o DNA e a cisplatina/carboplatina podem produzir lesões no DNA, sendo as ligações cruzadas interfitas (*InterStrand Cross-link* – ISC) as mais citotóxicas, pois a alquilação de um único filamento de DNA pode ser reparado facilmente, mas as ligações cruzadas interfitas, como as produzidas por agentes alquilantes bifuncionais, exigem mecanismos mais complexos de reparo. ISC pode inibir o processo de replicação do DNA, provocando alterações que geram erros na replicação, com acúmulo das células na fase $G_2$/M e indução da apoptose (Figura 6) (SHI *et al*., 1994).

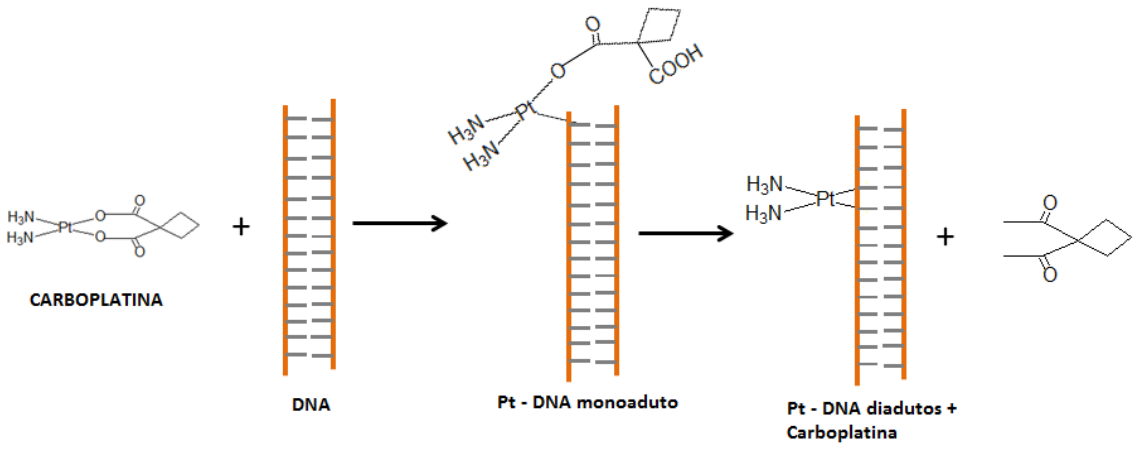



Figura 6: Representação esquemática de uma cadeia de DNA mostrando os locais disponíveis para a ligação de derivados de platina.

Graças à presença do grupo 1,1ciclobutanodicarboxilato, a carboplatina possui uma reação mais lenta com os mecanismos de detoxificação celular glutationa (GSH) e a metalotioneína (MT) em comparação com a cisplatina. Isso sugere que a carboplatina depois de internalizada na célula, tende a ter uma concentração mais elevada no núcleo do que a cisplatina (Figura 7) (KELLAND, 2007; ALDERDEN *et al*., 2006).

Glutationa-S-transferases (GSTs) são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de glutationa com uma variedade de compostos eletrofílicos, incluindo a carboplatina, estando assim envolvidas em sua detoxificação. Estas enzimas também desempenham um papel importante na limpeza de radicais livres devido à sua atividade glutationa peroxidase dependente em lipoperóxidos (LANGER *et al*., 2013).

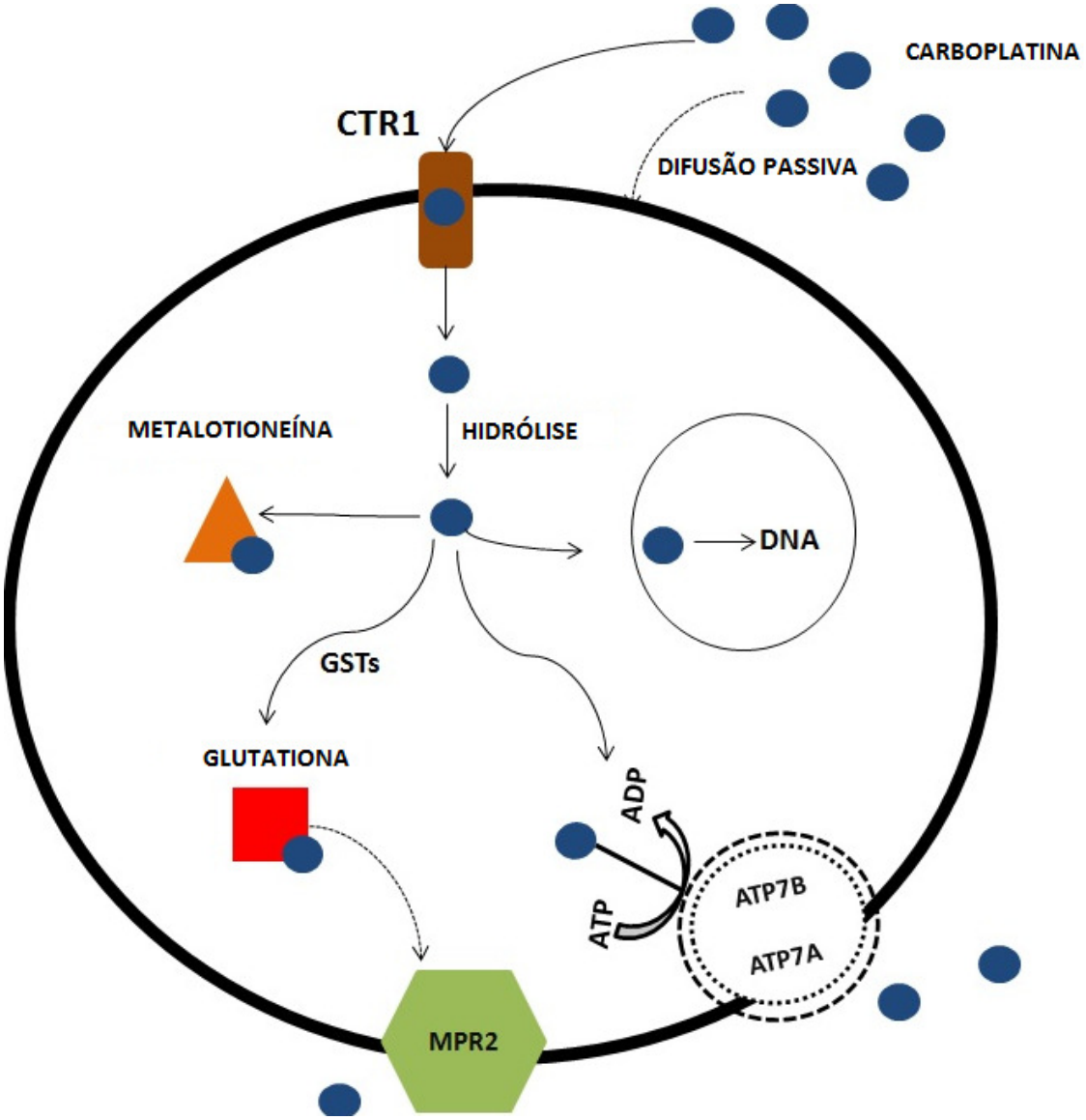



Figura 7: Mecanismo de ação da carboplatina dentro da célula.

Na célula, o reconhecimento do dano causado por platina ocorre através do mecanismo de reparo. Portanto, determinar onde estão localizadas as ligações de platina no DNA dentro do nucleossomo (unidade fundamental da cromatina) é um passo importante na compreensão do processo de reconhecimento celular. Uma questão essencial é se o aduto de platina ou a sequência de DNA que determina a configuração da rotação de um segmento de DNA em nucleossomos e, por conseguinte, como a lesão de platina é apresentada à maquinaria de replicação, de transcrição e de reparo da célula (DANFORD *et al*., 2005).

## 2.3. REBECAMICINA

Rebecamicina é um antitumoral natural isolado de actinomicete *Lechevalieria aerecolonigenes* e pertecente a classe de indolocarbazóis alcalóides. Foi relatado pela primeira vez em 1985 a partir de cultura de *Nocardia aerocolonigenes* e foi nomeado em homenagem a filha do cientista que isolou o composto. Seu mecanismo de ação se dá através intercalação no DNA inibindo a topoisomerase I que têm a função de estabilizar as ligações covalentes de DNA, resultando em um aumento das rupturas dos filamentos de DNA (SÁNCHEZ *et al*., 2006).

As topoisomerases são uma classe de enzimas que alteram a topologia do DNA e são alvos de várias drogas antitumorais. Há duas classes gerais de topoisomerases, tipo I e tipo II. Ambos os tipos de topoisomerases estão presentes na maioria dos organismos e são responsáveis por resolver problemas topológicos que acompanham a replicação do DNA, a transcrição, a montagem da cromatina, a recombinação e a segregação cromossômica. Portanto, são consideradas enzimas de grande importância nos eventos de proliferação celular. Devido a essa atividade antitumoral promissora, estudos foram implementados para obter uma série de análogos com propriedades melhoradas da rebecamicina (NISHIZAWA *et al*., 2004; STEWART *et al*., 1998; RASHEED & RUBIN, 2003).

Os indolocarbazóis exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e propriedades neuroprotetoras, mas seu maior interesse é baseado em suas propriedades antitumorais, e grandes esforços são feitos para gerar derivados de indolocarbazóis com propriedades melhoradas para o tratamento de câncer. Ao considerar o modo de ação, os indolocarbazóis podem ser subdivididos em dois subgrupos diferentes. O primeiro subgrupo é representado por rebecamicina e o segundo é representado por estaurosporina e a UCN-01, que incluem potentes inibidores de proteínas quinases em especial a quinase C (Figura 8). Alguns análogos de rebecamicina também apresentam efeito inibitório sobre algumas quinases (embora seja bem inferior ao apresentado pela estaurosporina e a UCN-01), incluindo a Proteína quinase serina/treonina (Chk1) (MARMINON *et al.,* 2008). Isto sugere que as diferenças estruturais entre estes dois indolocarbazóis são essenciais para a seletividade do alvo (SALAS & MÉNDEZ, 2009).

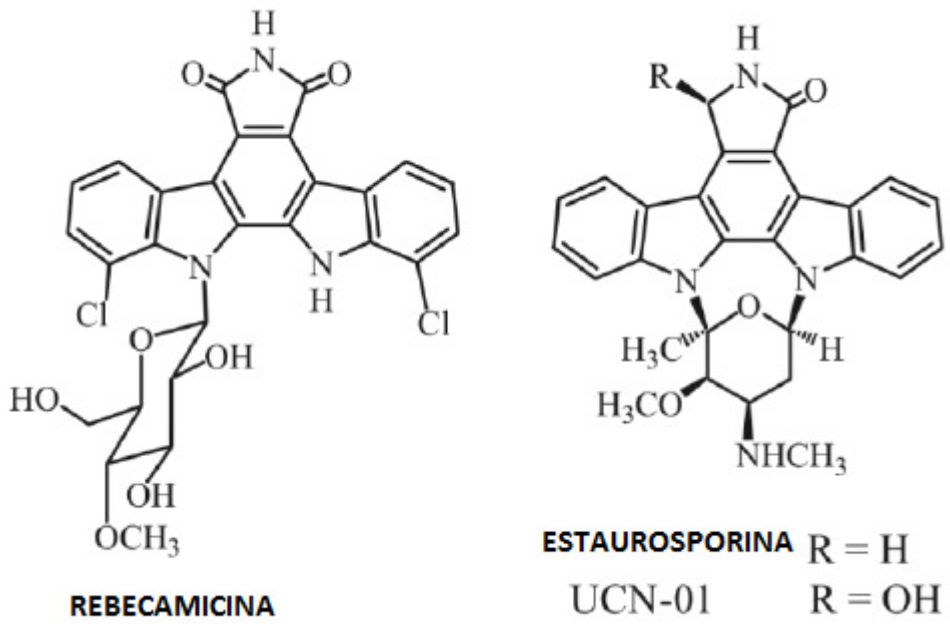



Figura 8: Estrutura química da rebecamicina,e estaurosporina e UCN-01 (Adaptado de Sánchez *et al*., 2006).

Pouco se sabe ainda sobre as propriedades químicas e estruturais que são cruciais para as atividades dos indolocarbazóis e para a interação com seus alvos. Porém, os estudos envolvendo diversos análogos de rebecamicina sugerem que os átomos de cloro são essenciais para a interação com o DNA, e a ligação β-glicosídica do carboidrato é um elemento chave para a atividade inibitória da topoisomerase I (BAILLY *et al*., 1999). Além disso, já foi descrito que a interação e consequente inibição de Chk1 por estaurosporina e UCN-01 ocorrem no sítio de ligação ao ATP dessa proteína (ZHAO *et al*., 2002).

Drogas genotóxicas, ou seja, que danificam o DNA, geram uma problemática no tratamento de câncer, pois apesar do benefício clínico, existe a necessidade de melhoria da especificidade para não afetar as atividades das enzimas que protegem as células não cancerosas de danos ao DNA. A inibição da Chk1, uma proteína fundamental no *checkpoint* entre as fases $G_2$ 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). Sem essa verificação, mutações no DNA podem ser replicadas, contribuindo para a

proliferação do tumor. Células cancerosas (bem como organismos unicelulares) apresentam um maior "rigor" nesse *checkpoint* do que aquele entre as fases $G_1$ e S dependente da proteína p53, ausente ou mutada na maior parte das células tumorais (MARMINON *et al*., 2008). Na ausência da via funcional de p53, que têm papel significativo na sobrevivência e proliferação de células, as células tumorais humanas respondem através de sinalização pelos *checkpoint* 1 e 2 (ZHOU *et al*., 2004). Modelos baseados em culturas de células humanas mostram que as células cancerosas são mais sensíveis a agentes genotóxicos, quando co-incubadas com inibidores de Chk1 (TAO *et al.*, 2009; TSE *et al.*, 2007; ZABLUDOFF *et al*., 2008).

Contudo, análises moleculares que envolvam expressão gênica e mecanismos de ação, 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).

## 3. JUSTIFICATIVA

Apesar de inovações crescentes no mercado farmacêutico, a resistência tumoral ainda é uma problemática constante. As drogas anticancerígenas têm seu potencial terapêutico limitado no tratamento de pacientes com câncer, causando manifestações de resistência e toxicidade. Portanto, compreender o mecanismo de resistência a essas drogas é fundamental para o desenvolvimento de novas terapêuticas, conduzindo a melhores resultados clínicos.

Apesar da carboplatina ser usada desde 1970, os mecanismos de atuação e resistência a essa droga ainda estão pouco caracterizados. Jinawath *et al*. (2010) identificaram através de análise proteômica NF-kB e STAT5 (fatores transcricionais) como duas principais proteínas associadas à resistência a carboplatina em tumores do ovário. Esse grupo sugere a possível atuação dos inibidores de NF-kB e STAT5 na sensibilização das células resistentes a carboplatina, sugerindo que esses inibidores podem ser usados para beneficiar os pacientes com recorrência de câncer de ovário que são resistentes a carboplatina.

Proteínas de membrana da família CTR medeiam à captação de cobre em todas as células eucarióticas e têm demonstrado participação na captação de drogas anticancerígenas à base de platina (DE FEO *et al*., 2010). Ishida *et al*. (2002) demonstrou que a deleção do gene da levedura *CTR1*, que codifica o transportador de alta afinidade pelo cobre, resulta em um aumento da resistência à cisplatina e acumulação intracelular da droga.

Matei *et al*. (2012) destacou que doenças malignas como o câncer de ovário pode ter sua progressão associada ao acúmulo aberrante de metilação do promotor de genes, levando ao silenciamento transcricional dos genes supressores tumorais, o que levará o paciente a resistência à quimioterapia.

A proteína de reparo por excisão de DNA ERCC1 é uma das enzimas chaves na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), e está envolvida no reconhecimento de danos causados no DNA. Estudos clínicos mostraram que a expressão de ERCC1 é negativamente correlacionada com a eficiência de derivados de platina. Deste modo, os níveis baixos de expressão de ERCC1 pode prever a

sensibilidade aumentada no tratamento e melhores resultados clínicos (ZHANG *et al*., 2012).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido um dos principais organismos utilizado como sistema modelo para identificar novos mecanismos de resistência a cisplatina (SCHENK *et al*., 2003). Em uma demonstração de como os resultados obtidos no modelo de levedura pode ser estendido para as células humanas, Schenk *et al.* (2001) identificaram *SKY1* como um gene de sensibilidade à cisplatina cuja perturbação conferiu resistência à cisplatina em levedura; em trabalho posterior usando linhagens celulares de carcinoma de ovário humanos demonstraram que a inativação do seu homólogo humano SRPK1 induziu a resistência à cisplatina.

Assim, através do uso de uma coleção de mutantes de leveduras (que permitiu a avaliação de mais de 5000 genes) caracterizamos possíveis alvos moleculares que interferem com a ação, captação e metabolismo intracelular das drogas carboplatina e análogos de rebecamicina. Para esta última, nossos estudos são ainda mais relevantes na caracterização dos mecanismos moleculares antitumorais desses compostos, pois trata-se de uma droga ainda em teste clínico (fase II) e poucos estudos foram realizados nesse sentido.

# 4. OBJETIVO

## 4.1. GERAL

Este trabalho teve como objetivo identificar os marcadores genéticos presentes na levedura *S. cerevisiae* (organismo modelo) associados à resistência aos medicamentos antitumorais carboplatina e análogos de Rebecamicina.

## 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a dosagem letal dos antitumorais para a linhagem selvagem da levedura;
- Analisar o crescimento das leveduras mutantes em doses crescentes de carboplatina e análogos da Rebecamicina;
- Realizar a identificação e a caracterização molecular dos genes envolvidos;
- Procurar ortólogos humanos dos genes identificados como responsáveis pela resistência em leveduras.

# 5. MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1. LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA

Para nossos trabalhos, usamos a linhagem BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*), além da coleção *Knock-out* (YKO) *deletion collection* (Invitrogen), que contém clones isogênicos de leveduras mutantes para genes não-essenciais, 5180 clones, divididos em 54 placas com 96 clones cada.

- Meio YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura, adicionado de 2% ágar, no caso de 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).

## 5.2. FONTE DE CARBOPLATINA E ANÁLOGOS DE REBECAMICINA

A carboplatina foi adquirida da empresa Sigma (C2538). Os análogos de rebecamicina (figura 9) foram sintetizados no laboratório do Prof. Dr. Carlos Roque do IQ-UNICAMP pela Dra Roberta Lopes Drekener.

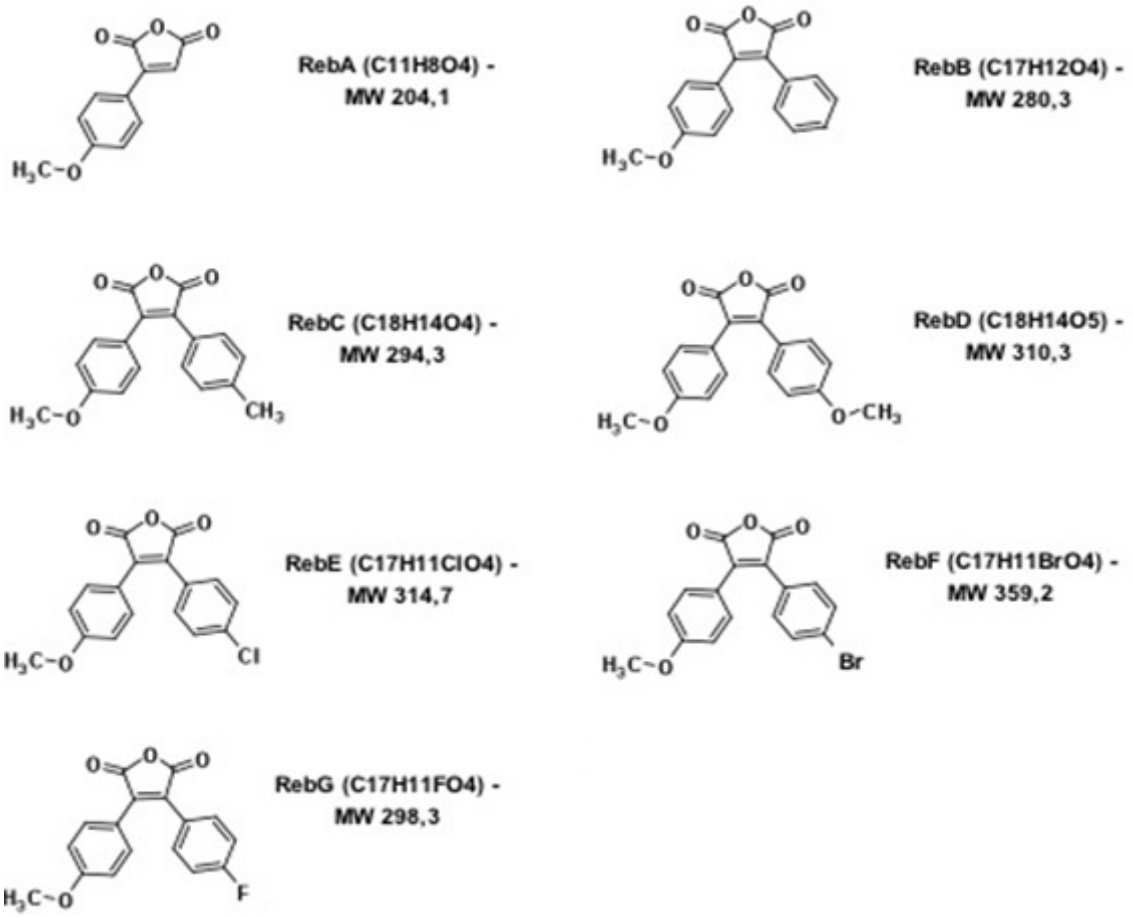



Figura 9: Análogos de rebecamicina sintetizados no laboratório do Prof. Dr. Carlos Roque do IQ-UNICAMP.

## 5.3. ADMINISTRAÇÃO DE CARBOPLATINA E ANÁLOGOS DE REBECAMICINA

A carboplatina foi preparada em estoques a 20 mM em água estéril (para ensaios com concentração de 10mM). Os estoques dos análogos de rebecamicina foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de 0,2mM, 2mM, 20mM, 30mM ou 100mM. Nos ensaios, a concentração final de DMSO foi de 0,3% ou 5%, dependendo do experimento (indicados nas respectivas legendas).

Após pré-inóculo a 30°C em meio YPD líquido (48h nos ensaios apenas com a linhagem selvagem BY4741 ou 72h em meio contendo geneticina (G418) 200µg/ml nos ensaios que incluíam mutantes da coleção YKO, todos sob agitação constante a 160rpm), as células foram diluídas para $OD_{600nm}$ = 0,2 ou 0,0625 (indicado nas legendas) em placas de 96 poços em meio de cultivo contendo os compostos químicos

de interesse e incubadas (30°C, 160rpm) por diferentes tempos. Em seguida, aproximadamente 5µl de cultura foram transferidos para meio sólido (YPD) e incubados a 30 °C por dois dias.

## 5.4. TESTE DE VIABILIDADE POR DILUIÇÃO SERIADA.

Foram retiradas alíquotas dos pré-inóculos crescidos por 18h (testes com os análogos de rebecamicina) e 48h (teste dos clones sensíveis ao análogo Reb C) em meio líquido SD a 30ºC, sob agitação em shaker a 160 rpm. Após esse tempo foi feita a leitura das densidades de células em $OD_{600nm}$ e realizada diluição dos inóculos para $OD_{600nm}$ 0,2 (testes com os análogos de rebecamicina) e $OD_{600nm}$ 0,0625 (teste dos clones sensíveis ao análogo Reb C). Os inóculos diluídos foram tratados com diferentes concentrações dos análogos de rebecamicina e o controle continha a solução de diluição (DMSO 3%). Após tratamento foram realizadas 4 diluições seriadas de 5 vezes em placa de 96 poços (figura 10) e plaqueamento de 5µl de cada diluição em placa de meio sólido YPD, incubada por 48h, 30°C em estufa.

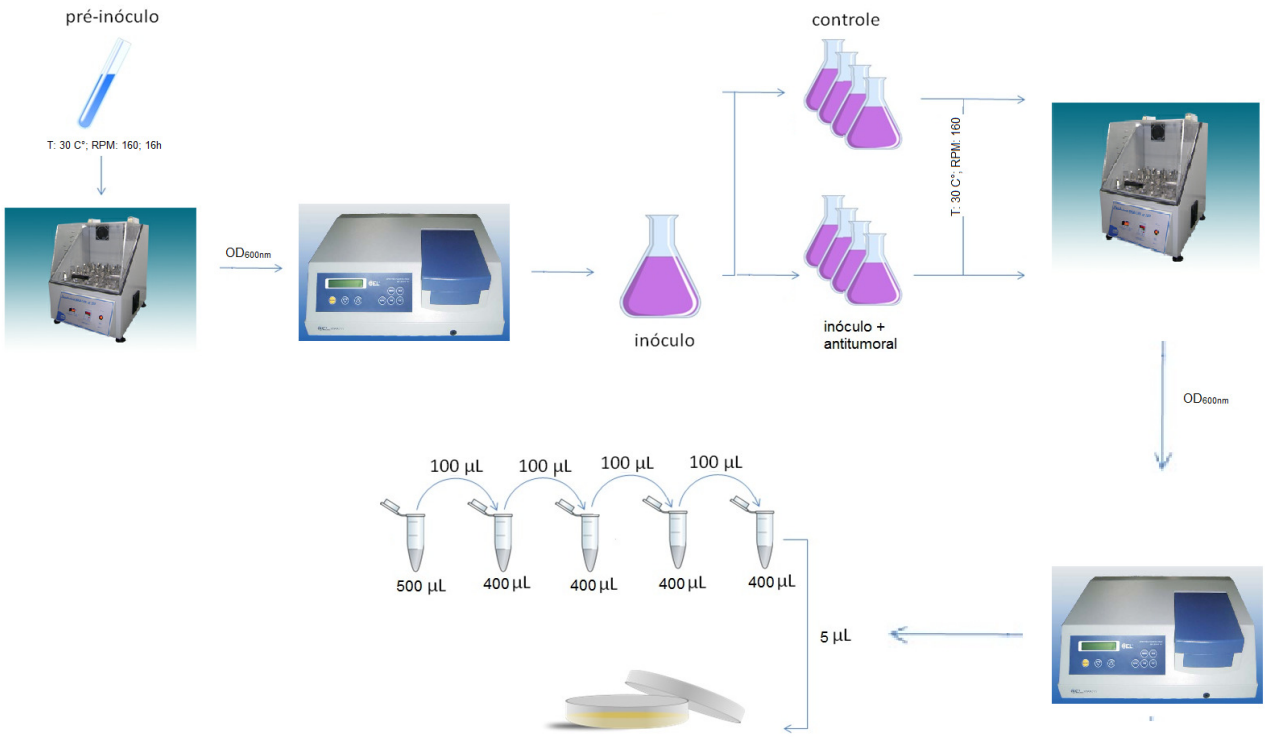



Figura 10: Teste de viabilidade por diluição seriada.

A junção entre $OD_{600nm}$ e viabilidade por diluição seriada nos permite identificar a de forma mais completa o efeito dos compostos sobre as células, já que através da leitura de $OD_{600nm}$ podemos analisar a cinética de crescimento celular, ou seja, podemos estimar a inibição da taxa proliferativa; porém essa análise não diferencia as células mortas das células vivas, tornando-se assim importante a implementação da diluição seriada, que permite avaliar a viabilidade celular, e assim constatar se os compostos apenas diminuem a taxa de crescimento ou matam as células.

## 5.5. FERRAMENTAS UTILIZADAS PARA A BUSCA DAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS, MAPA DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS, ANOTAÇÃO DO PROCESSO BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE GENES DE LEVEDURA.

### 5.5.1 Blast e Homologene

Foi realizada uma busca das sequências homólogas para os genes identificados em *S. cerevisiae* tanto relacionados à resistência quanto à sensibilidade de maneira individual com o "software" BLAST proteína-proteína (blastp). Esse é utilizado tanto para a identificação de uma sequência de aminoácidos como para descobrir sequências semelhantes em bases de dados de proteínas. Como outros programas BLAST, blastp é projetado para encontrar regiões locais de semelhança. Quando a semelhança de sequência abrange toda a sequência, blastp também irá reportar um alinhamento global, que é o resultado de preferência para fins de identificação de proteínas. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, é uma ferramenta computacional de referência para a busca de similaridade em bancos de dados de sequências e por consequência extensivamente utilizada na anotação genômica. Dentro deste, há a ferramenta HomoloGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene que é um sistema de detecção automática de homólogos entre os genes anotados de vários genomas eucarióticos incluindo o humano, utilizando o banco de dados do SGD.

### 5.5.2 Genemania

Ferramenta de bioinformática GeneMANIA (http://www.genemania.org/), contém mapas de interação de proteínas que são criados com base em artigos já publicados.

### 5.5.3 SGD gene ontology slim mapper

De forma a compreender e relacionar os genes identificados, recorreu-se à ferramenta computacional *SGD Gene Ontology Slim Mapper* para agrupar as proteínas de acordo com a sua classificação na nomenclatura GO (*Gene Ontology*), o processo biológico em que estão envolvidas (*Yeast GOSlim: Process*) e a sua localização sub-celular (*Yeast GO-Slim: Component*).

## 5.6. SELEÇÃO DOS MUTANTES SENSÍVEIS À CARBOPLATINA

Em 2008, Maureen E. Hillenmeyer *et al*. publicaram um estudo usando análises de *fitness* das leveduras em ensaios de competição de *pools* da coleção YKO. Nesses estudos, foram realizados 1.144 ensaios diferentes de toxicogenômica, dentre os quais foi testada a carboplatina. Os autores depositaram os dados completos no site http://chemogenomics.med.utoronto.ca/fitdb/fitdb.cgi. Assim, nessa página utilizamos a ferramenta busca rápida por carboplatina e realizamos o download dos dados obtidos para a coleção de homozigotos (heterozigoto não avaliado) ao clicar em "*more*". Selecionamos os mutantes que de acordo com esse estudo apresentaram maior defeito de *fitness* com a menor dose de carboplatina testada (250 µM), usando como critério o $P_{value} < 0.01$, considerado pelos autores estatisticamente significante.

Após seleção inicial dos clones da coleção YKO (reorganizados de acordo com a tabela 2 e figura 11) realizamos testes de viabilidade na presença de 10mM de carboplatina em placa de 96 poços contendo meio mínimo líquido SD durante 24 horas de tratamento.

Tabela 1: Ordem dos mutantes selecionados para análise de viabilidade na presença de carboplatina. Abaixo uma representação da organização dos mesmos na placa de 96 poços.

| | **ORF** | **Gene** |
|---|---|---|
| 1 | YAR023C | *YAR023C* |
| 2 | YAR042W | *SWH1* |
| 3 | YAR028W | *YAR028W* |
| 4 | YOR030W | *DFG16* |
| 5 | YOR089C | *VPS21* |
| 6 | YOR339C | *UBC11* |
| 7 | YPL241C | *CIN2* |
| 8 | YOL070C | *NBA1* |
| 9 | YPL181W | *CTI6* |
| 10 | YPL196W | *OXR1* |
| 11 | YDR375C | *BCS1* |
| 12 | YPR021C | *AGC1* |
| 13 | YDR386W | *MUS81* |
| 14 | YER007C-A | *TMA20* |
| 15 | YER041W | *YEN1* |
| 16 | YHL027W | *RIM101* |
| 17 | YHR133C | *NSG1* |
| 18 | YKL002W | *DID4* |
| 19 | YKL110C | *KTI12* |
| 20 | YJL190C | *RPS22A* |
| 21 | YJL159W | *HSP150* |
| 22 | YJL198W | *PHO90* |
| 23 | YLR232W | *YLR232W* |
| 24 | YDR230W | *YDR230W* |
| 25 | YGL208W | *SIP2* |
| 26 | YPR193C | *HPA2* |
| 27 | YFR038W | *IRC5* |
| 28 | YPR192W | *AQY1* |
| 29 | YBL051C | *PIN4* |
| 30 | YBL052C | *SAS3* |
| 31 | YBL053W | *YBL053W* |
| 32 | YBL054W | *TOD6* |
| 33 | YBL055C | *YBL055C* |
| 34 | YIL046W | *SNL1* |
| 35 | YIL024C | *YIL024C* |
| 36 | YIL071C | *PCI8* |
| 37 | YIL055C | *YIL055C* |
| 38 | YKR073C | *YKR073C* |
| 39 | YMR062C | *ECM40* |
| 40 | YOL108C | *INO4* |
| 41 | YER088C | *DOT6* |

| | | |
|---|---|---|
| 42 | YLR038C | *COX12* |
| 43 | YPR020W | *ATP20* |
| 44 | YMR121C | *RPL15B* |
| 45 | YNR060W | *FRE4* |
| 46 | YCR068W | *ATG15* |
| 47 | YBR061C | *TRM7* |
| 48 | YMR048W | *CSM3* |
| 49 | YLR390W-A | *CCW14* |
| 50 | YPR022C | *YPR022C* |
| 51 | YPR023C | *EAF3* |
| 52 | YDL091C | *UBX3* |
| 53 | YDR494W | *RSM28* |

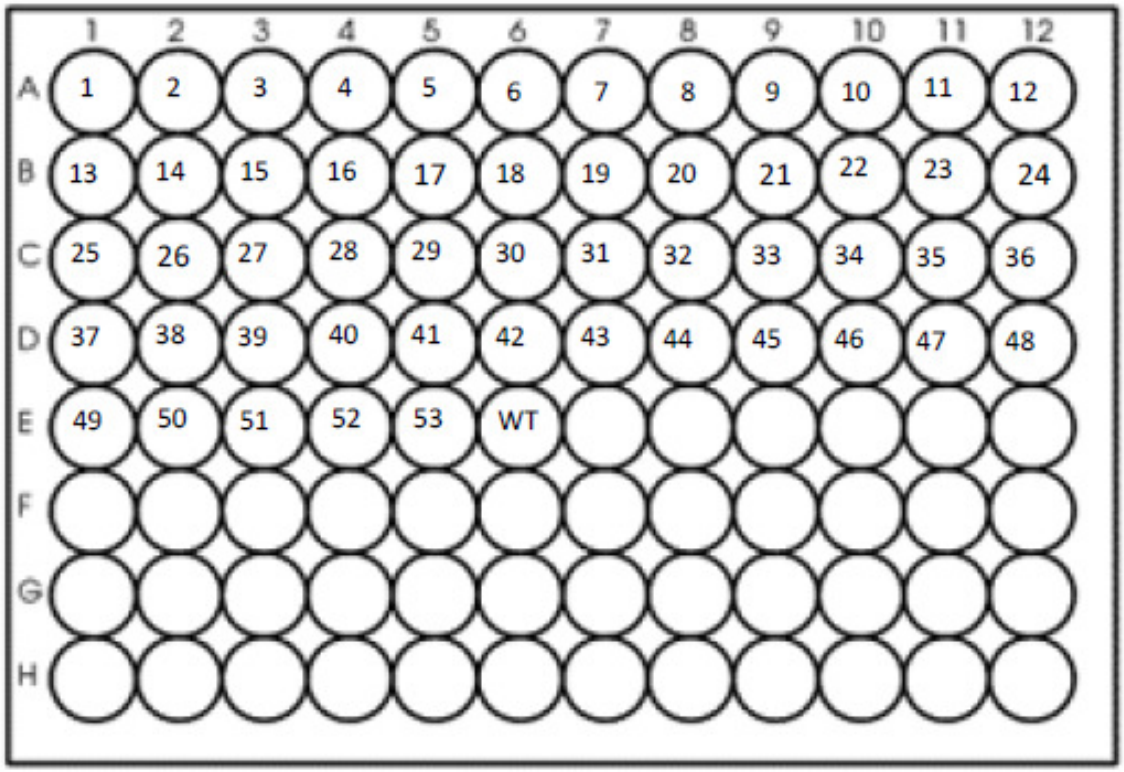



Figura 11: Montagem da placa de 96 poços de acordo com a organização da tabela 2.

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA A CARBOPLATINA DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS

A tabela 2 apresenta a seleção dos 53 clones afetados pela carboplatina a 250 µM selecionados do trabalho de Hillenmeyer *et al.* (2008).

Tabela 2: Mutantes de ORFs selecionadas do trabalho de Hillenmeyer *et al*. (2008) que apresentaram maior defeito na taxa de crescimento na presença de 250 µM de carboplatina.

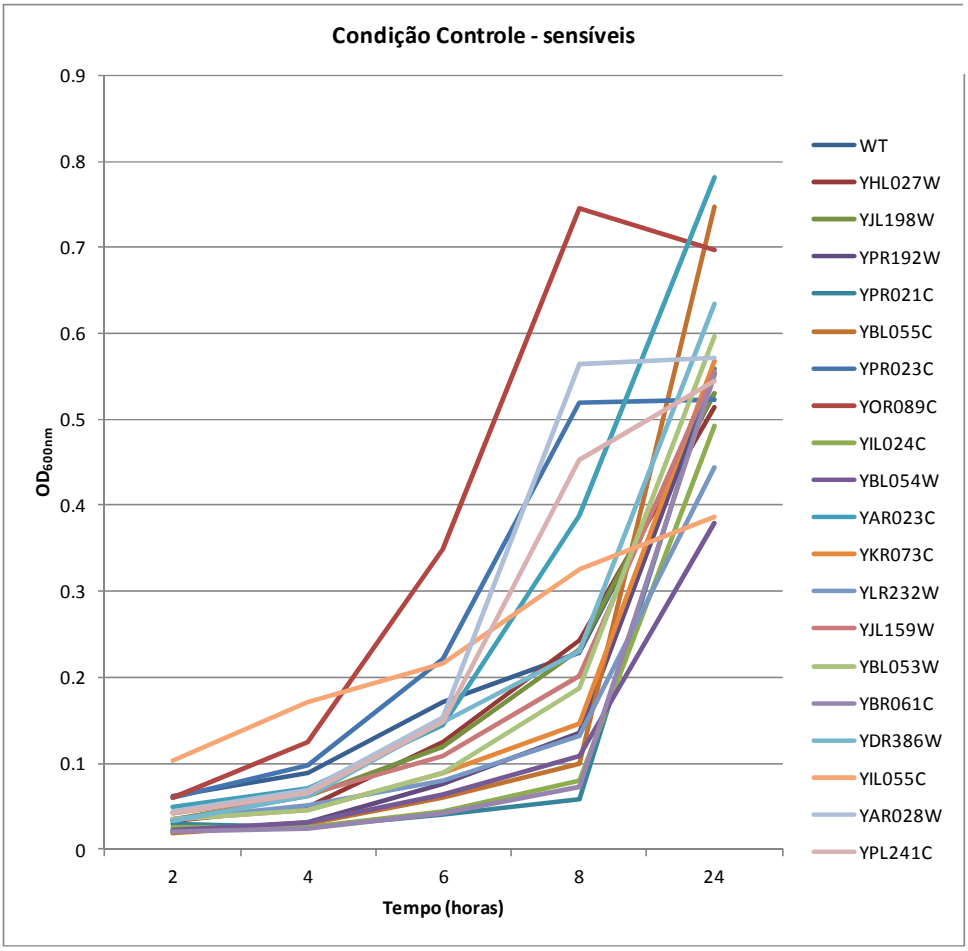
| | ORF | Gene | FITNESS DEFECT | P VALUE |
|---|---|---|---|---|
| 1 | YBL054W | TOD6 | 14,1968 | *3,89E-16* |
| 2 | YBL053W | YBL053W | 10,9289 | *5,72E-13* |
| 3 | YBL052C | SAS3 | 7,99878 | *1,27E-09* |
| 4 | YBL055C | YBL055C | 5,44563 | *2,26E-06* |
| 5 | YFR038W | IRC5 | 5,38363 | *2,73E-06* |
| 6 | YIL046W | SNL1 | 5,12372 | *5,94E-06* |
| 7 | YPR020W | ATP20 | 5,05952 | *7,19E-06* |
| 8 | YIL071C | PCI8 | 4,52183 | *3,55E-05* |
| 9 | YPL181W | CTI6 | 4,41264 | *4,89E-05* |
| 10 | YGL208W | SIP2 | 4,24793 | *7,91E-05* |
| 11 | YER007C-A | TMA20 | 4,1195 | *0,000115* |
| 12 | YIL055C | YIL055C | 3,71919 | *0,000359* |
| 13 | YKL002W | DID4 | 3,66735 | *0,000415* |
| 14 | YBR061C | TRM7 | 3,62069 | *0,000473* |
| 15 | YAR023C | YAR023C | 3,49282 | *0,000674* |
| 16 | YPR193C | HPA2 | 3,45312 | *0,000751* |
| 17 | YBL051C | PIN4 | 3,38958 | *0,000893* |
| 18 | YJL159W | HSP150 | 3,33743 | *0,001029* |
| 19 | YJL190C | RPS22A | 3,28104 | *0,001198* |
| 20 | YHL027W | RIM101 | 3,25045 | *0,0013* |
| 21 | YDL091C | UBX3 | 3,18892 | *0,001531* |
| 22 | YNR060W | FRE4 | 3,17129 | *0,001605* |
| 23 | YMR121C | RPL15B | 3,10372 | *0,001918* |
| 24 | YOL108C | INO4 | 3,06753 | *0,002108* |
| 25 | YPR023C | EAF3 | 3,06479 | *0,002123* |
| 26 | YOR030W | DFG16 | 3,0305 | *0,002322* |
| 27 | YKL110C | KTI12 | 3,01406 | *0,002423* |
| 28 | YDR230W | YDR230W | 2,94407 | *0,002902* |

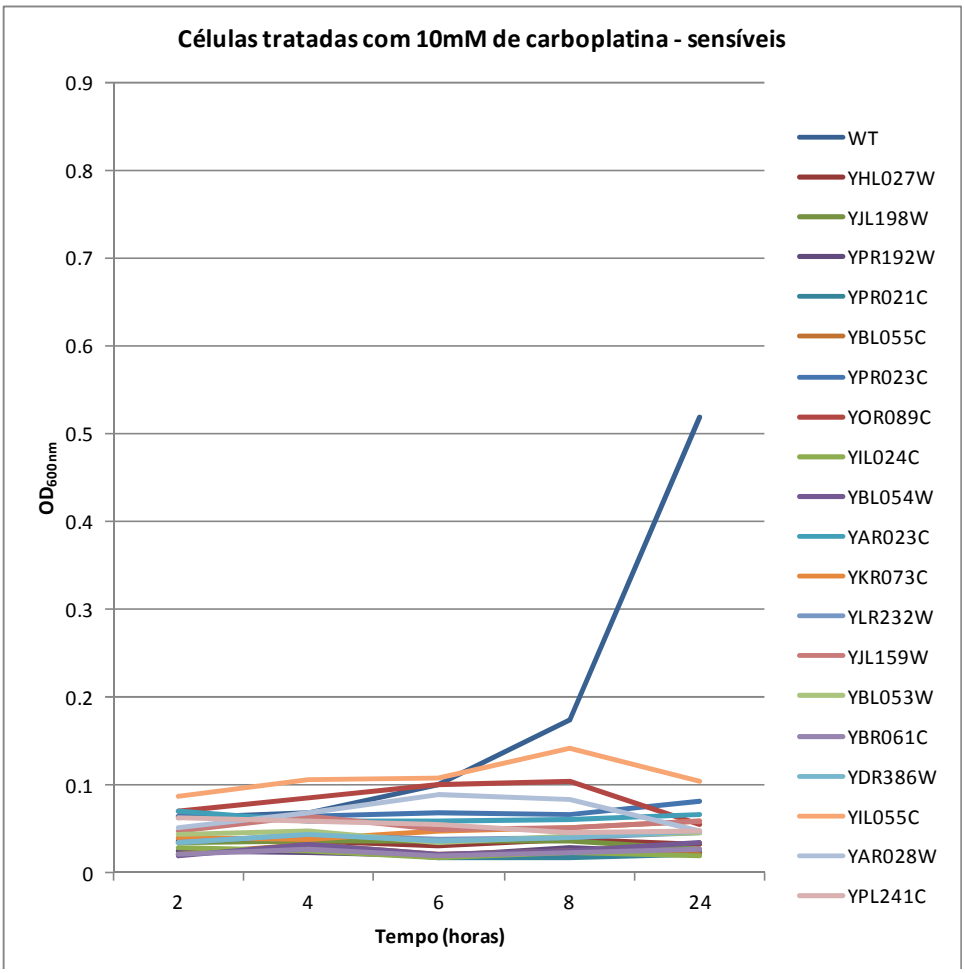
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 29 | YPR192W | AQY1 | 2,94397 | *0,002903* |
| 30 | YDR494W | RSM28 | 2,93103 | *0,003001* |
| 31 | YPR021C | AGC1 | 2,91228 | *0,003148* |
| 32 | YLR390W-A | CCW14 | 2,85072 | *0,003681* |
| 33 | YJL198W | PHO90 | 2,831 | *0,003869* |
| 34 | YDR375C | BCS1 | 2,81833 | *0,003995* |
| 35 | YPL196W | OXR1 | 2,79157 | *0,004272* |
| 36 | YOL070C | NBA1 | 2,7867 | *0,004324* |
| 37 | YHR133C | NSG1 | 2,75136 | *0,004723* |
| 38 | YDR386W | MUS81 | 2,71387 | *0,005183* |
| 39 | YER088C | DOT6 | 2,6947 | *0,005434* |
| 40 | YER041W | YEN1 | 2,67241 | *0,00574* |
| 41 | YOR089C | VPS21 | 2,66562 | *0,005836* |
| 42 | YAR042W | SWH1 | 2,65726 | *0,005957* |
| 43 | YAR028W | YAR028W | 2,63954 | *0,006221* |
| 44 | YCR068W | ATG15 | 2,61627 | *0,006583* |
| 45 | YKR073C | YKR073C | 2,5955 | *0,006923* |
| 46 | YPR022C | YPR022C | 2,58027 | *0,007182* |
| 47 | YMR062C | ECM40 | 2,5611 | *0,007521* |
| 48 | YOR339C | UBC11 | 2,54644 | *0,007791* |
| 49 | YPL241C | CIN2 | 2,51405 | *0,008417* |
| 50 | YLR232W | YLR232W | 2,49492 | *0,008809* |
| 51 | YMR048W | CSM3 | 2,48363 | *0,009048* |
| 52 | YIL024C | YIL024C | 2,48194 | *0,009084* |
| 53 | YLR038C | COX12 | 2,46159 | *0,009531* |

A análise espectrofotométrica foi o método escolhido para caracterizar o crescimento celular da levedura na presença de carboplatina. Assim, foi determinada a densidade óptica (OD) da suspensão celular a um comprimento de onda de $600_{nm}$. Em paralelo, foi também determinada a viabilidade celular através do plaqueamento em meio sólido YPD nos tempos 2, 4, 6, 8 e 24 horas após exposição das linhagens a 10mM de carboplatina, em $OD_{600nm}$ inicial de 0,2 (Figura 12).

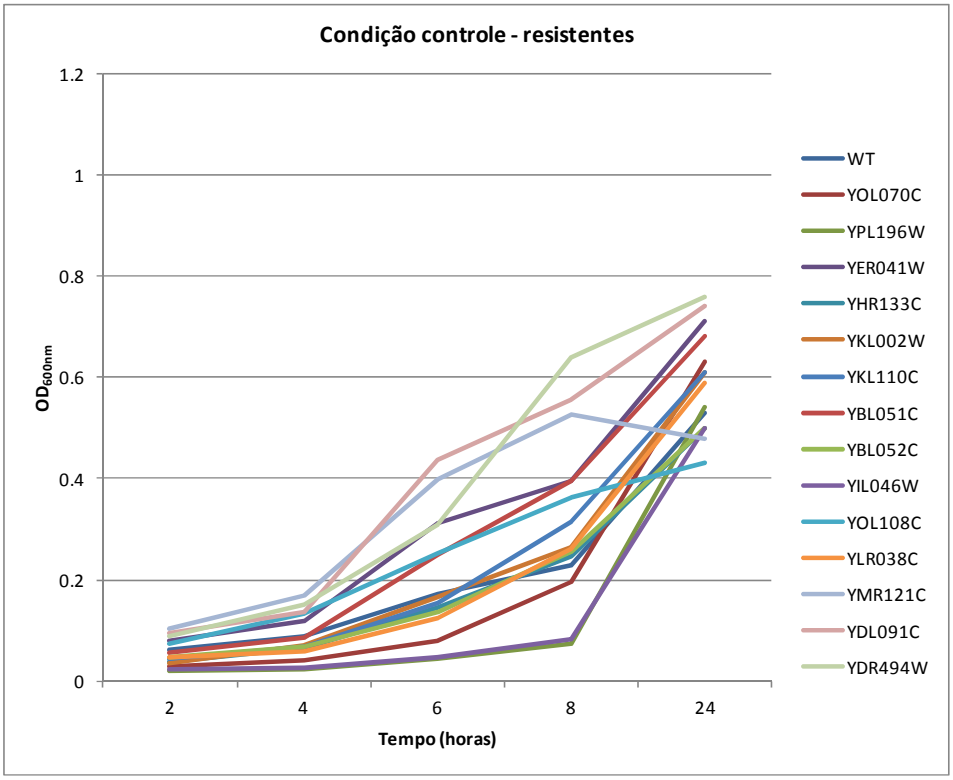
Com os resultados obtidos realizamos um *rankeamento* dos clones mais sensíveis (que apresentaram maior perda de viabilidade em relação à linhagem selvagem) e das resistentes (que mantiveram viabilidade igual ou superior à linhagem selvagem) tendo por base o crescimento controle (levedura cultivada na ausência de composto) (tabela 3).

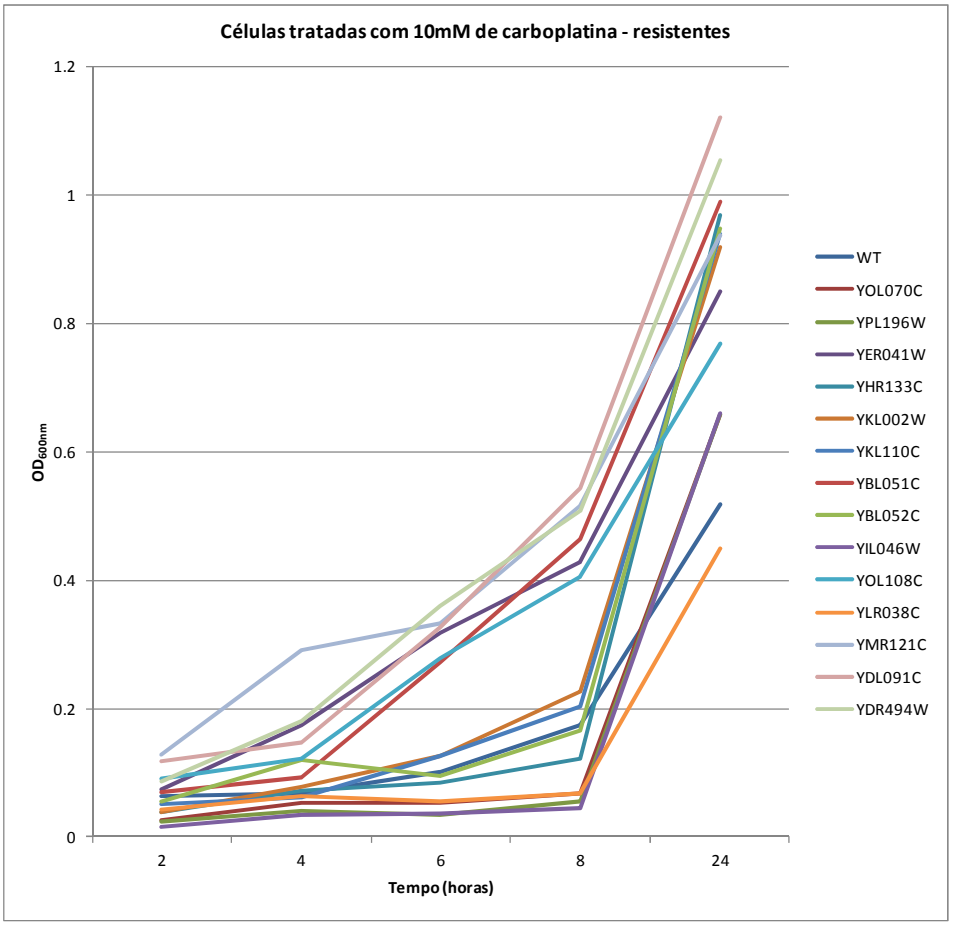
A


Condição Controle - sensíveis
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD600nm
2
4
6
8
24
Tempo (horas)
WT
YHL027W
YJL198W
YPR192W
YPR021C
YBL055C
YPR023C
YOR089C
YIL024C
YBL054W
YAR023C
YKR073C
YLR232W
YJL159W
YBL053W
YBR061C
YDR386W
YIL055C
YAR028W
YPL241C


Células tratadas com 10mM de carboplatina - sensíveis
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD600nm
2
4
6
8
24
Tempo (horas)
WT
YHL027W
YJL198W
YPR192W
YPR021C
YBL055C
YPR023C
YOR089C
YIL024C
YBL054W
YAR023C
YKR073C
YLR232W
YJL159W
YBL053W
YBR061C
YDR386W
YIL055C
YAR028W
YPL241C

**B**


Condição controle - resistentes
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD600nm
2
4
6
8
24
Tempo (horas)
WT
YOL070C
YPL196W
YER041W
YHR133C
YKL002W
YKL110C
YBL051C
YBL052C
YIL046W
YOL108C
YLR038C
YMR121C
YDL091C
YDR494W


Células tratadas com 10mM de carboplatina - resistentes
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD600nm
2
4
6
8
24
Tempo (horas)
WT
YOL070C
YPL196W
YER041W
YHR133C
YKL002W
YKL110C
YBL051C
YBL052C
YIL046W
YOL108C
YLR038C
YMR121C
YDL091C
YDR494W

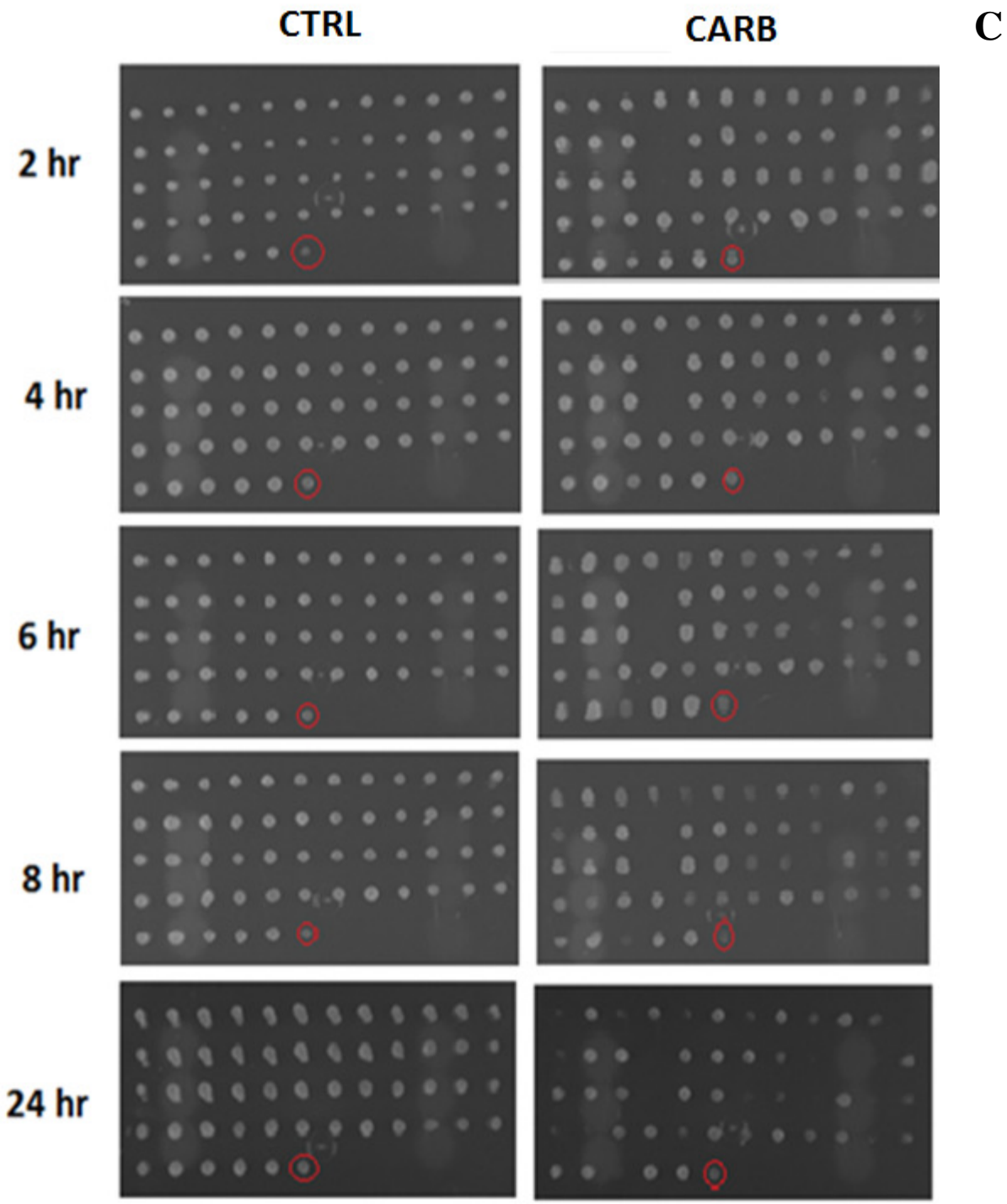



Figura 12: Taxas de crescimento e viabilidade das linhagens mutantes que apresentaram maior defeito de *fitness* quando expostas a carboplatina nos estudos de Hillenmeyer et al. (2008). As células foram incubadas em meio mínimo liquido na presença (CARB) ou ausência (CTRL) de 10mM de carboplatina. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas com replicador e pingadas na placa de YPD que foi incubada a 30 °C por 24 horas e fotografadas. (A) taxas de crescimento das linhagens sensíveis a carboplatina em comparação a linhagem selvagem. (B) taxas de crescimento das linhagens resistentes a carboplatina em comparação a linhagem selvagem. (C) viabilidade dos mutantes da coleção YKO após exposição à carboplatina.

Com esses resultados observamos que das 53 linhagens mutantes analisadas, apenas 19 sofreram significativa perda de viabilidade e menor taxa de crescimento (tabela 3) quando comparadas a linhagem selvagem. Outras 25 não apresentaram nenhum efeito durante a exposição à carboplatina comportando-se exatamente como a linhagem selvagem (tabela 4). Porém, quando analisadas as curvas de crescimento durante o tempo de exposição à carboplatina somente 9 mostraram-se realmente resistentes já que as demais possuem um crescimento maior do que a selvagem mesmo quando não eram expostas à carboplatina. A partir desses dados, realizamos uma análise da localização celular dos produtos gênicos das linhagens mutantes (dados mostrados nas tabelas 3 e 4 e na figura 13).

Tabela 3: Linhagens mais sensíveis a carboplatina tanto na taxa de decrescimento (leitura em OD $_{600nm}$) quanto na viabilidade medida pelo crescimento em placa

| **SENSÍVEIS** | | | | **COMPARTIMENTOS CELULARES** |
|---|---|---|---|---|
| **T(hr)** | **Mutantes** | **OD (Carb)** | **OD (Ctrl)** | |
| **2** | YHL027W | 0,036 | 0,033 | Nuclear |
| **2** | YJL198W | 0,035 | 0,035 | Integral de membrana |
| **2** | YPR192W | 0,026 | 0,02 | Integral de membrana |
| **2** | YPR021C | 0,022 | 0,03 | Membrana mitocôndrial/ Integral de membrana |
| **2** | YBL055C | 0,022 | 0,019 | Citoplasma |
| **6** | YPR023C | 0,068 | 0,221 | Complexo de histonas acetiltransferase/Complexo histona deacetilase |
| **8** | YOR089C | 0,104 | 0,746 | Membrana mitocôndrial externa/Compartimento pré-vacuolar |
| **8** | YIL024C | 0,024 | 0,079 | Desconhecido |
| **8** | YBL054W | 0,025 | 0,108 | Citoplasma/Núcleo/Complexo histona deacetilase |
| **24** | YAR023C | 0,067 | 0,78 | Desconhecido |
| **24** | YKR073C | 0,059 | 0,57 | Desconhecido |
| **24** | YLR232W | 0,045 | 0,44 | Desconhecido |
| **24** | YJL159W | 0,06 | 0,56 | Região extracelular/ Parede celular típica de fungos |
| **24** | YBL053W | 0,045 | 0,6 | Desconhecido |
| **24** | YBR061C | 0,027 | 0,55 | Citoplasma |
| **24** | YDR386W | 0,047 | 0,63 | Nuclear/Junção de Holliday |
| **24** | YIL055C | 0,105 | 0,39 | Desconhecido |
| **24** | YAR028W | 0,048 | 0,57 | Desconhecido |
| **24** | YPL241C | 0,047 | 0,54 | Desconhecido |
| **24** | WT | 0,518 | 0,53 | |

Tabela 4: Linhagens mais resistentes a carboplatina tanto na taxa de crescimento (leitura em OD $_{600nm}$) quanto na viabilidade medida pelo crescimento em placa..

| RESISTENTES | | | | COMPARTIMENTOS CELULARES |
|---|---|---|---|---|
| **T(hr)** | **Mutantes** | **OD (Carb)** | **OD (Ctrl)** | |
| **24** | YHR133C | 0,969 | 0,5 | Reticulo endoplasmático/Integral de membrana |
| **24** | YKL002W | 0,919 | 0,61 | Citoplasma/ESCRT III complexo |
| **24** | YKL110C | 0,939 | 0,61 | Citoplasma/Nuclear |
| **24** | YBL051C | 0,989 | 0,68 | Citoplasma |
| **24** | YBL052C | 0,948 | 0,5 | NuA3 complexo histona acetiltransferase |
| **24** | YOL108C | 0,768 | 0,43 | Nuclear |
| **24** | YMR121C | 0,937 | 0,48 | Nuclear/Citoplasma/Grande subunidade ribossomal citosólica |
| **24** | YDL091C | 1,12 | 0,74 | Citoplasma/Dsc E3 complexo ubiquitina ligase |
| **24** | YDR494W | 1,053 | 0,76 | Mitocondrial |
| **24** | WT | 0,518 | 0,53 | |

Para verificarmos se há uma distribuição homogênea dos produtos gênicos envolvidos na resposta à carboplatina nos diferentes compartimentos celulares construiu-se os gráficos da figura 13.

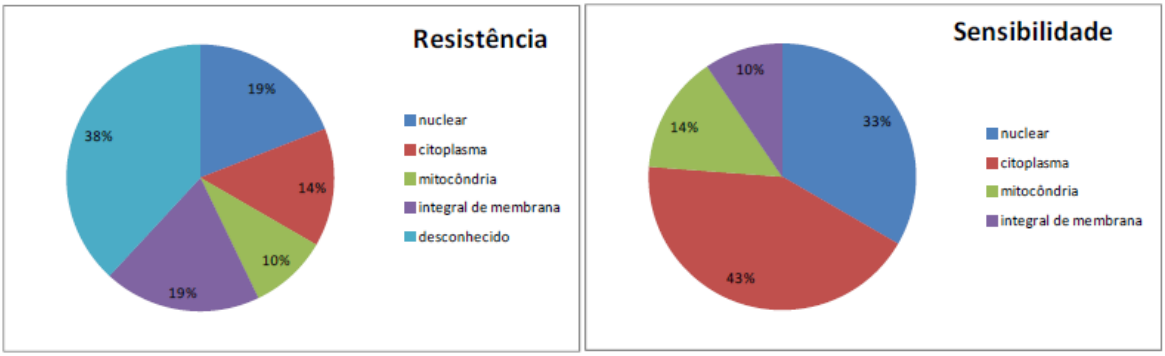



Figura 13: Distribuição nos compartimentos celulares dos produtos gênicos responsáveis pelas respostas de sensibilidade ou resistência a carboplatina.

Na figura 13 podemos observar que há uma clara tendência dos produtos gênicos que levam a sensibilidade à carboplatina a uma distribuição citoplasmática e nuclear que juntos perfazem 76% dos alvos. Já a distribuição dos produtos gênicos envolvidos na resistência ao fármaco (isto é, quando mutados levam a uma sensibilidade maior a carboplatina) parece mais homogênea, mas são em sua maioria de localização desconhecida, quase 40%. Dos que possuem localização já verificada, estão em sua maioria presentes na membrana (proteínas integrais de membrana) ou no núcleo. Levando em consideração que o mecanismo descrito para a ação da carboplatina seja

através da formação de adutos no DNA, nossos resultados com relação à distribuição celular de alvos estão coerentes.

Com relação aos genes responsáveis pela resistência (principal objetivo desse estudo), percebemos claramente que os mecanismos e genes envolvidos possuem suas funções pouco caracterizadas, o que pode ser evidenciado na figura 13 (genes envolvidos na resistência) no qual quase 40% tem localização intracelular desconhecida, mostrando a relevância do presente estudo. De forma a compreender e relacionar os genes identificados recorreu-se à ferramenta computacional SGD Gene Ontology Slim Mapper para agrupar os genes de acordo com a sua classificação na nomenclatura GO (Gene Ontology), com relação aos compartimentos celulares e ao processo biológico que participa (Tabelas 5 e 6). Nas Tabelas 5 e 6 estão agrupados os genes que foram identificados que conferem sensibilidade e resistência a carboplatina, respectivamente, tendo em conta os processos biológicos que participam na célula. Estão ainda descritos dados como a frequência no conjunto de genes identificados e a frequência dos genes no genoma da levedura.

Tabela 5: Agrupamento por processo biológico dos genes identificados cujos mutantes apresentaram alta sensibilidade à carboplatina. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao "software" SGD Gene Ontology Slim Mapper disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgibin/GO/goSlimMapper.pl

| PROCESSOS BIOLÓGICOS | FREQUÊNCIA | FREQUÊNCIA NO GENOMA | GENE(S) |
|---|---|---|---|
| **Processo biológico desconhecido** | 36.85 | 18.2% | *YAR023C, YAR028W, YBL053W, YIL024C,YIL055C, YKR073C, YLR232W* |
| **Transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II** | 15.8% | 7.2% | *TOD6,RIM101, EAF3* |
| **Organização da parede celular ou biogênese** | 10.5% | 3% | *RIM101,HSP150* |
| **Resposta a danos no DNA** | 10.5% | 4.5% | *MUS81,EAF3* |
| **Resposta a um estímulo químico** | 10.5% | 5.8% | *YBL055C,RIM101* |
| **Esporulação** | 10.5% | 1.9% | *RIM101,AQY1* |
| **Reparo do DNA** | 10.5% | 3.8% | *MUS81,EAF3* |
| **Transporte de íons** | 10.5% | 3.6% | *PHO90,AGC1* |
| **Ciclo celular meiótico** | 10.5% | 2.6% | *MUS81,RIM101* |
| **Citocinese** | 5.3% | 1.7% | *RIM101* |
| **Organização de vacúolo** | 5.3% | 1.2% | *VPS21* |
| **Enovelamento de proteínas** | 5.3% | 1.4% | *CIN2* |
| **Modificação do RNA** | 5.3% | 2.6% | *TRM7* |
| **Regulação do processo metabólico do DNA** | 5.3% | 1.3% | *EAF3* |
| **Segregação cromossômica** | 5.3% | 2.1% | *MUS81* |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Transporte transmembranar** | 5.3% | 3.5% | *PHO90* |
| **Processamento de tRNA** | 5.3% | 1.6% | *TRM7* |
| **Direcionamento de Proteína** | 5.3% | 4.3% | *VPS21* |
| **Modificação de histonas** | 5.3% | 1.7% | *EAF3* |
| **Organização de cromatina** | 5.3% | 3,60% | *EAF3* |
| **Transcrição DNA-dependente, alongamento** | 5.3% | 1.3% | *EAF3* |
| **Regulação do transporte** | 5.3% | 1.1% | *PHO90* |
| **Transporte endossomal** | 5.3% | 1.3% | *VPS21* |
| **Acilação de proteínas** | 5.3% | 1.0% | *EAF3* |
| **Tradução citoplasmática** | 5.3% | 2.7% | *TRM7* |
| **Transporte vesícular Golgi** | 5.3% | 3.0% | *VPS21* |
| **Replicação do DNA** | 5.3% | 2.3% | *EAF3* |
| **Recombinação de DNA** | 5.3% | 2.5% | *MUS81* |
| **Biogênese de complexo de proteínas** | 5.3% | 4.2% | *CIN2* |
| **Resposta ao estresse oxidativo** | 5.3% | 1.4% | YBL055C |
| **Montagem de organela** | 5.3% | 1.8% | *VPS21* |
| **Herança de organela** | 5.3% | 0.9% | *VPS21* |
| **Endocitose** | 5.3% | 1.5% | *VPS21* |
| **Modificação peptidil-amino ácido** | 5.3% | 1.4% | *EAF3* |
| **Transporte de aminoácidos** | 5.3% | 0.7% | *AGC1* |

A tabela 5 apresenta os dados referentes aos genes cujos mutantes apresentaram alta sensibilidade a carboplatina. Apesar da grande maioria ainda não possuir função conhecida, cerca de 15% estão envolvidos no transporte celular. Esses resultados

condizem com outros estudos já apresentados sobre a sensibilidade a carboplatina em células tumorais causada pela inibição de vias de transporte celular (WANG *et al.*, 2012; ABADA *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2011).

Tabela 6: Agrupamento dos genes identificados por processos biológicos cujos mutantes apresentaram alta resistência a carboplatina. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao "software" SGD Gene Ontology Slim Mapper disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgibin/GO/goSlimMapper.pl

| PROCESSOS BIOLÓGICOS | FREQUÊNCIA | FREQUÊNCIA NO GENOMA | GENE(S) |
|---|---|---|---|
| **Tradução citoplasmática** | 25% | 2.7% | *RSM28,RPL15B* |
| **Metabolismo de lipídios** | 12.5% | 4.2% | *NSG1* |
| **Transporte endosomal** | 12.5% | 1.3% | *DID4* |
| **Resposta a danos no DNA** | 12.5% | 4.5% | *PIN4* |
| **Acilação de proteínas** | 12.5% | 1.0% | *SAS3* |
| **Modificação do RNA** | 12.5% | 2.6% | *KTI12* |
| **Iniciação da tradução** | 12.5% | 0.9% | *RSM28* |
| **Regulação do ciclo celular** | 12.5% | 3.1% | *PIN4* |
| **Modificação peptidil-amino ácido** | 12.5% | 1.4% | *SAS3* |
| **Organização vesicular** | 12.5% | 1.2% | *DID4* |
| **Transcrição a partir do promotor de RNA polimerase II** | 12.5% | 7.2% | *KTI12* |
| **Ciclo celular mitótico** | 12.5% | 4.8% | *PIN4* |
| **Processamento tRNA** | 12.5% | 1.6% | *KTI12* |
| **Modificação de histonas** | 12.5% | 1.7% | *SAS3* |
| **Proteólise envolvida no processo catabólico de proteínaa celulares** | 12.5% | 3.1% | *DID4* |
| **Processo biológico desconhecido** | 12.5% | 18.2% | *UBX3* |
| **Organização de cromatina** | 12.5% | 3.6% | *SAS3* |

A tabela 6 apresenta os dados referentes aos gene cujos mutantes apresentaram alta resistência a carboplatina. Assim como para os mutantes sensíveis, os mutantes resistentes não apresentaram um claro padrão de processos biológicos englobando a maioria dos genes, no entanto, cerca de 27% estão envolvidos na tradução citoplasmática.

As figuras 14, 22, 25 e 32 mostram o resultado da análise desses genes utilizando a ferramenta de bioinformática GeneMANIA, onde observamos as possíveis vias metabólicas que relacionam os genes encontrados tanto para resistência quanto para sensibilidade a carboplatina. Foram analisados através dessa ferramenta apenas os genes já caracterizados. Isto significa que as ORFs apresentadas nas tabelas 3 e 4 cujo compartimento celular ou função não são conhecidos ou são "*Dubious*" - duvidosa, não

são apresentados posteriormente, já que não se torna possível fazer qualquer comparação entre eles ou buscar no banco de dados ortólogos humanos (BLAST e Homologene) que estejam associados aos mesmos, por falta de informação pré-existente. Na verdade, a busca foi feita, mas não obtivemos resultados.

GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A CARBOPLATINA

### 6.1.1 Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos no mecanismo de transporte celular

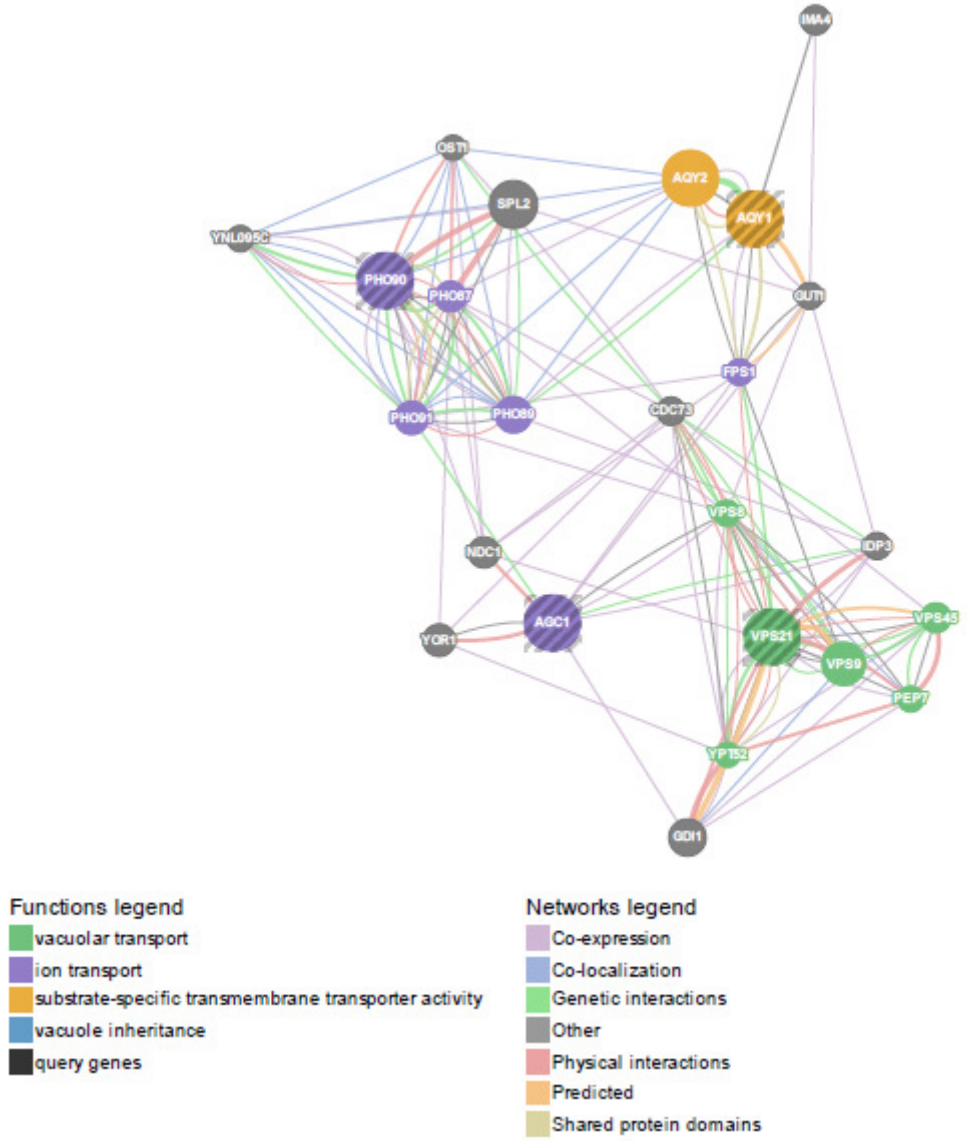



Figura 14: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes

*PHO90, AGC1, AQY1* (cujas mutantes perderam a viabilidade com 2 horas de exposição) e o gene VPS21 (cuja mutante apresentou perda de viabilidade progressiva, terminando em 8 horas de exposição).

Na figura 14 identificamos que 3 (mutantes para *PHO90, AGC1* e *AQY1*) das 5 linhagens que sofrem perda rápida de viabilidade estão envolvidas com vias metabólicas de transporte celular, além do gene *VPS21* (apresentou perda da viabilidade após 8 horas de exposição a carboplatina) que está envolvido em processos de transporte vacuolar.

*Δpho90* apresentou perda de viabilidade com apenas 2 horas de exposição, o que pode ser visto tanto pela curva de crescimento quanto pela capacidade de formação de colônia (Figura 15). O gene *PHO90* é codificador de um transportador de baixa afinidade de fosfato inorgânico (Pi) que aumenta a absorção e eficiência de utilização de Pi quando o mesmo está deficiente na célula. Sob condições prolongadas de deficiência de Pi, o crescimento e a divisão celular de *S. cerevisiae* cessa, processo conhecido como o repouso em estado G0. *PHO90* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado nas leveduras *Kluyveromyces lactis e Eremothecium gossypii*.

Apesar de *PHO90* ser pouco caracterizado e não possuir ortólogos em humanos. O metabolismo de fosfato tem sido correlacionado com a síndrome Osteomalacia oncogênica que é caracterizada por hipofosfatemia (redução de fosfato no sangue), fosfatúria (eliminação excessiva de fosfatos pela urina) e baixas concentrações de 1,25-di-hidroxivitamina D (NELSON *et al.,* 1997).

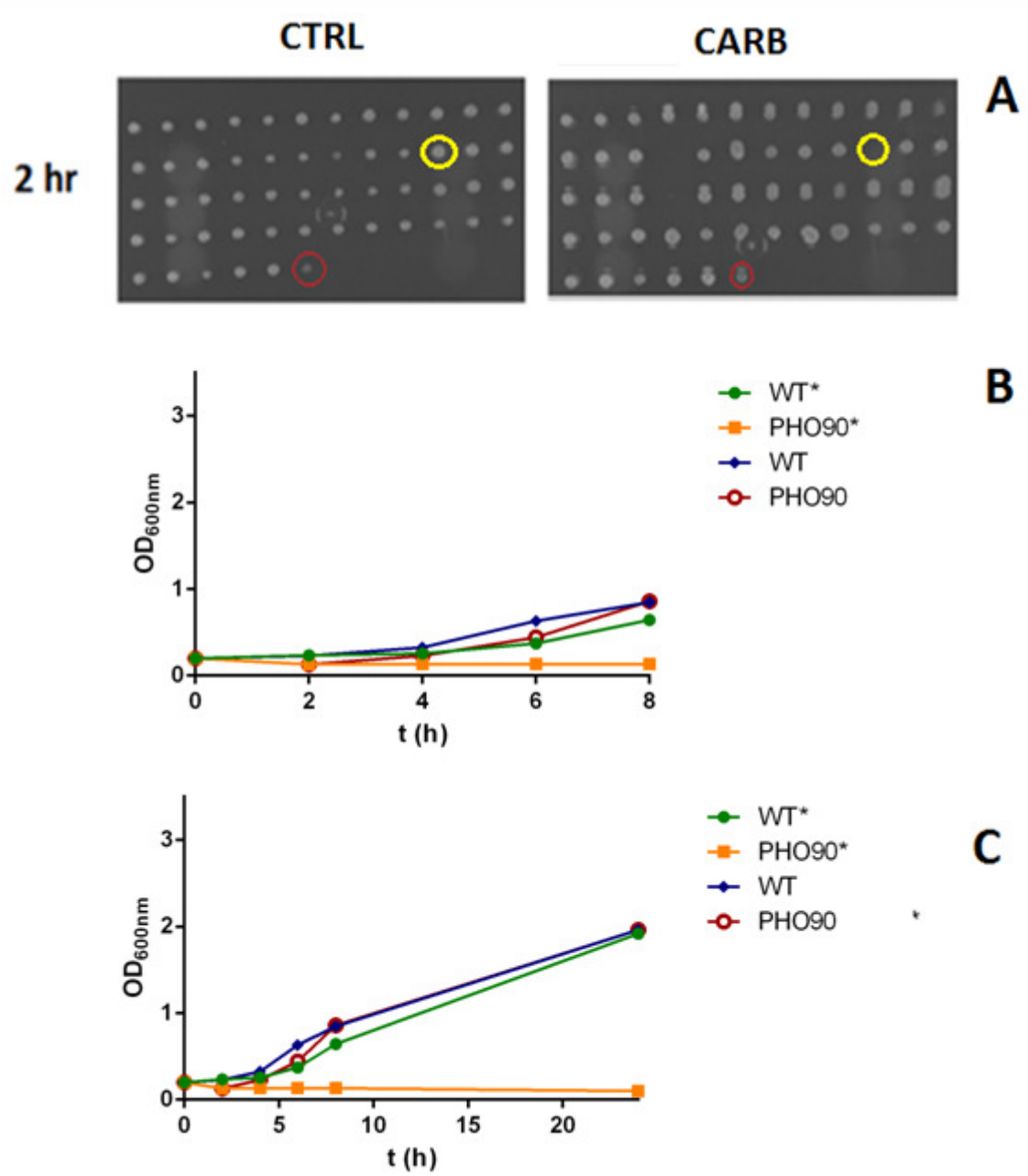



Figura 15: Tratamento de *Δpho90* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionadas sensíveis a 250 µM de carboplatina foram crescidas em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina10mM), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30 °C. (A) O mutante para o gene *PHO90* apresentou uma perda da viabilidade após 2 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; *Δpho90* está circulado em amarelo). (B) Crescimento acompanhado pela medição de $OD_{600nm}$ durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*Δagc1* começa a apresentar perda de viabilidade a partir de 2 horas de tratamento, mas a perda total se dá em 6 horas de exposição (Figura 12 e Figura 16). O gene *AGC1* em leveduras codifica um transportador de aminoácidos mitocondrial "uniporter" para abastecer as mitocôndrias com o glutamato necessário para o

metabolismo do azoto e a síntese de ornitina. *AGC1* possui homólogo estrutural em camundongos 2LCK (Chain: A) uma proteína desacopladora mitocondrial 2, da família de proteínas de membrana, transportadora de anião mitocondrial, facilitam o transporte de moléculas pequenas através da membrana mitocondrial interna (fonte PDB: 2LCK).

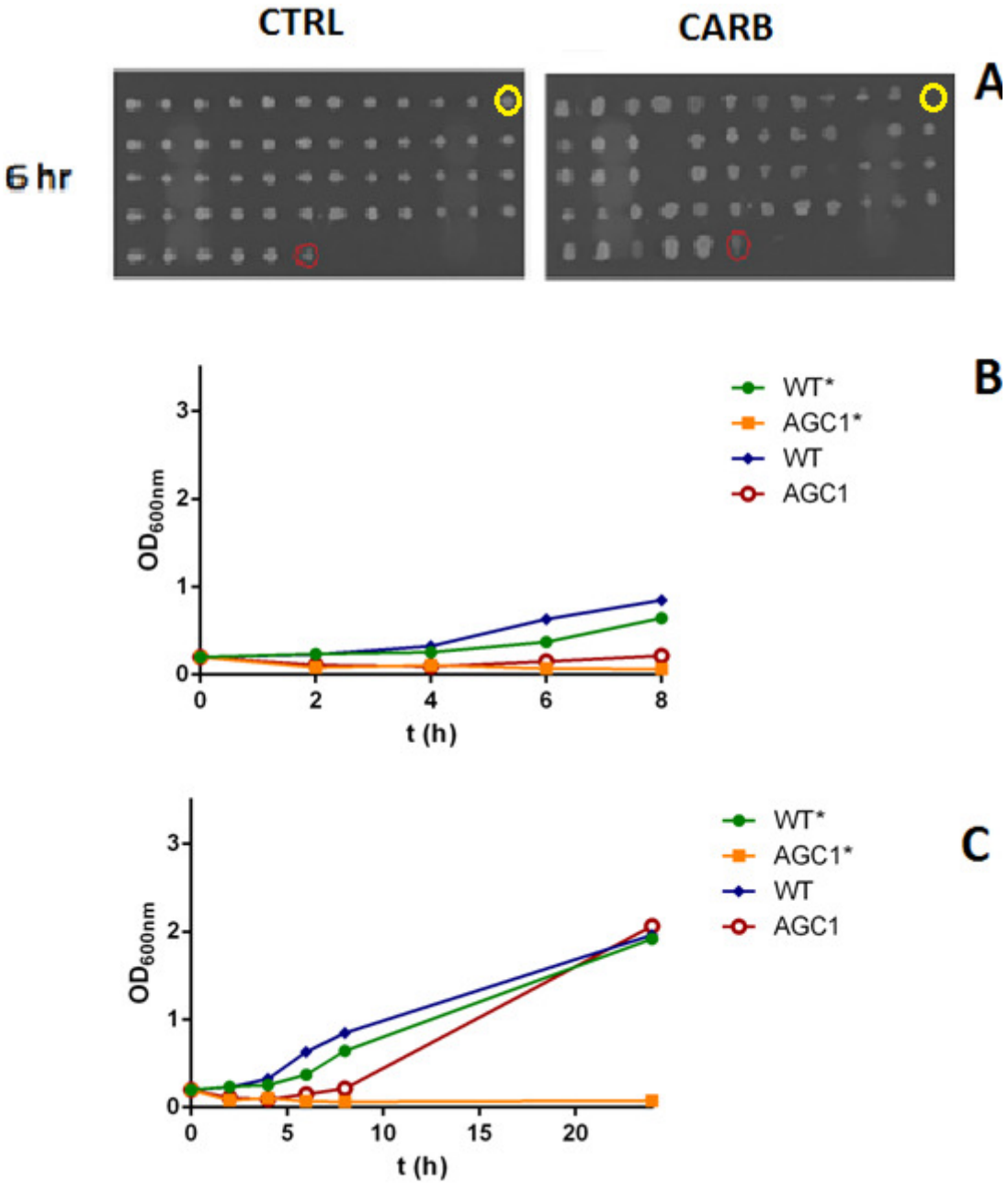



Figura 16: Tratamento de *Δagc1* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionadas sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina 10mM), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante para o gene *AGC1* apresentou uma progressiva perda da viabilidade após 2 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; *Δagc1* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

Assim como *Δpho90*, a linhagem *Δaqy1* perde sua viabilidade com o menor tempo de exposição à carboplatina testado (Figura 17). O gene *AQY1* em *S. cerevisiae* codifica um canal de água específico de esporos que medeia o transporte de água através da membrana plasmática e pode desempenhar um papel na maturação dos esporos em leveduras, provavelmente, permitindo o escoamento da água.

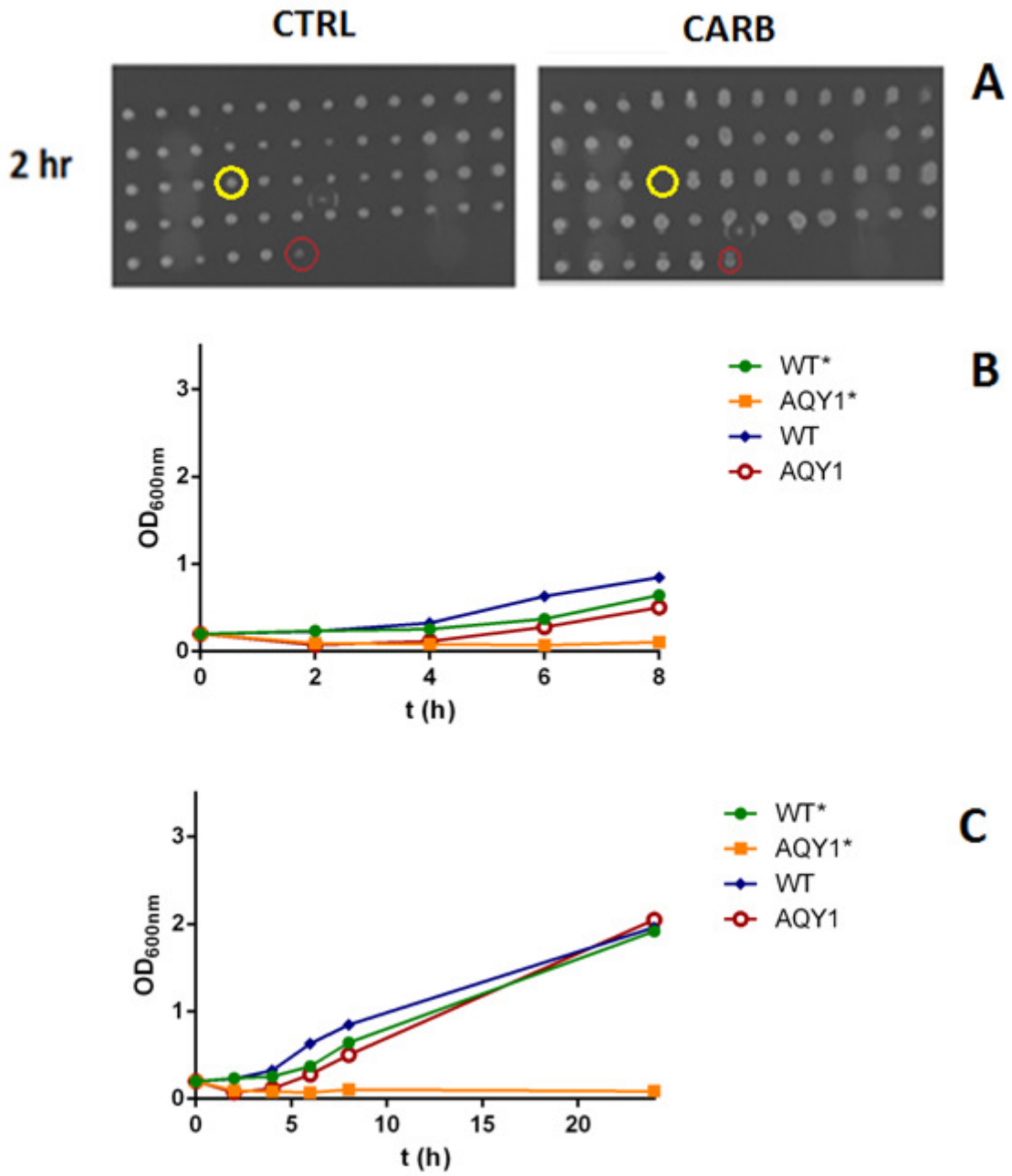



Figura 17: Tratamento de *Δaqy1* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionadas sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante para o gene *AQY1* apresentou uma perda da viabilidade após 2 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; *Δaqy1* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*AQY1* possui homólogo humano chamado *AQP1*, que codifica uma proteína associada à migração celular Aquaporina-dependente na angiogênese, envolvida também em processos de metástase de tumor e cicatrização de feridas que requerem o movimento celular dirigido rápido. Foi sugerido que o aumento da permeabilidade à água da membrana celular mediada por aquaporinas facilita a formação de saliências celulares, resultando na migração mais rápida através dos tecidos (PAPADOPOULOS *et al*., 2008; VERKMAN, 2008).

As sequencias de aminoácidos do gene *AQY1* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 30%) em relação às sequências homólogas de humano. O AQP1 apresentou maior identidade (34%, *E value* $1e^{-23}$) (Figura 18).

aquaporin-1 isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: **ref|NP_932766.1|** Length: 269 Number of Matches: 1
Range 1: 50 to 230

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 99.0 bits(245) | 1e-23() | Compositional matrix adjust. | 62/182(34%) | 97/182(53%) | 5/182(2%) | |

Features:

```
Query  92   IMIAIGFGFSVMFSIWCFAGVSGGALNPAMSLSLCLARAVSPTRCVVMWVSQIVAGMAAG  151
            + +++ FG S+          +SG  LNPA++L L L+  +S  R ++  ++Q V  + A
Sbjct  50   VKVSLAFGLSIATLAQSVGHISGAHLNPAVTLGLLLSCQISIFRALMYIIAQCVGAIVAT  109

Query  152  GAASAMTP---GEVLFANSLGLGCSRTRGLFLEMFGTAILCLTVLMTA-VEKRETNFMAA  207
               S +T    G  L  N L  G +  +GL +E+ GT  L L VL T    +R+    A
Sbjct  110  AILSGITSSLTGNSLGRNDLADGVNSGQGLGIEIIGTLQLVLCVLATTDRRRRDLGGSAP  169

Query  208  LPIGISLFIAHVALTAYTGTGVNPARSLGAAVAARYFPHYHWIYWIGTLLGSILAWSVWQ  267
            L IG+S+ + H+    YTG G+NPARS G+AV    F + HWI+W+G  +G  LA  ++
Sbjct  170  LAIGLSVALGHLLAIDYTGCGINPARSFGSAVITHNFSN-HWIFWVGPFIGGALAVLIYD  228

Query  268  LL  269
             +
Sbjct  229  FI  230
```

Figura 18: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *AQY1* da levedura *S. cerevisiae* com AQP1 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLAST p para a obtenção desses resultados.

O mutante *Δvps21* apresentou perda significativa de viabilidade a partir de 8 horas de exposição (Figuras 12 e 19). O gene *VPS21* codifica um dos componentes do complexo de fusão da membrana que participam no transporte de Golgi para o endossoma e em processos de autofagia. Proteínas vacuolares e endocitadas acumulam nos intermediários de transporte distintos, em células que não possuem função do *VPS21*. Acredita-se que *VPS21* está envolvida em duas etapas do tráfego celular para o

compartimento endossomal pré-vacuolar e tardio (GERRARD *et al*., 2000). Vps21p é induzida durante estresses nos processos de replicação de DNA (TKACH *et al*. 2012).

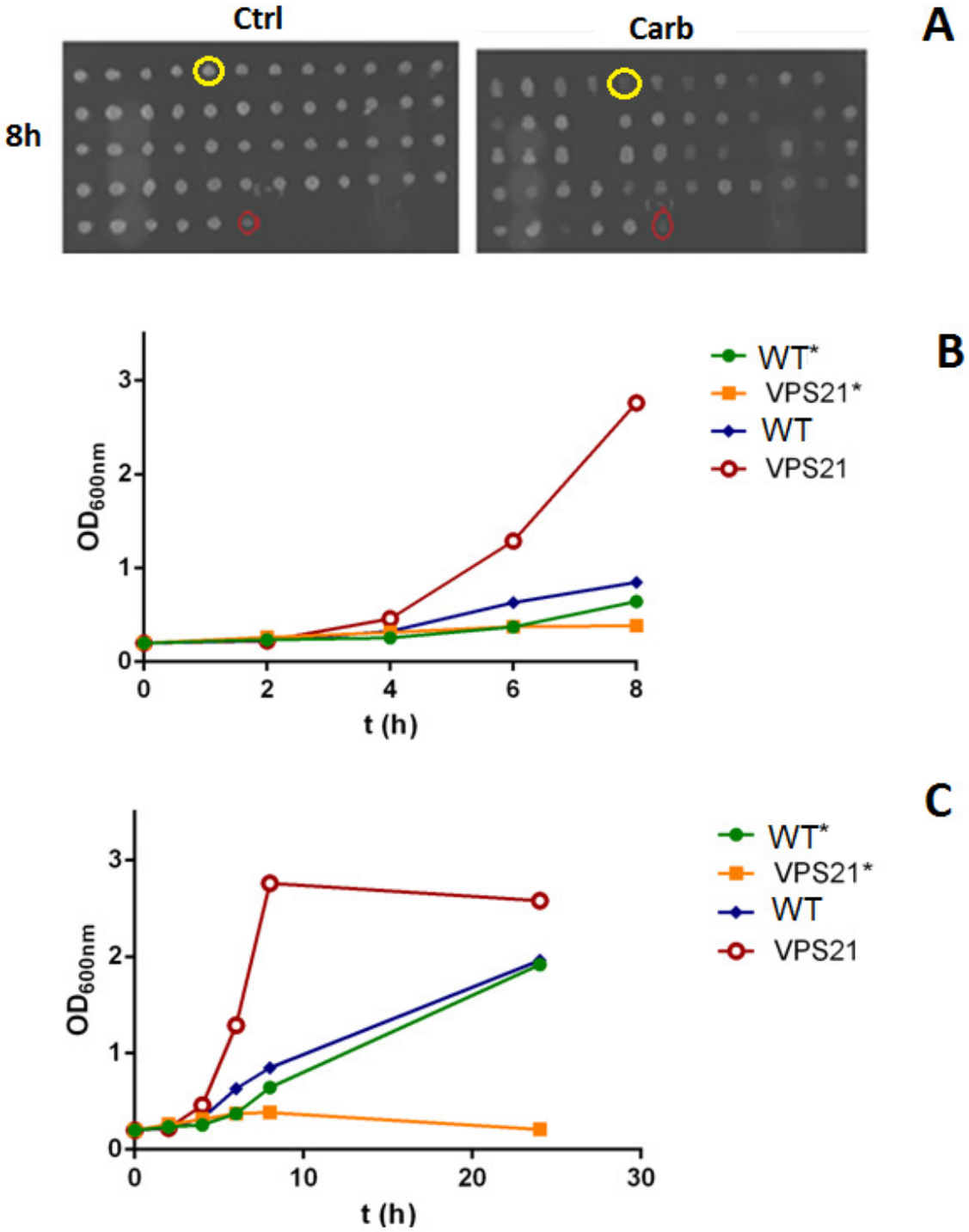



Figura 19: Tratamento do *Δvps21* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante do gene *VPS21* apresentou uma perda da viabilidade após 8 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δvps21* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*VPS21* possui homólogo humano chamado RAB5B, uma GTPase que tem sido demonstrada como transportador na via endocítica precoce e está localizada na membrana plasmática e dos endossomas (CHIARIELLO *et al*., 1999). A proteína RAB5B é essencial para inicio da fusão do endossoma *in vitro* e é capaz de aumentar a taxa de endocitose *in vivo*, quando superexpressa (BUCCI *et al*., 1995).

As sequencias de aminoácidos do gene *VPS21* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 60%) às sequências homólogas de humano. A proteína RAB5B apresentou maior identidade (60%, *E value* $1e^{-69}$) (Figura 20).

ras-related protein Rab-5B isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_002859.1| Length: 215 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)
Range 1: 16 to 188

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 215 bits(548) | 1e-69() | Compositional matrix adjust. | 106/178(60%) | 131/178(73%) | 5/178(2%) | |

Features:

```
Query  3    TSVTSIKLVLLGEAAVGKSSIVLRFVSNDFAENKEPTIGAAFLTQRVTINEHTVKFEIWD  62
            + +   KLVLLGE+AVGKSS+VLRFV   F E +E TIGAAFLTQ V +++ TVKFEIWD
Sbjct  16   SKICQFKLVLLGESAVGKSSLVLRFVKGQFHEYQESTIGAAFLTQSVCLDDTTVKFEIWD  75

Query  63   TAGQERFASLAPMYYRNAQAALVVYDVTKPQSFIKARHWVKELHEQASKDIIIALVGNKI  122
            TAGQER+ SLAPMYYR AQAA+VVYD+T  ++F +A+ WVKEL  QAS  I+IAL GNK
Sbjct  76   TAGQERYHSLAPMYYRGAQAAIVVYDITNQETFARAKTWVKELQRQASPSIVIALAGNKA  135

Query  123  DMLQEGGERKVAREEGEKLAEEKGLLFFETSAKTGENVNDVFLGIGEKIPLKTAEEQN  180
            D+     +R V  EE +  A++  LLF ETSAKT  NVND+FL I +K+P   +E QN
Sbjct  136  DL---ANKRMVEYEEAQAYADDNSLLFMETSAKTAMNVNDLFLAIAKKLP--KSEPQN  188
```

Figura 20: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *VPS21* da levedura *S. cerevisiae* com RAB5B de humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLAST p para a obtenção desses resultados.

Em um estudo com a cisplatina uma H+ ATPase vacuolar e a sua ação na manutenção do pH citoplasmático mostrou ter um papel importante na sensibilidade à droga, um resultado importante, dado como a citotoxicidade de cisplatina é potencializada por tratamento sinérgico com um inibidor da H+ ATPase nas linhagens de células humanas (LIAO *et al*., 2007).

Outros tipos de transportadores muito estudados têm sido associados à resistência a compostos a base de platina tais como transportadores de cobre, CTR1, ATP7A e ATP7B. Os transportadores CTR1 apresentam influência significativa na

mediação do influxo de carboplatina e o transportador ATP7B, cassete de ligação ao ATP, sub-família C2 (genes ABCC2, também conhecido como MRP2 ou cMOAT) atua no efluxo de carboplatina (CUI *et al.*, 1999; SAMIMI *et al.*, 2004; KATANO *et al.*, 2003; DOLGOVA *et al.*, 2013).

A absorção celular do cobre e das drogas de platina podem determinar criticamente suas citotoxicidades. Cobre induz citotoxicidade através da geração de espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio, o radical superóxido e hidroxila, que podem danificar proteínas, lipídeos e DNA no interior das células. O papel central do transporte de cobre, na sua toxicidade é realçado pela desordem humana causada por sobrecarga de cobre, a doença de Wilson, causada pela mutação que leva à inativação de ATP7B, um transportador de membrana de efluxo de cobre. Drogas de platina anticancerígenas, tais como oxaliplatina, cisplatina e carboplatina podem ser capturadas pelas células antes da ligação ao DNA e indução de citotoxicidade. A captação de platina varia muito entre os diferentes tipos de células e tecidos, e é um dos principais determinantes da sensibilidade do tumor e da resistência ao medicamento, além da toxicidade das drogas de platina em tecido normal (LIU *et al.*, 2013).

### 6.1.2 Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos na biogênese de parede celular

Na figura 21 encontramos 2 produtos gênicos envolvidos em processos de organização ou biogênese de parede celular na levedura. Isso esta de acordo com o esperado, pois uma deficiência na parede celular poderia facilitar a entrada e acúmulo da droga dentro da célula. Contudo, a rede de interações desses genes indica uma via metabólica interessante: a de crescimento filamentoso. Alguns trabalhos têm relacionado os mecanismos característicos de crescimento invasivo de leveduras, ativados durante o crescimento filamentoso, com mecanismos moleculares conservados em humanos que conferem a capacidade invasiva de tumores. O fato de um micro-organismo unicelular passar a ter um crescimento filamentoso lembra um comportamento invasivo de células tumorais, processos celulares que compartilham moléculas sinalizadoras e reguladoras comuns (CULLEN *et al.*, 2004).

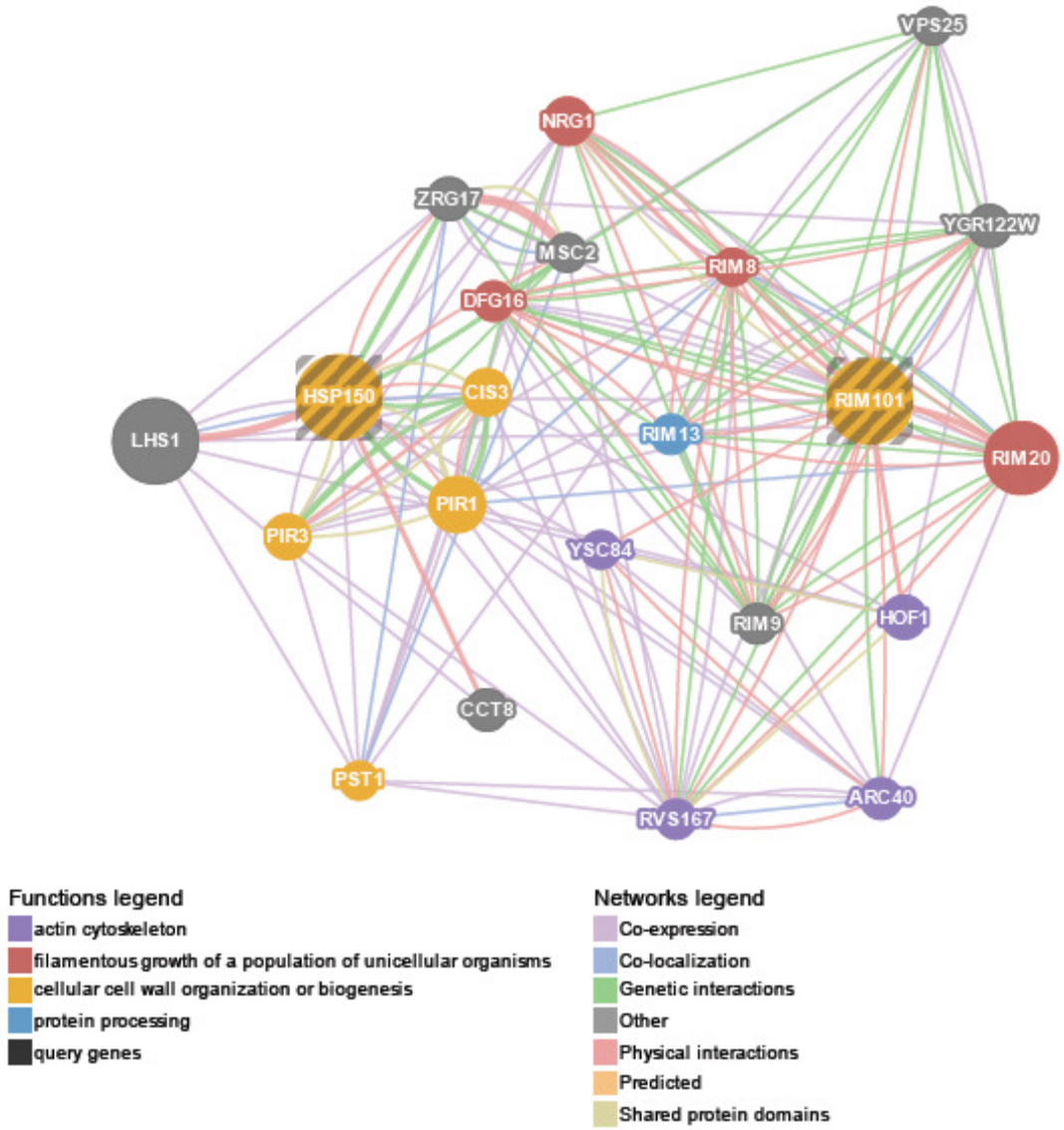



Figura 21: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *RIM101* (cuja mutante perdeu a viabilidade com 2 horas de exposição) e o gene *HSP150* (cuja mutante apresentou perda de viabilidade progressiva, terminando em 24 horas de exposição).

3 linhagens mutantes apresentaram perda de viabilidade total no menor tempo de tratamento com carboplatina, dentre essas *Δrim101* (Figura 22). O gene *RIM101* codifica uma proteína envolvida no controle da esporulação, no crescimento haplóide invasivo e na resposta ao pH alcalino, além de sua função como repressor transcricional. A ausência de uma via *RIM101* funcional conduz a defeitos na parede celular (Pérez et al., 2010). Além disso, foram identificados trinta e cinco genes cuja transcrição é dependente *RIM101* em *S. cerevisiae* (17 genes ativados e 18 genes reprimidos). Esses genes têm conhecido (ou previsto) papel na manutenção e organização da parede celular

e na absorção de ferro (MIRA *et al*., 2008). *RIM101* possui homólogo estrutural humano 2EBT (Chain: A) pertencente ao domínio *Krueppel-like factor 5* (Fonte PDB: 2EBT), que são uma subfamília de fatores de transcrição caracterizados pela presença de um domínio conservado de ligação ao DNA que podem influenciar nos processos celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular. Recentemente um certo número de publicações têm evidência da implicação de proteínas do fator de Kruppel na carcinogênese gastrointestinal (BUTTAR *et al*., 2006).

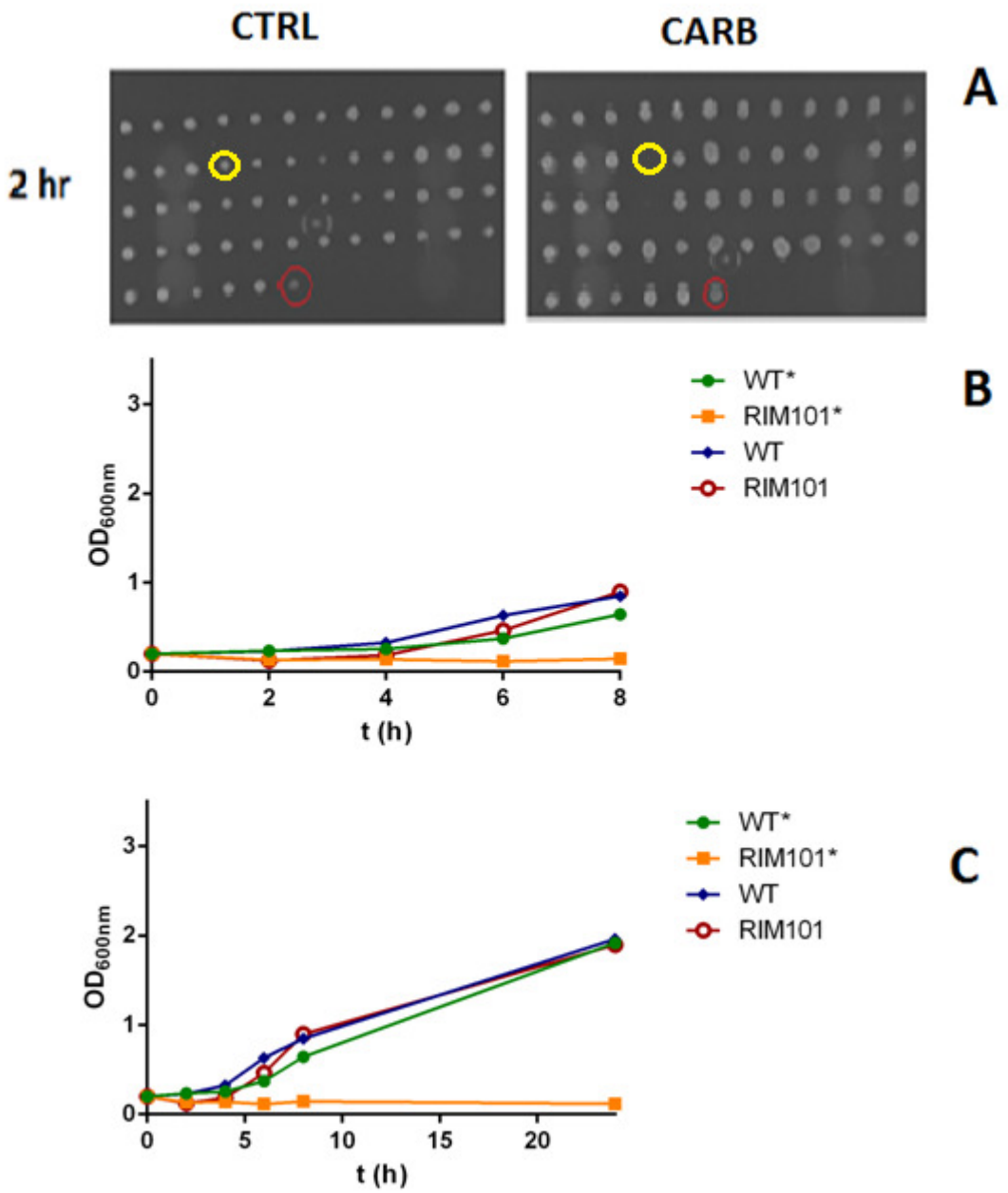



Figura 22: Tratamento do *Δrim101* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com

ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *RIM101* apresentou uma perda da viabilidade após 2 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δrim101* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*Δhsp150* perdeu sua viabilidade progressivamente durante o tempo de tratamento, tendo uma alta queda de viabilidade após 8 horas e perda completa com 24 horas de exposição à carboplatina (Figuras 12 e 23). O gene *HSP150* é codificador de uma proteína de choque térmico O-manosilada (adição de manose a cadeia de polissacarideos) e está diretamente ligada à via secretória e à manutenção da parede celular. O comprometimento dessa via pode gerar a desestabilização da parede celular, facilitando a entrada da carboplatina na célula. De forma interessante, nos estudos de Hillenmeyer *et al.* (2008) o mutante para esse gene também foi relacionado como hipersensível à oxaliplatina (http://chemogenomics.med.utoronto.ca/fitdb/fitdb.cgi?query=YJL159W). *HSP150* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado na levedura *Kluyveromyces lactis*.

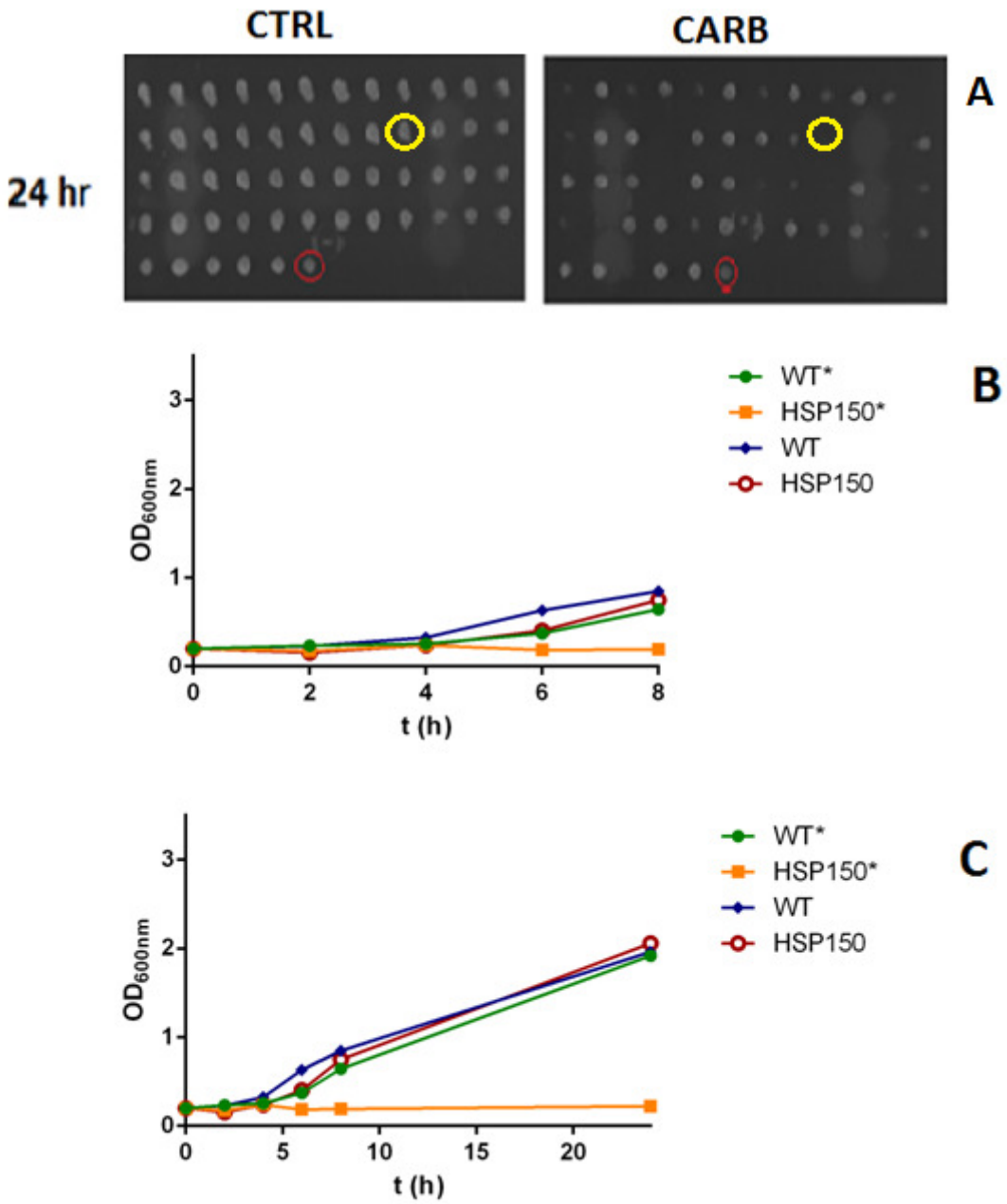



Figura 23: Tratamento do *Δhsp150* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *HSP150* apresentou uma perda da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δhsp150* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

### 6.1.3 Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos na resposta a danos no DNA

Como esperado, e corroborando com nossa metodologia, a maior parte dos produtos gênicos responsáveis pela sensibilidade à carboplatina está relacionada com vias biológicas envolvidas em metabolismo de ácidos nucleicos, em especial na resposta a danos no DNA e metilação de RNA. *TRM7* e *EAF3* são codificadores de transferases; *MUS81* e *YBL055C* endonucleases; *TOD6* está relacionada à ligação ao DNA e *CIN2* é uma GTPase reguladora (Figuras 24 e 25).

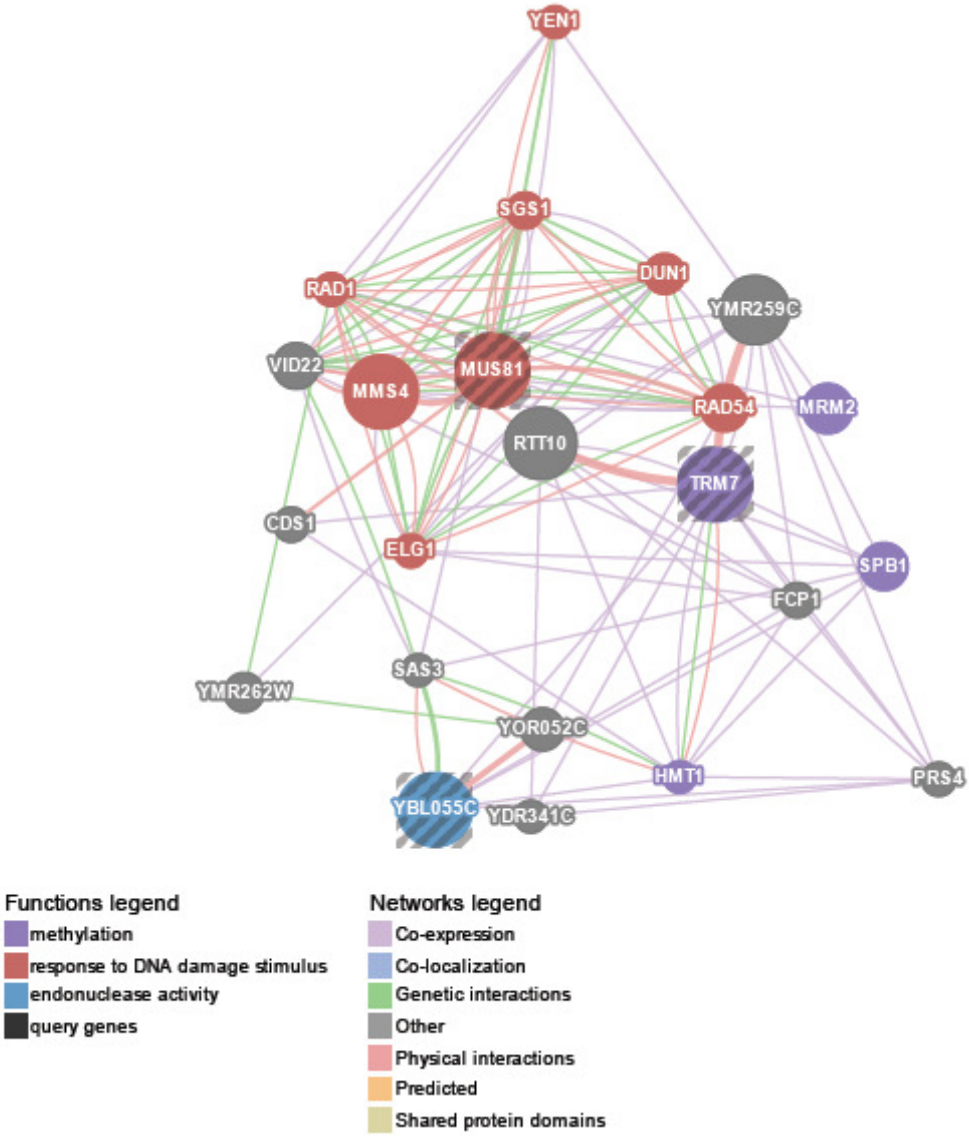



Figura 24: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *TRM7, MUS81* e *YBL055C*. Com exceção de *YBL055C* (que apresentaram perda de viabilidade com 2 horas) as demais linhagens perderam a viabilidade após 24 horas de exposição a carboplatina.

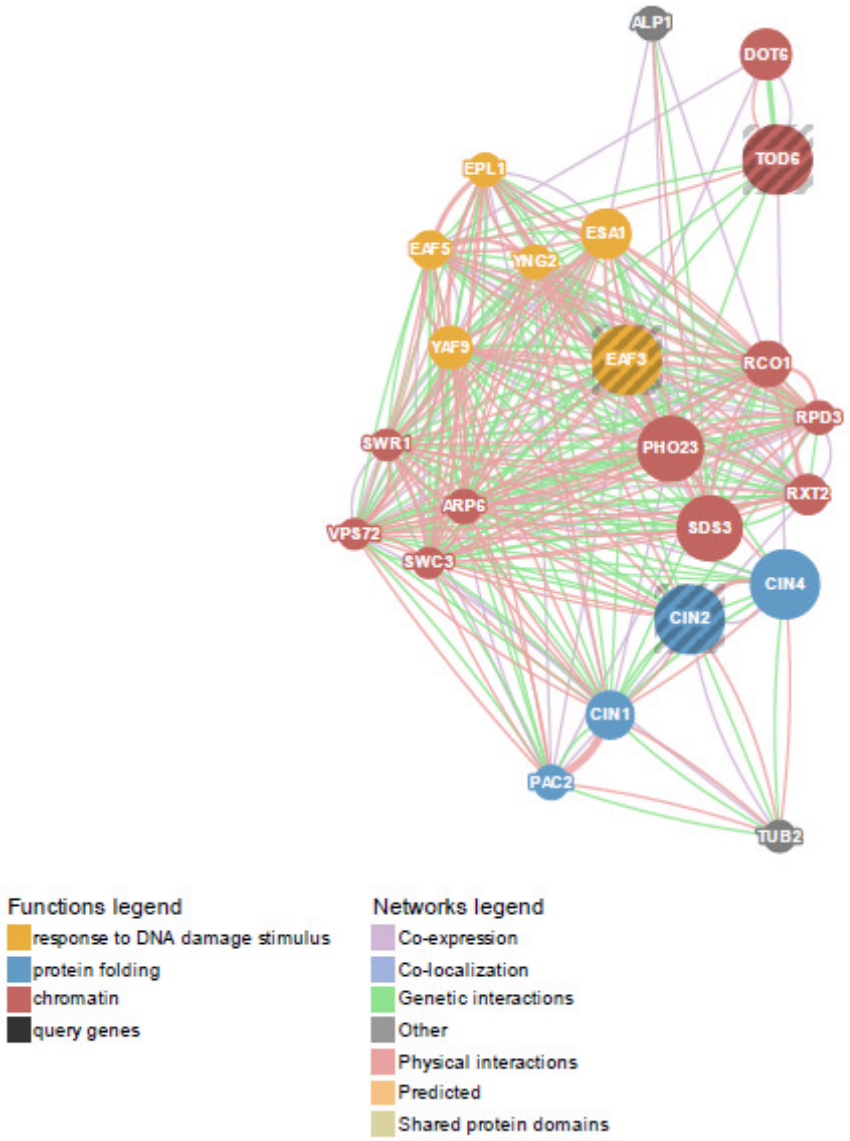



Figura 25: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *CIN2, EAF3, TOD6 (YBL054W)*. Com exceção de *CIN2* (que apresentou perda de viabilidade com 24 horas de exposição) as linhagens *EAF3* e *TOD6* perderam a viabilidade após 6 horas ou 8 horas, respectivamente a carboplatina.

*Δtrm7* perdeu gradativamente sua viabilidade ao longo de 24 horas (Figuras 12 e 26). Na levedura Trm7 é necessário para 2'-O-metilação de C32 e de N34 dos tRNAPhe, tRNATrp e tRNALeu (UAA) para formar Cm32 e Nm34. As células *Δtrm7* têm grave defeito na taxa de crescimento e defeitos de tradução, mas as razões para os mesmos não são conhecidos (PINTARD *et al*. 2002).

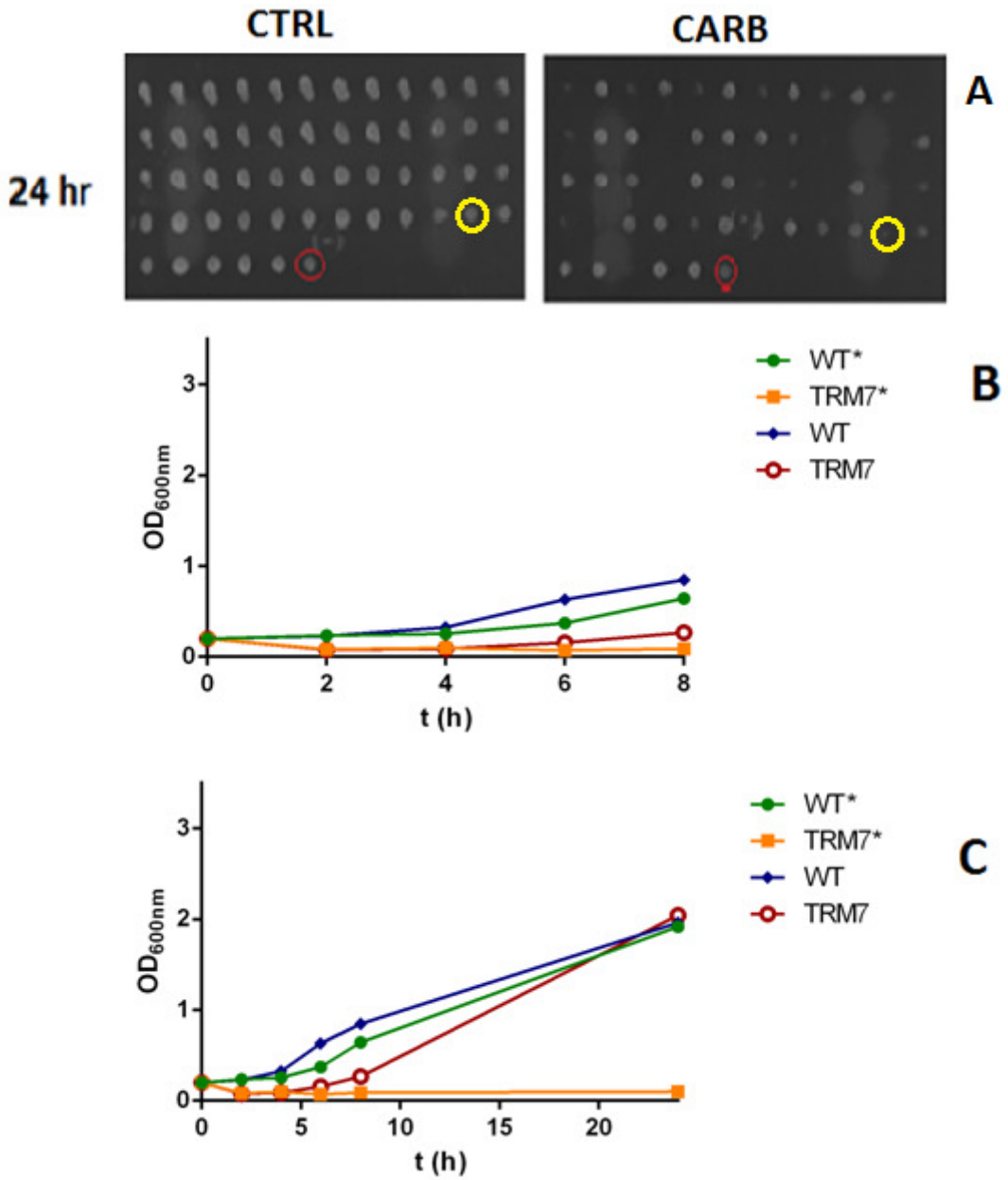



Figura 26: Tratamento do *Δtrm7* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 10mM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas. O mutante de *TRM7* apresentou uma perda da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δtrm7* está circulado em amarelo) (A). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina.

*TMR7* possui homólogo humano cuja função de 2'-O-metilação do *loop* do anticódon de tRNA é altamente conservado em eucariotos, chamado de *FTSJ1*, cujas modificações na estrutura resultam em polipeptideos truncados. Além disso, ele tem sido fortemente associado ao neuroblastoma e tumor de Ehrlich que têm uma significativa parte de seus tRNAPhe faltando as modificações Cm32 e Gm34, e

contendo m1G37 ao invés de yW (KUCHINO *et al.*, 1982). As sequencias de aminoácidos do gene *TRM7* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 40%) à sequência homóloga de humano. O FTSJ1 apresentou maior identidade (49%, *E value* $1e^{-86}$) (Figura 31).

```
putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase isoform a [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_036412.1| Length: 329 Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 290

Score          Expect  Method                        Identities      Positives       Gaps        Frame
267 bits(682)  1e-86()  Compositional matrix adjust.  153/315(49%)  199/315(63%)  30/315(9%)

Features:

Query  1    MGKSSKDKRDLYYRKAKEQGYRARSAFKLLQLNDQFHFLDDPNLKRVVDLCAAPGSWSQV  60
            MG++SKDKRD+YYR AKE G+RARSAFKLLQL+ +F       + R VDLCAAPGSWSQV
Sbjct  1    MGRTSKDKRDVYYRLAKENGWRARSAFKLLQLDKEFQLFQ--GVTRAVDLCAAPGSWSQV  58

Query  61   LSRKLFDESPSSDKEDRKIVSVDLQPMSPIPHVTTLQADITHPKTLARILKLFGNEKADF  120
            LS+K+  +          +V+VDLQ M+P+P V  +Q DIT   T   I++ F    AD
Sbjct  59   LSQKIGGQGSG------HVVAVDLQAMAPLPGVVQIQGDITQLSTAKEIIQHFKGCPADL  112

Query  121  VCSDGAPDVTGLHDLDEYVQQQLIMSALQLTACILKKGGTFVAKIFRGRDIDMLYSQLGY  180
            V  DGAPDVTGLHD+DEY+Q QL+++AL +   +LK GG FVAKIFRGRD+ +LYSQL
Sbjct  113  VVCDGAPDVTGLHDVDEYMQAQLLLAALNIATHVLKPGGCFVAKIFRGRDVTLLYSQLQV  172

Query  181  LFDKIVCAKPRSSRGTSLEAFIVCLGYNPPSNWTPKLD---VNTSVDEFFQGCFLNKLCI  237
             F  ++CAKPRSSR +S+EAF VC GY+PP  + P L    ++ S D  F     N+L
Sbjct  173  FFSSVLCAKPRSSRNSSIEAFAVCQGYDPPEGFIPDLSKPLLDHSYDPDF-----NQL--  225

Query  238  SDKLSHWNEEERNIAEFMACGSLQSFDSDATYHDLPSSVAGTSS--SLDPVQSPTNPPYK  295
                   +   R I  F+ CG L S+DSD +Y   P  + G S      P Q P +PPY+
Sbjct  226  -------DGPTRIIVPFVTCGDLSSYDSDRSY---PLDLEGGSEYKYTPPTQPPISPPYQ  275

Query  296  KALELKRSGKLTRSV  310
            +A  LKR G+L + +
Sbjct  276  EACTLKRKGQLAKEI  290
```

Figura 27: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *TRM7* da levedura *S. cerevisiae* com o FTSJ1 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLAST p para a obtenção desses resultados.

A linhagem *Δmus81* sofre grave perda de viabilidade após 8 horas de exposição à carboplatina e perde totalmente a viabilidade após 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 28). O gene *MUS81* na levedura *S. cerevisiae* é altamente conservado entre os eucariotos e está relacionado com a família de proteínas XPF, cujo principal papel em células eucarióticas é o reparo de DNA por excisão de nucleotídeos. O *MUS81* é uma endonuclease que desempenha um papel importante na manutenção da integridade do genoma nas células eucarióticas. Em células mitóticas *MUS81* contribui para o processamento dos intermediários produzidos durante a replicação do DNA na presença de lesões. Além disso *Δmus81* é sensível a agentes que danificam o DNA e que prejudicam a progressão da replicação, como a carboplatina (CICIA *et al.*, 2008; CICIA

*et al.*, 2003). Nos estudos de Hillenmeyer *et al.* (2008), um dos agentes mais importantes que causam defeito de *fitness* nos mutantes homozigotos de *Δmus81* é a cisplatina, o que está de acordo com nossos resultados (http://chemogenomics.med.utoronto.ca/fitdb/fitdb.cgi?query=YDR386W).

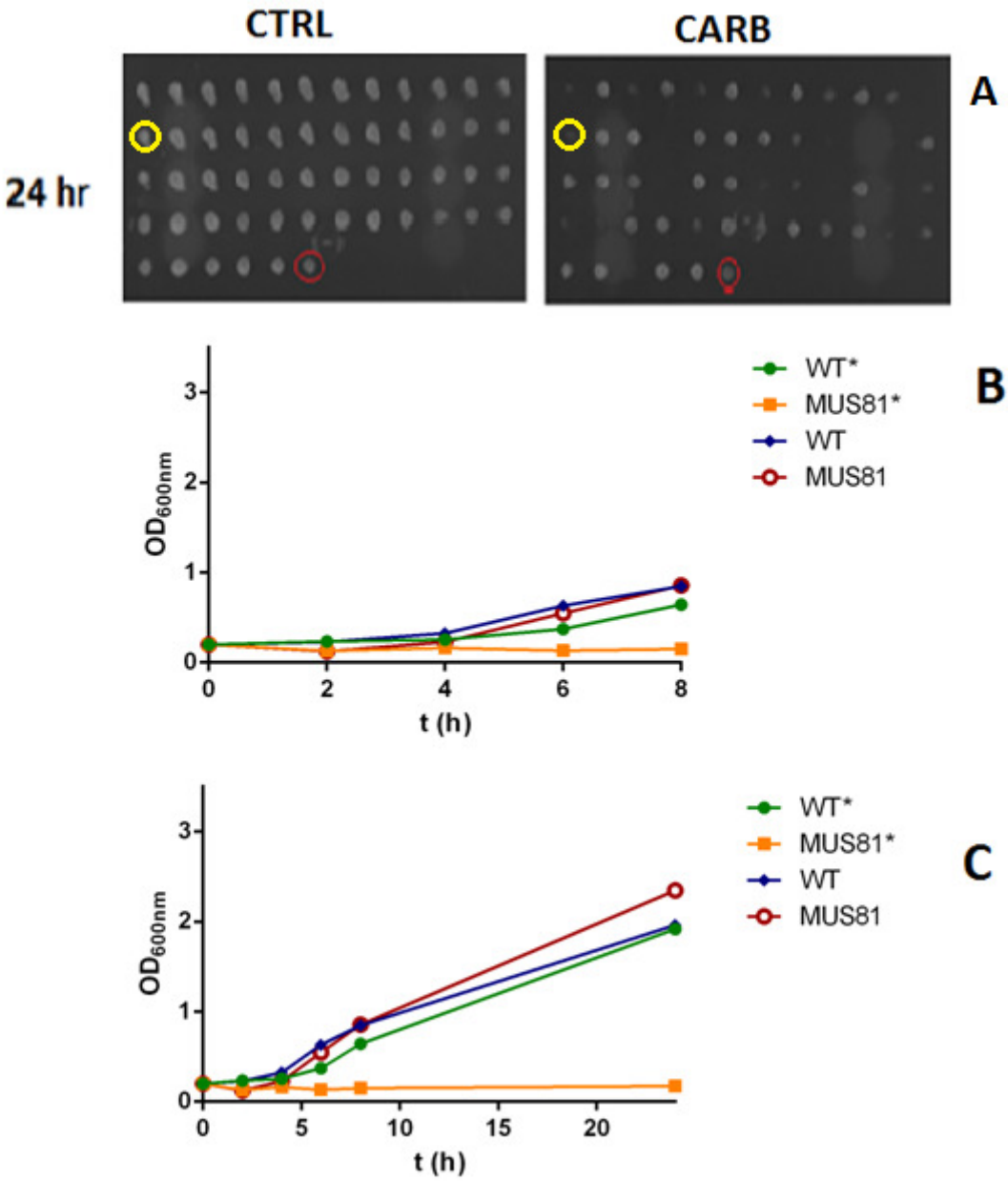



Figura 28: Tratamento do *Δmus81* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de MUS81 apresentou uma perda da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δmus81* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

As sequencias de aminoácidos do gene *MUS81*, foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 20%) às sequências homologas de humano. O MUS81 apresentou maior identidade (29%, *E value* $5e^{-22}$) (Figura 29).

```
crossover junction endonuclease MUS81 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_079404.3| Length: 551 Number of Matches: 2
Range 1: 265 to 550

Score          Expect  Method                      Identities     Positives      Gaps          Frame
100 bits(250)  5e-22()  Compositional matrix adjust.  91/317(29%)  150/317(47%)  61/317(19%)

Features:

Query  346  GDFEVFPIIDHREIKSQSDREFFSRAFERKGMKSEIRQLALGDIIWVAKNKNT-----GL  400
            G++ V   +D  E +    R    R  +R  +   +R+L +GD +WVA+  N
Sbjct  265  GEYRVLLCVDIGETRGGGHRPELLRELQRLHVTHTVRKLHVGDFVWVAQETNPRDPANPG  324

Query  401  QCVLNTIVERKRLDDLALSIRDNRFMEQKNRLEKSGCEHKYYLIEETMSGNIGNMNEALK  460
            + VL+ IVERKRLDDL  SI D RF EQK RL++ G E + YL+EE   G++ N++
Sbjct  325  ELVLDHIVERKRLDDLCSSIIDGRFREQKFRLKRCGLERRVYLVEE--HGSVHNLSLPES  382

Query  461  TALWVIL---VYYKFSMIRTCNSDET----------VEKIHALHTVISHHYS----QKDL  503
            T L  +    V   F + RT +  E+          +++++  HT+ S  +      +
Sbjct  383  TLLQAVTNTQVIDGFFVKRTADIKESAAYLALLTRGLQRLYQGHTLRSRPWGTPGNPESG  442

Query  504  IVIFPSDLKSKDDYKKVLLQFRREFERKGGIECCHNLECFQELMGKGDLKTVGELTIHVL  563
             +  P+ L S       LL F  +F   G I              K   ++V E+    L
Sbjct  443  AMTSPNPLCS-------LLTF-SDFN-AGAI--------------KNKAQSVREVFARQL  479

Query  564  MLVKGISLEKAVAIQEIFPTLNKILMAYKTCSSEEEAKLLMFNV--------LGDAPGAK  615
            M V+G+S EKA A+ + + T   +L AY  C++ +E + L+  +         LG A
Sbjct  480  MQVRGVSGEKAAALVDRYSTPASLLAAYDACATPKEQETLLSTIKCGRLQRNLGPA----  535

Query  616  KITKSLSEKIYDAFGKL  632
             ++++LS+ +Y ++G L
Sbjct  536  -LSRTLSQ-LYCSYGPL  550
```

Figura 29: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *MUS81* da levedura *S. cerevisiae* com o MUS81 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLAST p para a obtenção desses resultados.

A instabilidade cromossômica é uma característica da iniciação e progressão do tumor. Algumas regiões genômicas são particularmente instável sob estresse replicativo, cujos rearranjos nas células tumorais contribuem para o desenvolvimento do câncer. Depleção de *MUS81* afeta o processamento preciso de intermediários da replicação e também conduz a um aumento na frequência cromossômica durante a anáfase que, por sua vez favorece a acumulação de danos no DNA na G1 do ciclo celular (NAIM *et al*., 2013; NEELSEN *et al*., 2013).

A linhagem *Δybl055c* apresentou perda de viabilidade grave após 4 horas de exposição à carboplatina, sendo inviável após 6 horas de tratamento (Figuras 12 e 30). O gene *YBL055C* também conhecido como: Tat-D, é uma exonuclease e endonuclease

3'-5' com um possível papel na apoptose. Recentemente, foi sugerido que Tat-D tem um papel na degradação de DNA por apoptose em *Caenorhabditis elegans* e que a superexpressão de Tat-D facilita a morte celular (QUI *et al*., 2005).

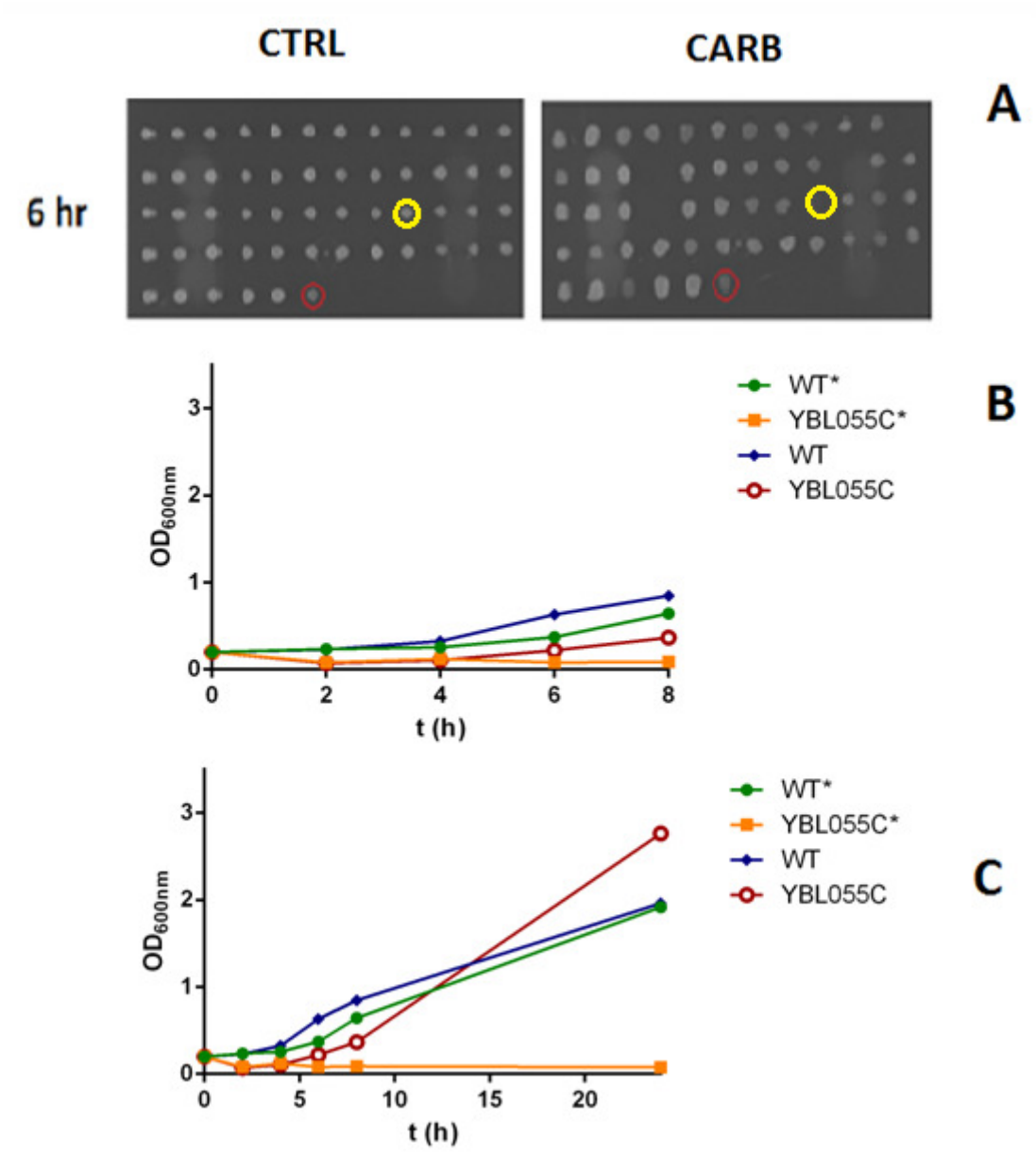



Figura 30: Tratamento do *Δybl055c* de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30 °C. (A) O mutante de YBL055C apresentou uma perda da viabilidade após 6 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δybl055c* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*YBL055C* possui homólogo humano chamado TATDN1, uma nuclease conservada em procariotas e eucariotas. Em humanos e *C. elegans* essas enzimas são nucleases participantes da degradação de DNA durante o processo apoptótico (YANG *et al*., 2012).

As sequencias de aminoácidos do gene *YBL0055C* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 30%) às sequências homólogas de humano. O TATDN1 apresentou maior identidade (33%, *E value* $3e^{-55}$) (Figura 31).

putative deoxyribonuclease TATDN1 isoform a [Homo sapiens]
Sequence ID: **ref|NP_114415.1|** Length: 297 Number of Matches: 1
Range 1: 2 to 293

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 187 bits(476) | 3e-55() | Compositional matrix adjust. | 127/383(33%) | 191/383(49%) | 91/383(23%) | |

Features:

```
Query  34   SPLKYYDIGLNLTDPMFHGIYNGKQYHPADYVKLLERAAQRHVKNALVTGSSIAESQSAI  93
            S  K+ DIG+NLTDPMF GIY G Q H  D   ++ RA +  VK  ++TG ++ +S+ A+
Sbjct  2    SRFKFIDIGINLTDPMFRGIYRGVQKHQDDLQDVIGRAVEIGVKKFMITGGNLQDSKDAL  61

Query  94   ELVSSVKDLSPLKLYHTIGVHPCCVNEFADASQGDKASASIDNPSMDEAYNESLYAKVIS  153
             L  +          + T+G HP    EF                    E  N  LY
Sbjct  62   HLAQTNG-----MFFSTVGCHPTRCGEF-------------------EKNNPDLY-----  92

Query  154  NPSFAQGKLKELYDLMNQQAKPHDTSFRSIGEIGLDYDRFHYSSKEMQKVFFEEQLKISC  213
                     LKEL +L    A+ +     +IGE GLD+DR  +  K+ Q  +FE+Q ++S
Sbjct  93   --------LKELLNL----AENNKGKVVAIGECGLDFDRLQFCPKDTQLKYFEKQFELS-  139

Query  214  LNDKLSSYPLFLHMRSACDDFVQILERFIAGFTDERDTFQLQKLGASSSSGFYKFHPDRK  273
               + +  P+FLH R++  +F+ I++R        RD    + +G
Sbjct  140  ---EQTKLPMFLHCRNSHAEFLDIMKR-------NRD----RCVGG--------------  171

Query  274  LVVHSFTGSAIDLQKLLNLSPNIFIGVNGCSLRTEENLAVVKQIPTERLLLETDAPWCEI  333
             VVHSF G+      L++L  +++IG NGCSL+TE NL V+K IP+E+L++ETDAPWC +
Sbjct  172  -VVHSFDGTKEAAAALIDL--DLYIGFNGCSLKTEANLEVLKSIPSEKLMIETDAPWCGV  228

Query  334  KRTHASFQYLAKYQEVRDFEYPAFKSVKKNKLADKLNAEELYMVKGRNEPCNMEQVAIVV  393
            K THA  +Y+            AF + KK         E  + +K RNEPC++ Q+  ++
Sbjct  229  KSTHAGSKYIRT----------AFPTKKK--------WESGHCLKDRNEPCHIIQILEIM  270

Query  394  SEVKDVDLATLIDTTWKTTCKIF  416
            S V+D D   L +T +  T K+F
Sbjct  271  SAVRDEDPLELANTLYNNTIKVF  293
```

Figura 31: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *YBL055C* da levedura *S. cerevisiae* com o TATDN1 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

Fusões envolvendo genes que participam na fusão oncogênica como TATDN1, em diversos tipos de câncer, são conhecidos por formar translocações em malignidades hematológicas (EDGREN *et al.*, 2011).

A linhagem *Δtod6* apresentou perda de viabilidade progressiva após 8 horas de exposição à carboplatina, e grave após 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 32). O gene *TOD6* codifica para uma proteína envolvida no processamento de rRNA e biogênese do ribossomo, sendo necessária para a repressão eficiente da biogênese do ribossomo após a privação de nutrientes e para a adaptação bem sucedida. Assim, essa proteína faz o controle do crescimento, já que estudos mostram que qualquer desconexão entre a percepção da disponibilidade de nutrientes celular e a disponibilidade de nutrientes no ambiente apresentam consequências deletérias (LIPPMAN e BROACH, 2009). *TOD6* não possui homólogo humano óbvio, porém possui homologo estrutural em camundongos 2D9A (Chain: A) que está relacionado com MYBL2 que codifica uma proteína chave envolvida na manutenção da integridade do genoma e é um fator de transcrição em humanos que regula a expressão de genes envolvidos na progressão do câncer.

O sistema hematopoiético é propenso a doenças relacionadas com a idade que vão desde défices funcionais nas células do sangue e com o desenvolvimento de estados neoplásicos. Estas neoplasias geralmente envolvem anomalias citogenéticas recorrentes, entre os quais uma deleção no braço longo do cromossomo 20 (onde contém o gene MYBL2) é comum em neoplasias mielóides (CLARKE *et al*., 2013; MARTINEZ *et al*., 2011). Nos estudos de Hillenmeyer *et al.* (2008), um dos agentes mais importantes que causam defeito de *fitness* nos mutantes homozigotos de *Δtod6* é a carboplatina, o que está de acordo com nossos resultados (http://chemogenomics.med.utoronto.ca/fitdb/fitdb.cgi?query=YBL055C).

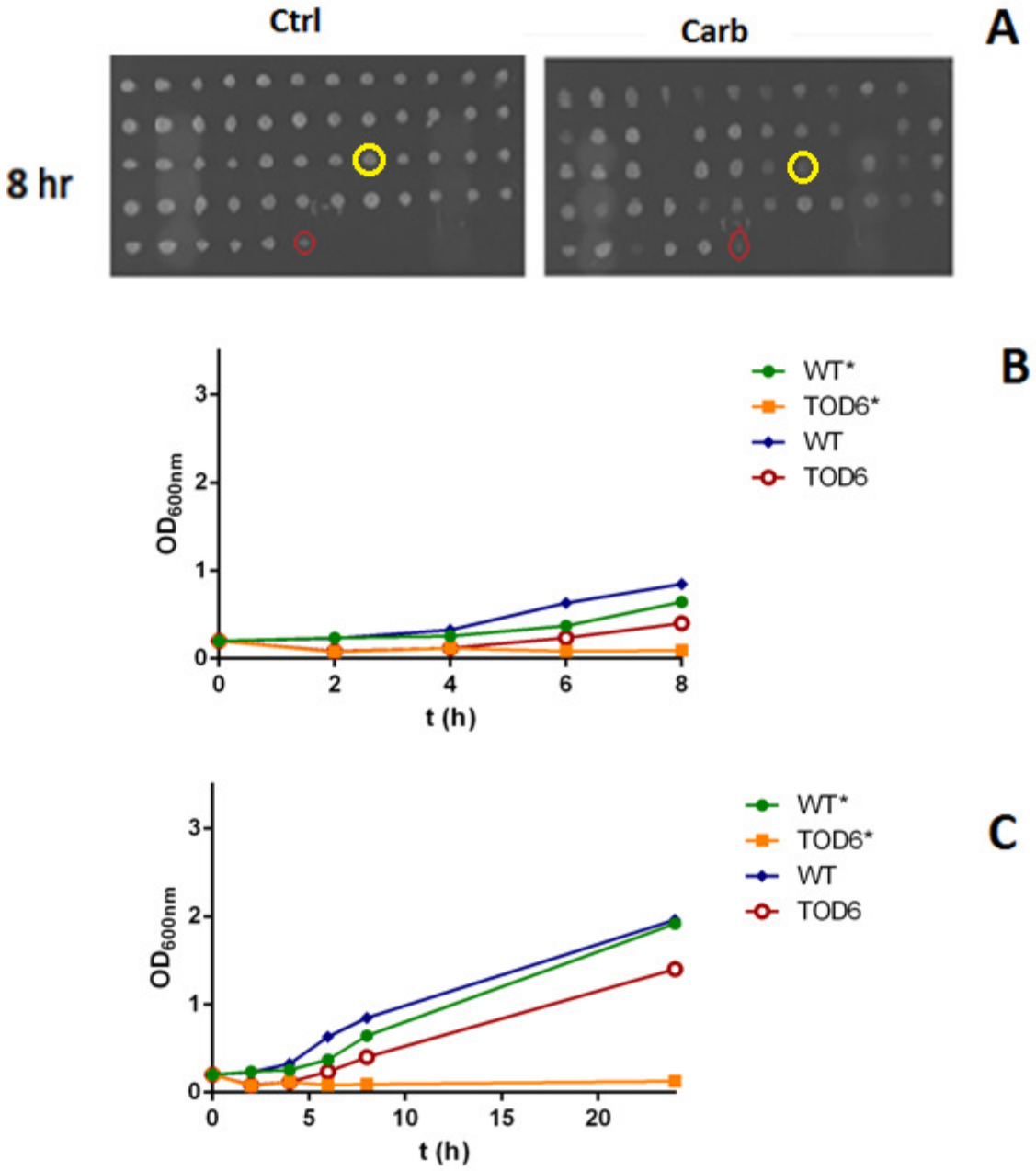



Figura 32: Tratamento do *Δ*tod6 de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de TOD6 apresentou uma perda da viabilidade após 8 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δtod6* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

A linhagem *Δcin2* apresentou perda de viabilidade progressiva após 8 horas de exposição à carboplatina, e grave após 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 33). O gene *CIN2* (de Chromosome Instability) codifica para uma Proteína GTPase de ativação para CIN4, cujos mutantes exibem aumento da perda de cromossomo e sensibilidade à

benomil (metil 1 - (butilcarbamoíl) benzimidazol-2-ilcarbamato) um agente antimitótico inibidor do crescimento de células de fungos durante a mitose. Tem sido sugerido que benomil age seletivamente sobre a tubulina e microtúbulos de células fúngicas (CLÉMENT *et al*., 2008; RATHINASAMY & PANDA, 2006). Embora CIN2 não seja essencial para a viabilidade sob condições normais, ele torna-se essencial em condições em que os níveis de polipeptídeos de tubulina dissociadas aumentam o que gera uma instabilidade cromossômica (TIAN *et al*., 1996). CIN2 encontra-se nas leveduras *S. kudriavzevii* e *S. cerevisiae.* Porém possui uma proteína GTPase-ativação (GAP) conservada em humanos que é responsável pelo rompimento de filamentos de actina e demonstra ter características homólogas ao complexo RP2 (retinite pigmentosa 2), gene responsável por uma variante particular de uma doença ocular ligada a perda cromossômica, que pode ser correlacionada com sua capacidade para complementar um fenótipo de supressão de CIN2 (VELTEL *et al.*, 2008).

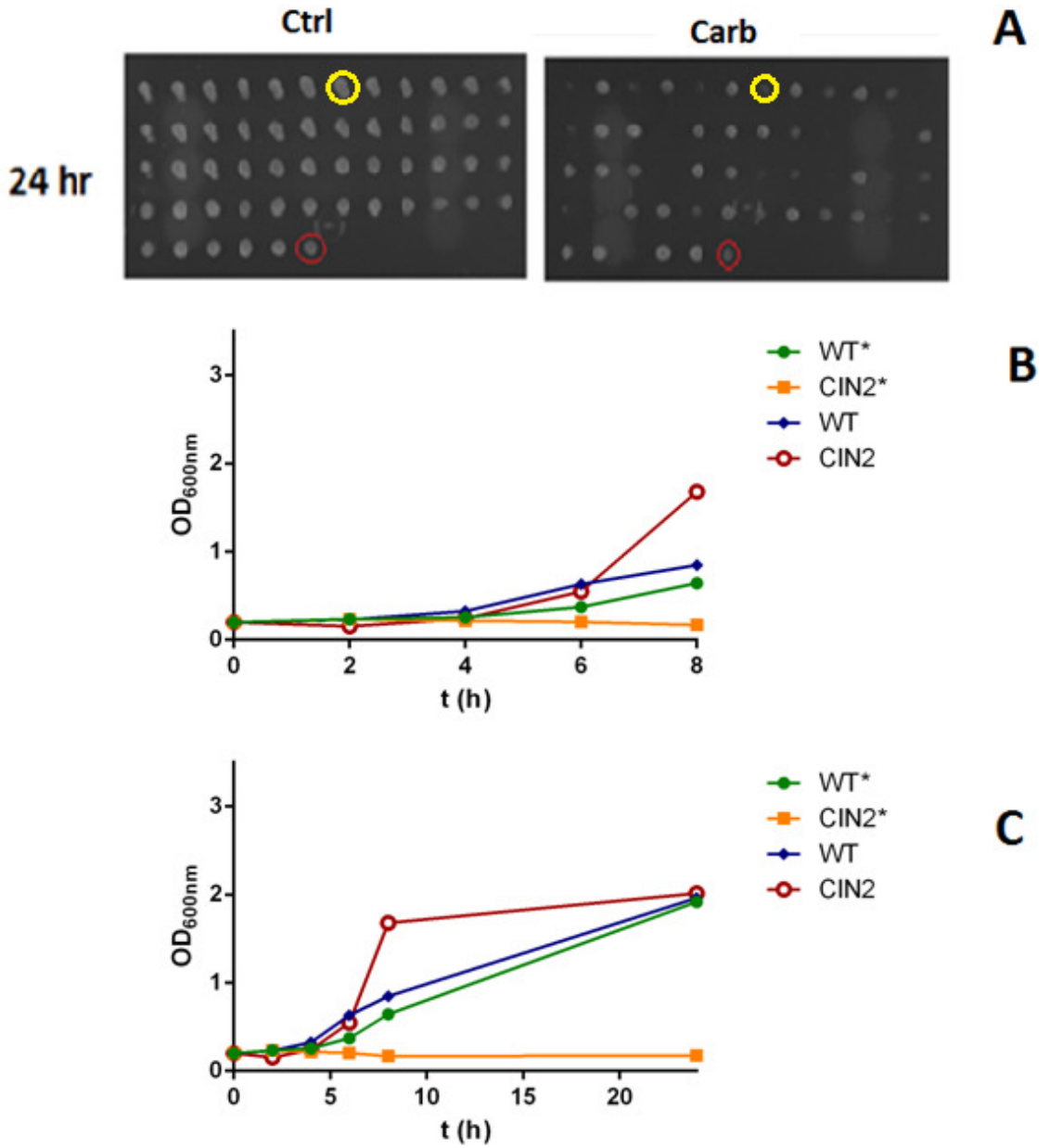



Figura 33: Tratamento do *Δ*cin2 de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de CIN2 apresentou uma perda da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δcin2* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

A linhagem *Δeaf3* apresentou perda de viabilidade grave após 8 horas de exposição à carboplatina, e tornou-se inviável após 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 34). O gene *EAF3* é codificador de um componente do complexo acetiltransferase de histonas NuA4 e Rpd3S, uma desacetilase de histonas em *S. cerevisiae*. Ele está envolvido na regulação da acetilação de histonas, que distingue os promotores de

regiões codificadoras. Evidências genéticas e bioquímicas mostraram que Eaf3p desempenha um papel importante na regulação do perfil gênico da acetilação de histonas H3 e H4, cuja perda conduz ao aumento da acetilação nessas regiões H3 e H4 e diminuição da codificação em promotores, resultando em uma distribuição uniforme da acetilação das histonas em todo o genoma (SUN *et al*., 2008). Nos estudos de Hillenmeyer *et al.* (2008), um dos agentes que causam maior defeito de *fitness* nos mutantes homozigotos de *Δeaf3* é a oxaliplatina, o que está de acordo com nossos resultados (http://chemogenomics.med.utoronto.ca/fitdb/fitdb.cgi?query=YPR023C).

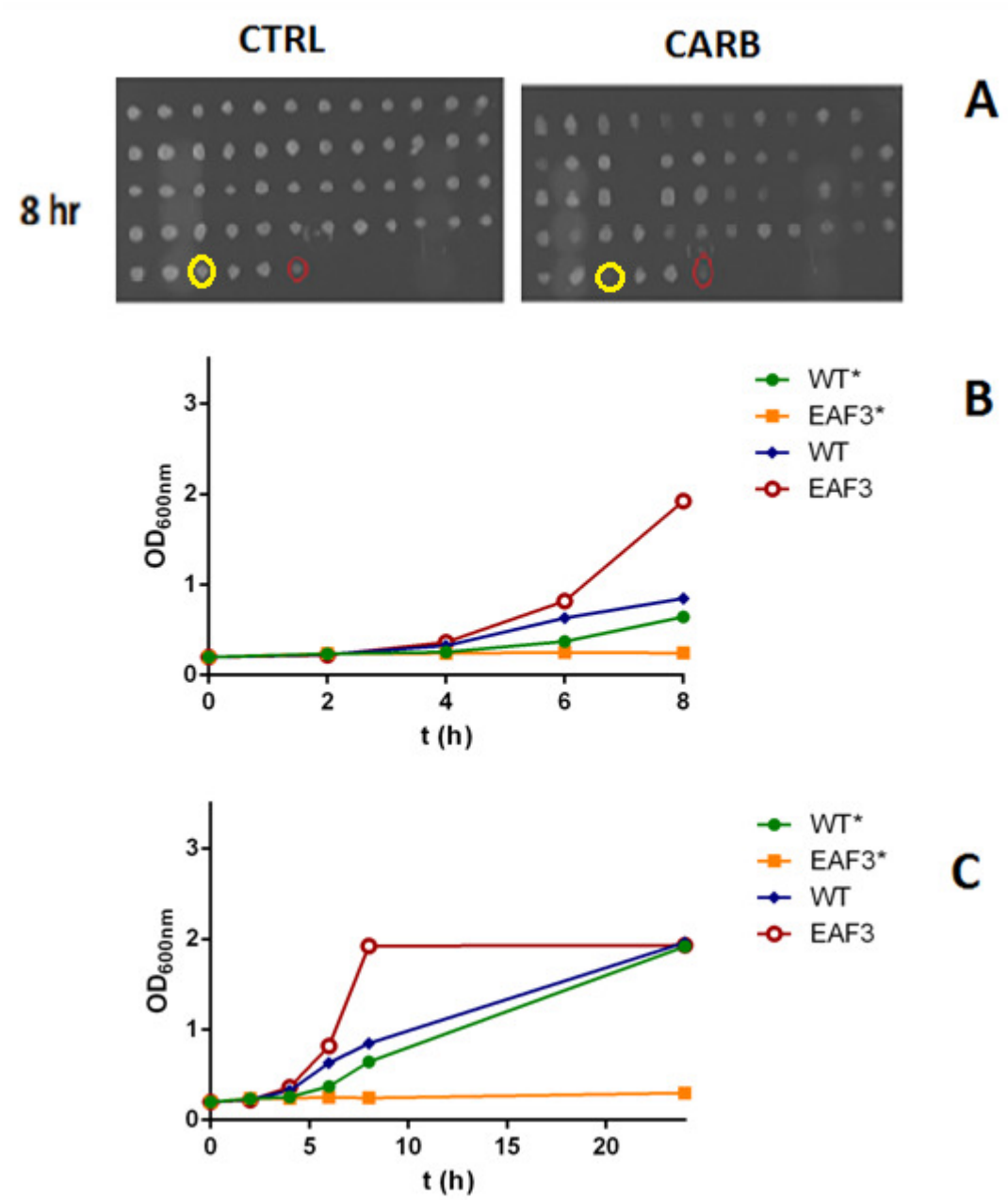



Figura 34: Tratamento do *Δ*eaf3 de *S. cerevisiae*, sensível a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados sensíveis a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com

ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de EAF3 apresentou uma perda da viabilidade após 6 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δeaf3* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*EAF3* possui homólogo humano chamado *MORF4L1,* que codifica uma proteína nuclear envolvida na indução de apoptose celular e reparo de danos ao DNA. MORF4L1 é um modulador da cromatina, e está presente em complexos contendo histona acetiltransferases (HATs), bem como histona desacetilases (HDACs) (LIANG *et al*., 2010).

As sequencias de aminoácidos do gene *EAF3* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 40%) às sequências homólogas de humano. O MORF4L1 apresentou maior identidade (27%, *E value* $2e^{-37}$) (Figura 35).

mortality factor 4-like protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_006782.1| Length: 323 Number of Matches: 1
Range 1: 6 to 310

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 140 bits(353) | 2e-37() | Compositional matrix adjust. | 102/377(27%) | 169/377(44%) | 73/377(19%) | |

Features:

```
Query  3    DLEQEFALGGRCLAFHGPLMYEAKILKIWDPSSKMYTSIPNDKPGGSSQATKEIKPQKLG  62
            D + +F  G R L FHGPL+YEAK +K+                    +   K++K
Sbjct  6    DPKPKFQEGERVLCFHGPLLYEAKCVKV-------------------AIKDKQVK-----  41

Query  63   EDESIPEEIINGKCFFIHYQGWKSSWDEWVGYDRIRAYNEENIAMKKRLANEAKEAKKSL  122
                          +FIHY GW  +WDEWV   R+  Y + N+  ++ L       +K+
Sbjct  42   --------------YFIHYSGWNKNWDEWVPESRVLKYVDTNLQKQREL-------QKAN  80

Query  123  LEQQKKKKLSTSLGGPSNGGKRKGDSRSNASISKSTSQSFLTSSVSGRKSGRSSANSLHP  182
             EQ  + K+     G + G K  G  + N  +    ++        G   G S++ +  P
Sbjct  81   QEQYAEGKMR----GAAPGKKTSGLQQKNVEVKTKKNKQ----KTPGNGDGGSTSETPQP  132

Query  183  GSSLRSSSDQNGNDDRRRSSSLSPNMLHHIAGYPTPKISLQIPIKLKSVLVDDWEYVTKD  242
                           R++ + + P + +         ++ ++IP +LK  LVDDW+ +T+
Sbjct  133  --------------PRKKRARVDPTVENEETFMNRVEVKVKIPEELKPWLVDDWDLITRQ  178

Query  243  KKICRLPADVTVEMVLNKYEHEVSQELESPGSQSQLSEYCAGLKLYFDKCLGNMLLYRLE  302
            K++  LPA   V+ +L  Y +          +   +  ++E  AG+K YF+  LG  LLY+ E
Sbjct  179  KQLFYLPAKKNVDSILEDYANYKKSRGNTDNKEYAVNEVVAGIKEYFNVMLGTQLLYKFE  238

Query  303  RLQYDELLKKSSKDQKPLVPI-RIYGAIHLLRLISVLPELISSTTMDLQSCQLLIKQTED  361
            R QY E+L        P  P+ ++YGA HLLRL   +  +++ T +D +S  LL+    D
Sbjct  239  RPQYAEILA-----DHPDAPMSQVYGAPHLLRLFVRIGAMLAYTPLDEKSLALLLNYLHD  293

Query  362  FLVWLLMHVDEYFNDKD  378
            FL +L  +    F+  D
Sbjct  294  FLKYLAKNSATLFSASD  310
```

Figura 35: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *EAF3* da levedura *S. cerevisiae* com o MORF4L1 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

GENES ASSOCIADOS À SENSIBILIDADE A CARBOPLATINA.

### 6.1.4 Genes associados à sensibilidade a carboplatina envolvidos na degradação de proteínas

Na figura 36 identificamos três das 9 linhagens que mantiveram sua viabilidade no decorrer das 24 horas com crescimento aumentado quando comparada com a linhagem não tratada.

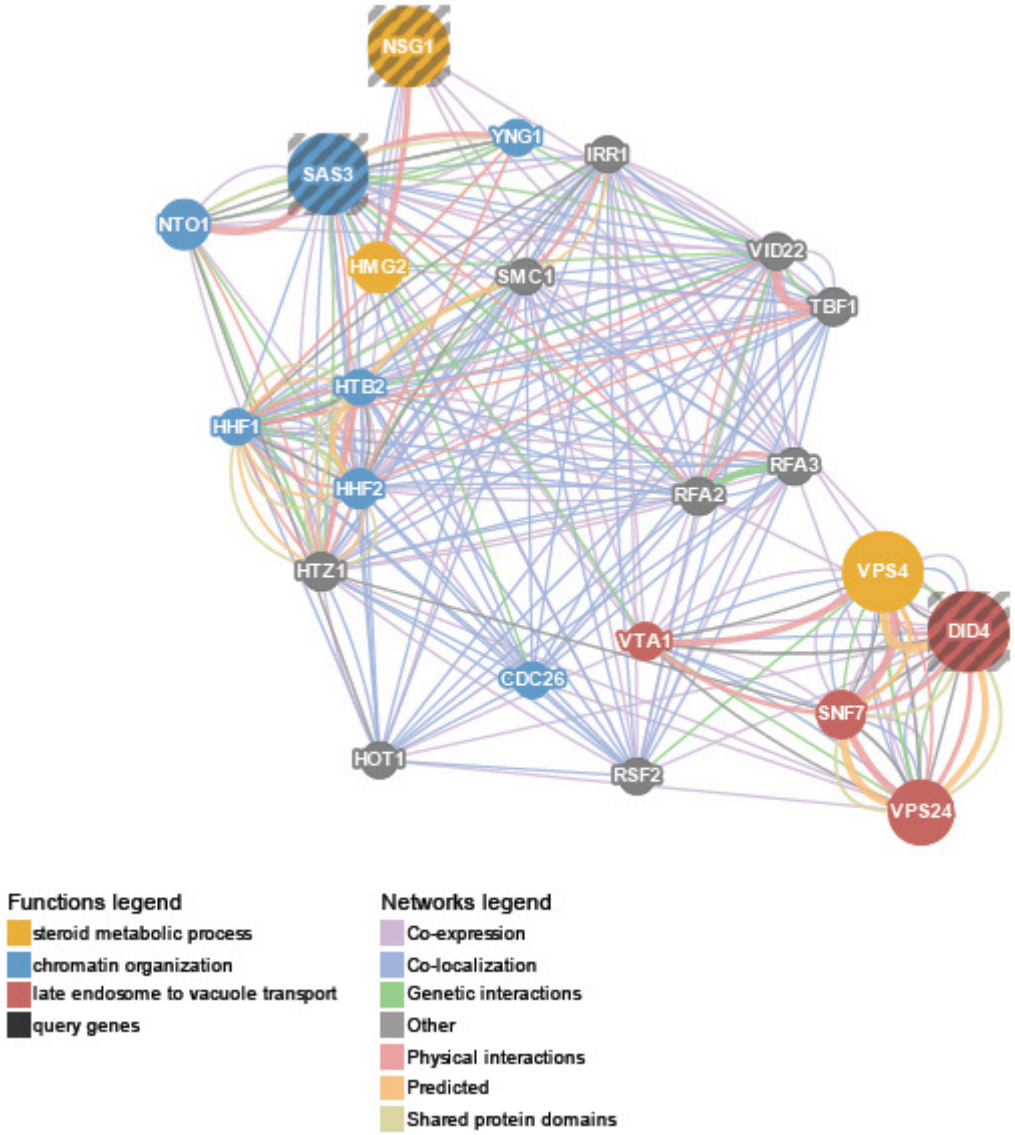



Figura 36: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *NSG1*, *DID4* e *SAS3*. Todas as linhagens aumentaram sua viabilidade após 24 horas de exposição a carboplatina.

A linhagem *Δnsg1* manteve a viabilidade mesmo após 24 horas de exposição à carboplatina (Figuras 12 e 37), porém sua taxa de crescimento foi elevada pelo tratamento (Figura 37B e C). O gene *NSG1* na levedura codifica para uma proteína que inibe a degradação de Hmg2p de uma forma altamente específica, pela interação direta com o domínio de esterol na região transmembranar. A regulação da via de esterol é crítica para a manutenção da homeostase fisiológica e da função das membranas celulares. Um passo limitante da velocidade na via de síntese de colesterol é catalisada por HMGR2 (THEESFELD & HAMPTON, 2012).

*NSG1* possui como homólogo mais próximo em mamíferos as proteínas INSIG (homologia descrita na base de dados do SGD <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?dbid=S000001175>), que são fundamentais para a regulação de esterol e necessárias para a degradação de HMG-CoA redutase (HMGR). Ligação de INSIG com oxisteróis podem influenciar a proliferação de oxisteróis, que demonstraram interferir com a proliferação e causar a morte de muitos tipos de células cancerígenas, tais como leucemia, glioblastoma, do cólon, da mama e células de câncer da próstata (FLURY *et al*., 2005; WEILLE *et al*., 2013).

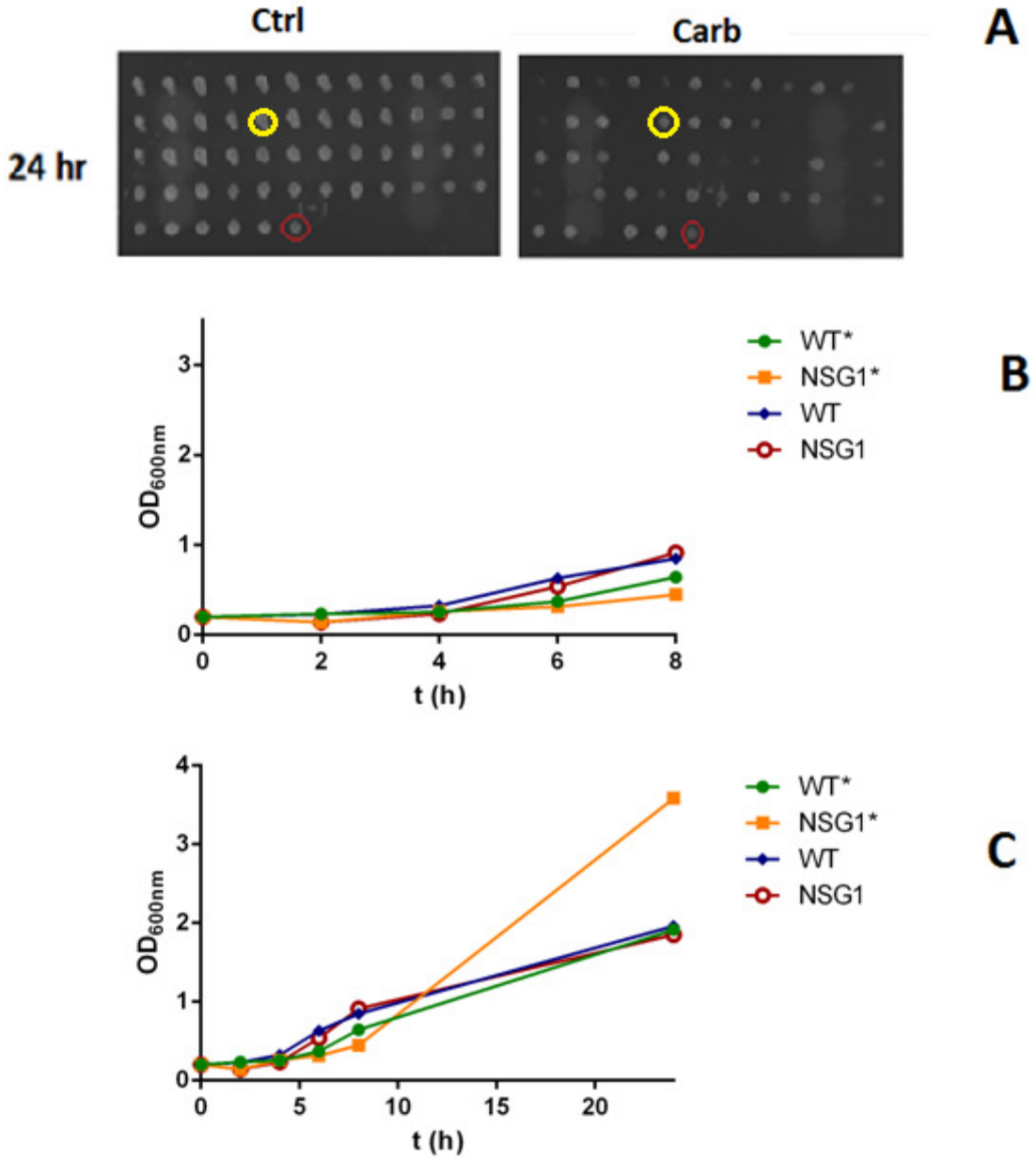



Figura 37: Tratamento do *Δ*nsg1 de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistentes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de NSG1 apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δnsg1* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

A linhagem *Δdid4* manteve a viabilidade mesmo após 24 horas de exposição à carboplatina (Figuras 12 e 38), porém sua taxa de crescimento foi elevada pelo tratamento (Figura 38B e C). O gene *DID4* codifica uma enzima de desubiquitinação, ou seja, é uma enzima "desconjugadora" de ubiquitina (DUB) e está envolvida na endocitose e no direcionamento vacuolar de proteínas em leveduras. Komada *et al.*, (2008), destacou a possível importância das DUBs no mecanismo de endocitose e

degradação pelo lisossomo dos receptores de tirosina quinase (RTKs) que quando ativados sofrem regulação negativa para evitar o crescimento excessivo de células tumorais.

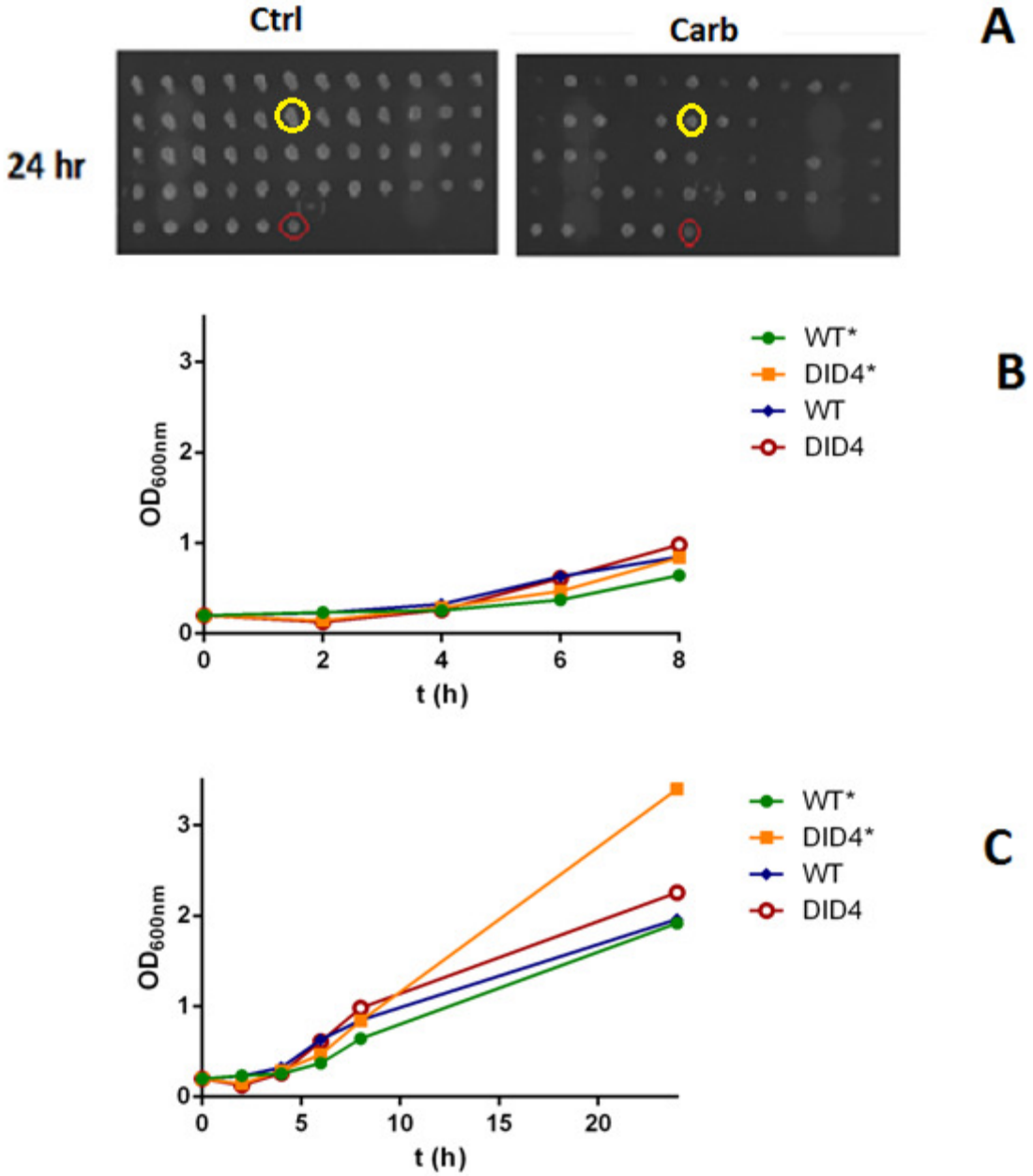



Figura 38: Tratamento do *Δ*did4 de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistentes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *DID4* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δdid4* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

*DID4* possui homólogo humano chamado CHMP2A uma proteína que faz parte do complexo ESCRT-III (complexo de triagem endossomal III necessária para o transporte), que está envolvido na degradação de receptores de superfície e formação de corpos multivesiculares endocíticos (MVBs). Acredita-se que CHMP2A esteja envolvida nas etapas tardias de brotamento de vesículas, sob o controle de VPS4 que recicla ESCRT-III a partir de membranas celulares (TSANG *et al*., 2006).

As sequencias de aminoácidos do gene *DID4* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 30%) às sequências homólogas de humano. O CHMP2A foi a proteína humana que apresentou maior identidade (46%, *E value* $1e^{-49}$) (Figura 39).

charged multivesicular body protein 2a [Homo sapiens]
Sequence ID: **ref|NP_055268.1|** Length: 222 Number of Matches: 1

**See 1 more title(s)**
Range 1: 1 to 183

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 165 bits(417) | 1e-49() | Compositional matrix adjust. | 85/184(46%) | 139/184(75%) | 1/184(0%) | |

Features:

```
Query  4    FEWVFGKNVTPQERLKKNQRALERTQRELEREKRKLELQDKKLVSEIKKSAKNGQVAAAK  63
             + +FG+  TP+E L++NQRAL R  REL+RE++KLE Q+KK++++IKK AK GQ+ A +
Sbjct  1    MDLLFGRRKTPEELLRQNQRALNRAMRELDRERQKLETQEKKIIADIKKMAKQGQMDAVR  60

Query  64   VQAKDLVRTRNYIQKFDNMKAQLQAISLRIQAVRSSDQMTRSMSEATGLLAGMNRTMNLP  123
            + AKDLVRTR Y++KF  M+A +QA+SL+IQ ++S++ M ++M   T  +  MNR + LP
Sbjct  61   IMAKDLVRTRRYVRKFVLMRANIQAVSLKIQTLKSNNSMAQAMKGVTKAMGTMNRQLKLP  120

Query  124  QLQRISMEFEKQSDLMGQRQEFMDEAIDNVMGDEVDEDEEADEIVNKVLDEIGVDLNSQL  183
            Q+Q+I MEFE+Q+++M  ++E M++AID+    + +++EE+D +V++VLDE+G+ L  +L
Sbjct  121  QIQKIMMEFERQAEIMDMKEEMMNDAIDDA-MGDEEDEEESDAVVSQVLDELGLSLTDEL  179

Query  184  QSTP  187
             + P
Sbjct  180  SNLP  183
```

Figura 39: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *DID4* da levedura *S. cerevisiae* com o CHMP2A em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

Assim como as anteriores, a linhagem *Δsas3* teve maior adaptação e apresentou resistência ao tratamento com carboplatina (Figura 40). O gene *SAS3* codifica um dos membros da família de histona acetiltransferases que funciona como um silenciador de transcrição. Esse mecanismo é crucial para o controle do ciclo celular. Além disso, a Sas3 apresentou possível interação física com a Chk1 uma quinase efetora em resposta a

danos no DNA que medeia à parada do ciclo celular mitótico (LIU *et al*., 2000). O Δ*sas3* é tolerante à aneuploidia. Na maioria das células cancerosas aneuploidia é comum, tipicamente envolvendo muitos cromossomos. Apesar da alta incidência de aneuploidia em tumores, o seu papel na tumorigênese permanece incerto (TORRES *et al*., 2010).

*SAS3* possui homólogo humano MOZ (*Monocytic leukemia zinc finger protein*) proto-oncogene que funciona como uma histona acetiltransferase, interage com o supressor de tumor p53 induzindo ao dano no DNA e age como um regulador transcricional (TAM *et al*., 2013).

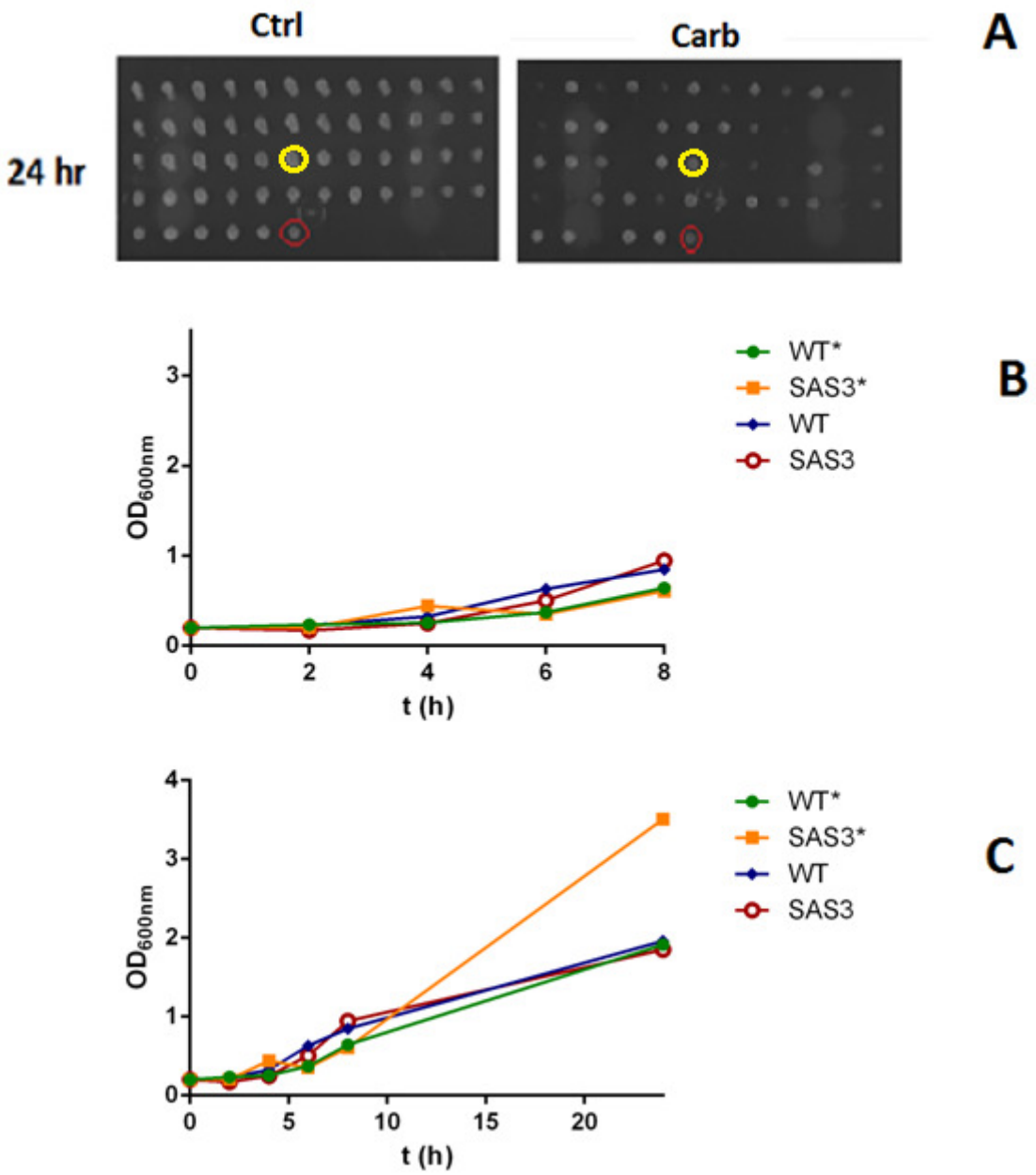



Figura 40: Tratamento do *Δ*sas3 de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistenes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A)O mutante de *SAS3* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δsas3* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

### 6.1.5 Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos na progressão do ciclo celular

Nas figuras 41 encontramos 2 produtos gênicos *PIN4* e *KTI12* envolvidos principalmente no mecanismo de reparo do DNA e na progressão do ciclo celular. Esse resultado corrobora com nossas expectativas já que esses mecanismos são conhecidos

como atuantes na tumorigênese, portanto mutações em genes que estão diretamente associados a esses mecanismos podem gerar certa dificuldade na atuação da droga dentro da célula, bem como sua ligação direta no DNA.

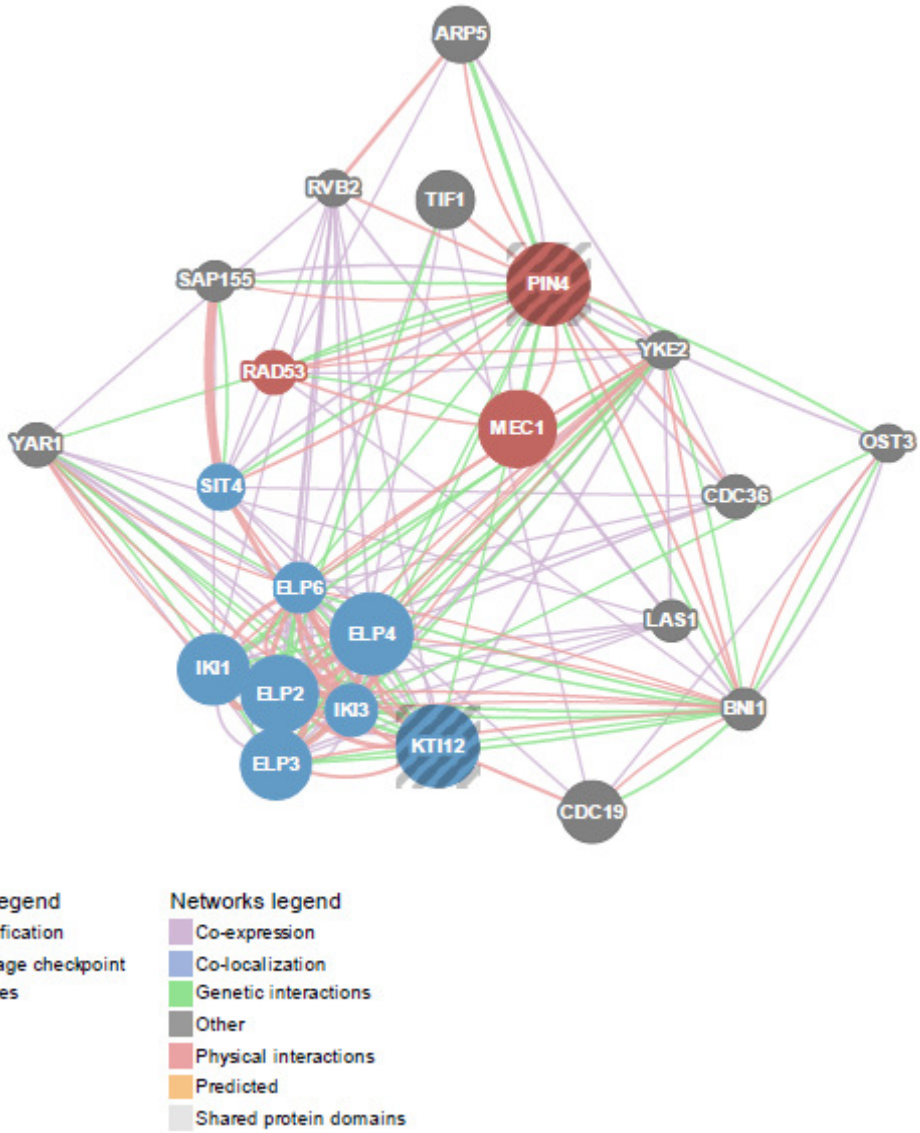



Figura 41: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *PIN4* e *KTI12*. Todas as linhagens aumentaram sua viabilidade após 24 horas de exposição a carboplatina.

O mutante *Δpin4* apresentou notável resistência à carboplatina (Figuras 12 e 42). O gene *PIN4* também chamado de *MDT1* codifica uma proteína que está envolvida no dano ao DNA e na progressão do ciclo celular normal na fase G2/M. A superexpressão de *PIN4* juntamente com uma deleção de *RAD53* é letal para a célula, enquanto que a exclusão de *PIN4* suprime parcialmente os danos no DNA causados pela hipersensibilidade de cepas com *checkpoint* comprometido e geralmente melhora a

tolerância a danos no DNA. Na ausência de danos no DNA, *PIN4* conduz à eliminação e conclusão da anáfase atrasada, com uma morfologia celular alongada lembra a dos mutantes do ciclo celular G2/M (PIKE *et al*., 2004). *PIN4* possui homólogo humano estrutural com CstF-64 (*Cleavage stimulation factor 64 Kda subunit*) complexo de proteína heterotrimérica associado a poliadenilação. Reconhece regiões ricas em GU no mRNA eucarióticos (fonte PDB: 1P1T).

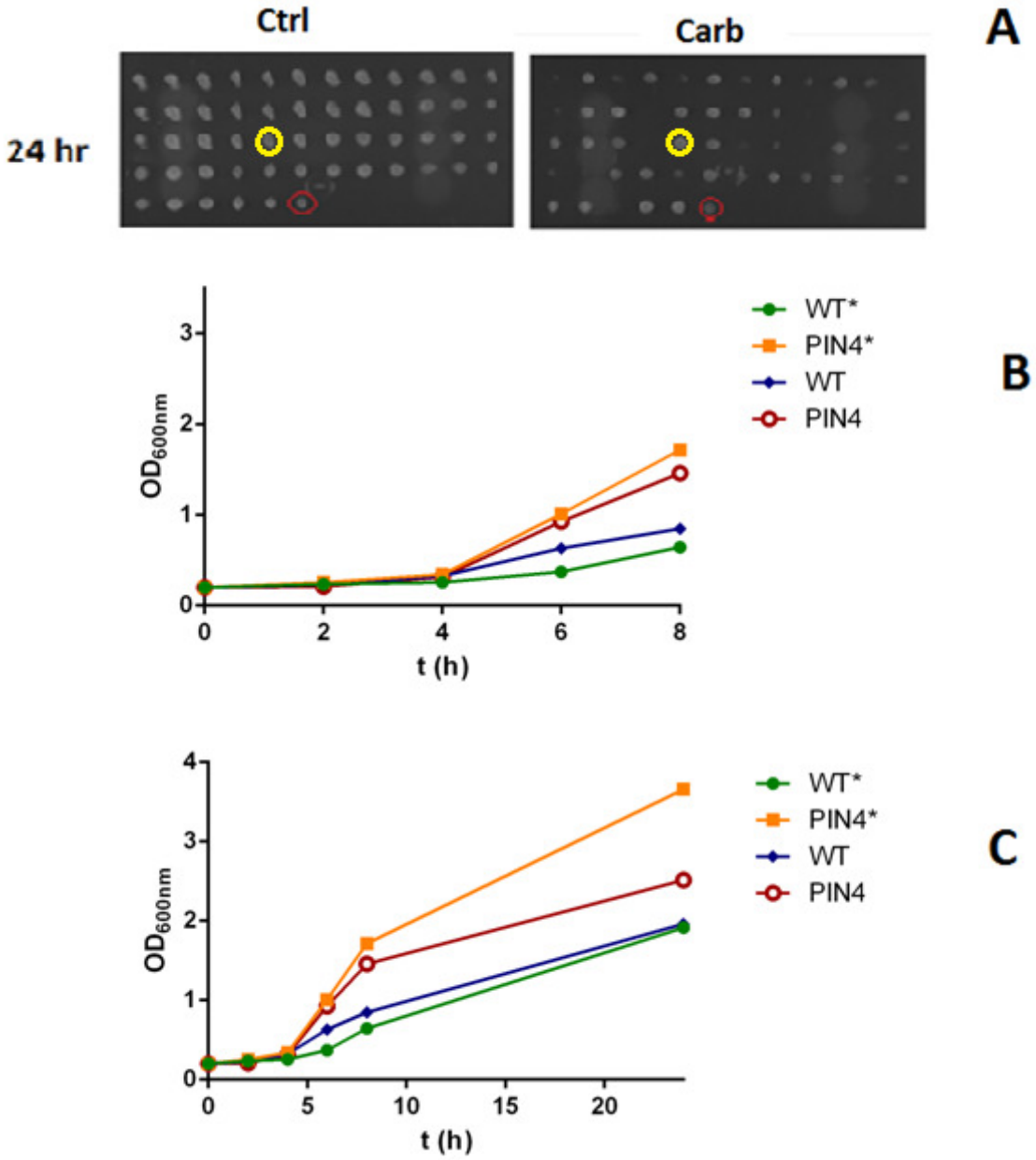



Figura 42: Tratamento do *Δpin4* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistenes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *PIN4* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de

tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δpin4* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

O mutante *Δkti12* foi também um dos mais resistentes e adaptados ao tratamento com carboplatina (Figuras 12 e 43). O gene *KTI12* codifica um produto que em conjunto com o complexo de elongação realiza modificação nos nucleotídeos em oscilação no tRNA e é altamente conservado entre os eucariotos. O produto do gene *KTI12* interage fisicamente com as subunidades do Elongator que tem sido relatado como sendo um complexo de histona acetiltransferase envolvido no alongamento da transcrição por RNA polimerase II. *KTI12* também têm sido associado na síntese de tRNA, de 5-metoxicarbonilmetil (mCm5) e 5-carbamoilmetil (nCm5) grupos presentes em uridinas na posição de oscilação. A presença de mCm5U, nCm5U, ou dos seus derivados na posição de oscilação é necessária para a tradução fiel e eficiente, o que sugere que os fenótipos mutantes de *KTI12* podem ser causados por um defeito de tradução (HUANG *et al*., 2005).

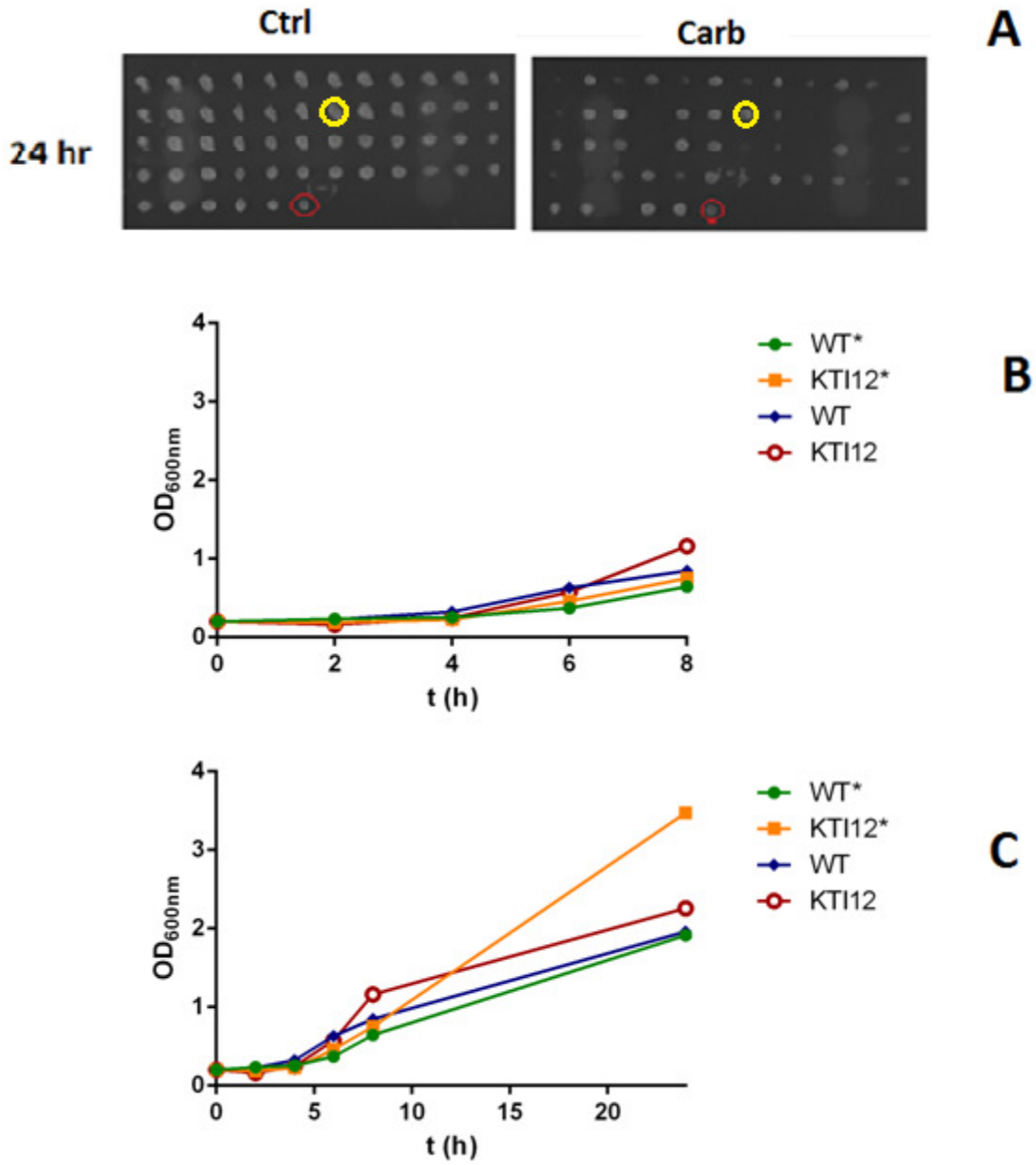



Figura 43: Tratamento do *Δkti12* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistenes a 10mM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas. O mutante de *KTI12* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δkti12* está circulado em amarelo) (A). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina.

A sequencia de aminoácidos do gene *KTI12* foi analisada por BLAST e apresentou identidade (> 50%) às sequências homólogas de humano. O KTI12 foi a proteína humana que apresentou maior identidade (36%, *E value* $4e^{-17}$) (Figura 44).

protein KTI12 homolog [Homo sapiens]

Sequence ID: **ref|NP_612426.1|** Length: 354 Number of Matches: 2

Range 1: 1 to 110

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 80.9 bits(198) | 4e-17() | Compositional matrix adjust. | 42/116(36%) | 67/116(57%) | 6/116(5%) | |

Features:

```
Query  1    MPLVLFTGYPCSGKTTLAKHLVQLLQSKIDATPSLSKYSITYHSDESLGIKHSDYITSQD  60
            MPLV+F G P SGK+  A+ L   L ++  A   +   ++    D ++      Y  S
Sbjct  1    MPLVVFCGLPYSGKSRRAEELRVALAAEGRAVYVVDDAAVLGAEDPAV------YGDSAR  54

Query  61   ERKLRSEIISAVKRDLSKNKIVIVDSLNYIKGFRYQLHCEVKNLSTTFCVIQTLCP  116
            E+ LR  + ++V+R LS++ +VI+DSLNYIKGFRY+L+C  +   T  C++  + P
Sbjct  55   EKALRGALRASVERRLSRHDVVILDSLNYIKGFRYELYCLARAARTPLCLVYCVRP  110
```

Range 2: 204 to 354

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 65.9 bits(159) | 6e-12() | Compositional matrix adjust. | 47/184(26%) | 90/184(48%) | 35/184(19%) | |

Features:

```
Query  132  WEPELLNQLIQRYEEPNSSNRWDSPLFAILTPQDNITDYIDDICKVVFQTSKSAKNSGHN  191
            + PELL  L  R+E P+S NRWD PLF ++  ++ +   +  I   +F+
Sbjct  204  YSPELLEALTLRFEAPDSRNRWDRPLFTLVGLEEPLP--LAGIRSALFENRAP-------  254

Query  192  DPLSKGLQKPNSATVLKPASQSNFIQVLDIETSKIIKTIMNHIKSLTSIGGVSNGTRVIV  251

                     P+ +T  +P +  +F+  LD  TS+++  +M   KS  ++ G      ++
Sbjct  255  --------PPHQSTQSQPLASGSFLHQLDQVTSQVLAGLMEAQKS--AVPG-----DLLT  299

Query  252  SEGITDINDDGCFFVDLPIGNVVTLAQLQRLKRQFINFNKLRDIDQD--RIGPLFADYLN  309
              G T+          L     +T+A+L RL+RQFI++ K+   +++  ++  +F  YL+
Sbjct  300  LPGTTE---------HLRFTRPLTMAELSRLRRQFISYTKMHPNNENLPQLANMFLQYLS  350

Query  310  KNLN  313
            ++L+
Sbjct  351  QSLH  354
```

Figura 44: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *KTI12* da levedura *S. cerevisiae* com KTI12 de humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

### 6.1.6 Genes associados à resistência a carboplatina envolvidos com a funcionalidade do ribossomo

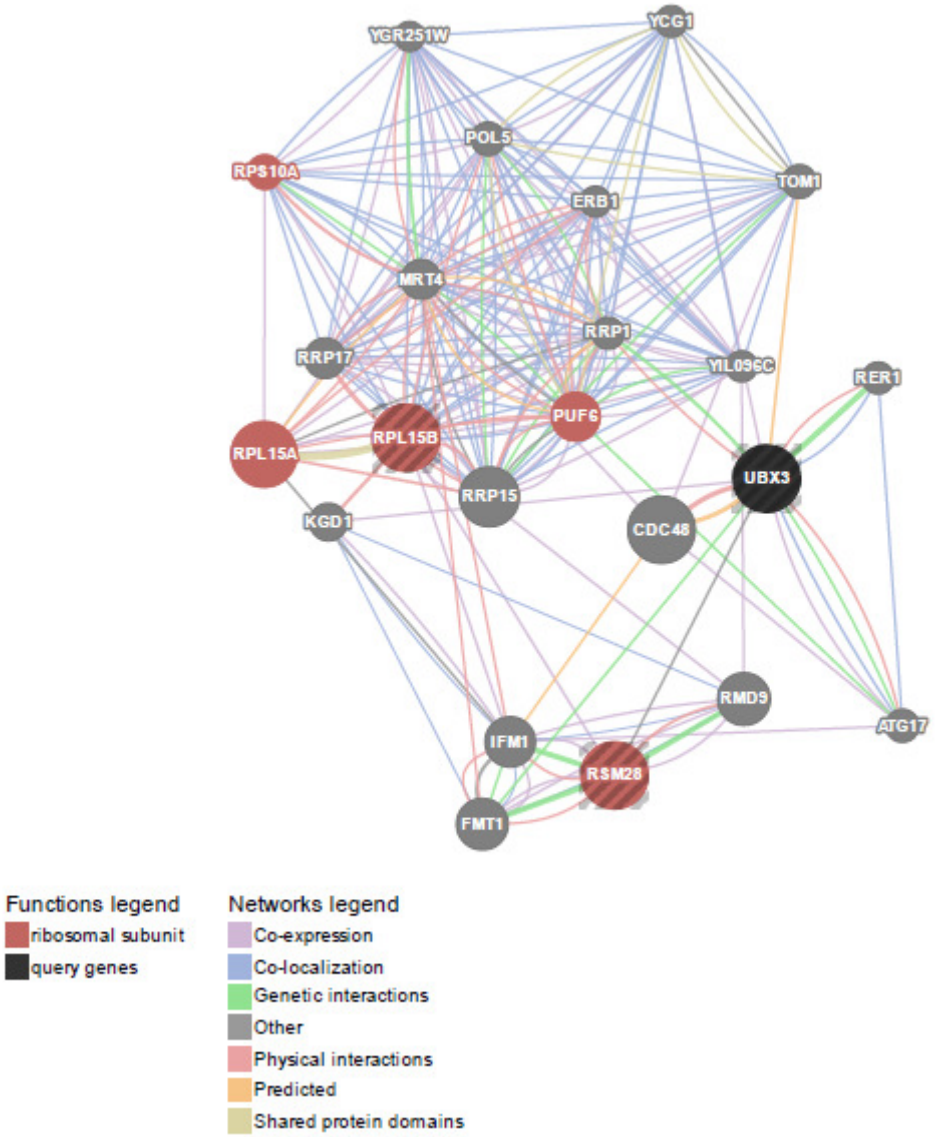



Figura 45: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta resistência a carboplatina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *RPL15B, RSM28* e *UBX3*. Todas as linhagens aumentaram sua viabilidade após 24 horas de exposição a carboplatina.

A linhagem *Δrpl15b* mostrou-se resistente ao tratamento com carboplatina (Figuras 12 e 46). O gene *RPL15B* codifica a proteína L15B da subunidade 60S ribossomal na levedura *S. cerevisiae* é altamente conservado entre os eucariotos (RPL15). O ribossomo assegura a decodificação da informação genética contida no RNA mensageiro e a formação de ligações peptídicas. Dos quatro rRNAs presentes nos

ribossomos eucarióticos L15B liga-se ao rRNA 5.8S (JENNER *et al.*, 2012). Essa proteína se relocaliza no nucléolo em condições de estresse no processo de replicação de DNA (TKACH *et al.*, 2012).

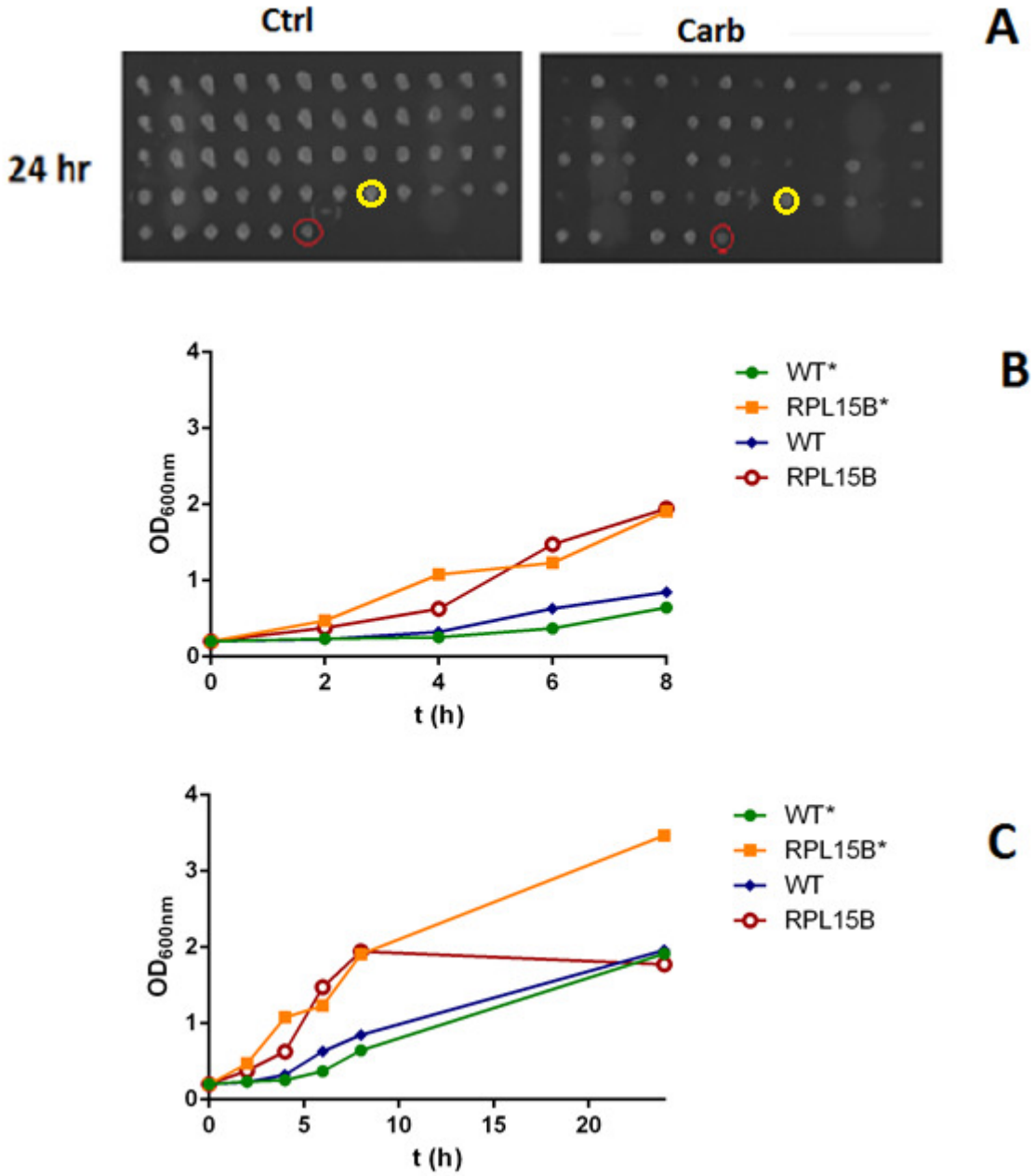



Figura 46: Tratamento do *Δ*rpl15b de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistentes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *RPL15B* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δrpl15b* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

As sequencias de aminoácidos do gene *RPL15B* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 70%) às sequências homólogas de humano. O RPL15 foi a proteína humana que apresentou maior identidade (72%, *E value* $2e^{-104}$) (Figura 47).

60S ribosomal protein L15 isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: **ref|NP_002939.2|** Length: 204 Number of Matches: 1

**See 4 more title(s)**
Range 1: 1 to 204

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 303 bits(777) | 2e-104() | Compositional matrix adjust. | 146/204(72%) | 170/204(83%) | 1/204(0%) | |

Features:

```
Query  1    MGAYKYLEELERKKQSDVLRFLQRVRVWEYRQKNVIHRAARPTRPDKARRLGYKAKQGFV  60
            MGAYKY++EL RKKQSDV+RFL RVR W+YRQ + +HRA RPTRPDKARRLGYKAKQG+V
Sbjct  1    MGAYKYIQELWRKKQSDVMRFLLRVRCWQYRQLSALHRAPRPTRPDKARRLGYKAKQGYV  60

Query  61   IYRVRVRRGNRKRPVPKGATYGKPTNQGVNELKYQRSLRATAEERVGRRAANLRVLNSYW  120
            IYR+RVRRG RKRPVPKGATYGKP + GVN+LK+ RSL++ AEER GR    LRVLNSYW
Sbjct  61   IYRIRVRRGGRKRPVPKGATYGKPVHHGVNQLKFARSLQSVAEERAGRHCGALRVLNSYW  120

Query  121  VNQDSTYKYFEVILVDPQHKAIRRDARYNWICNPVHKHREARGLTATGKKSRGINKGHKF  180
            V +DSTYK+FEVIL+DP HKAIRR+    WI  PVHKHRE RGLT+ G+KSRG+ KGHKF
Sbjct  121  VGEDSTYKFFEVILIDPFHKAIRRNPDTQWITKPVHKHREMRGLTSAGRKSRGLGKGHKF  180

Query  181  NNTKAG-RRKTWKRQNTLSLWRYR  203
            ++T  G RR  W+R+NTL L RYR
Sbjct  181  HHTIGGSRRAAWRRRNTLQLHRYR  204
```

Figura 47: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *RPL15B* da levedura *S. cerevisiae* com RPL15 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

Modificações em *RPL15* têm sido utilizadas no prognóstico de câncer de ovário seroso capaz de detectar os estágios iniciais e finais de câncer de ovário (KASHUBA *et al.*, 2012) .

A linhagem *Δrsm28* apresentou resistência à carboplatina no tempo analisado (Figura 12 e 48). O gene *RSM28* (Ribosomal Small subunit of Mitochondria) codifica uma proteína da subunidade pequena ribossomal mitocondrial em *S. cerevisiae*. Foi identificada como um supressor dominante de determinadas mutações mitocondriais que reduziram a tradução do mRNA da *COX2*. Mutações no gene *RSM28* parecem aumentar ou alterar a atividade da proteína, melhorando a expressão dos mRNAs de mutantes *COX2* (Williams et al. 2005). Interações genéticas sugerem um possível papel na promoção de iniciação da tradução que é reforçada pela deleção interna (WILLIAMS

*et al*., 2006). *RSM28* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado na levedura *Kluyveromyces lactis*.

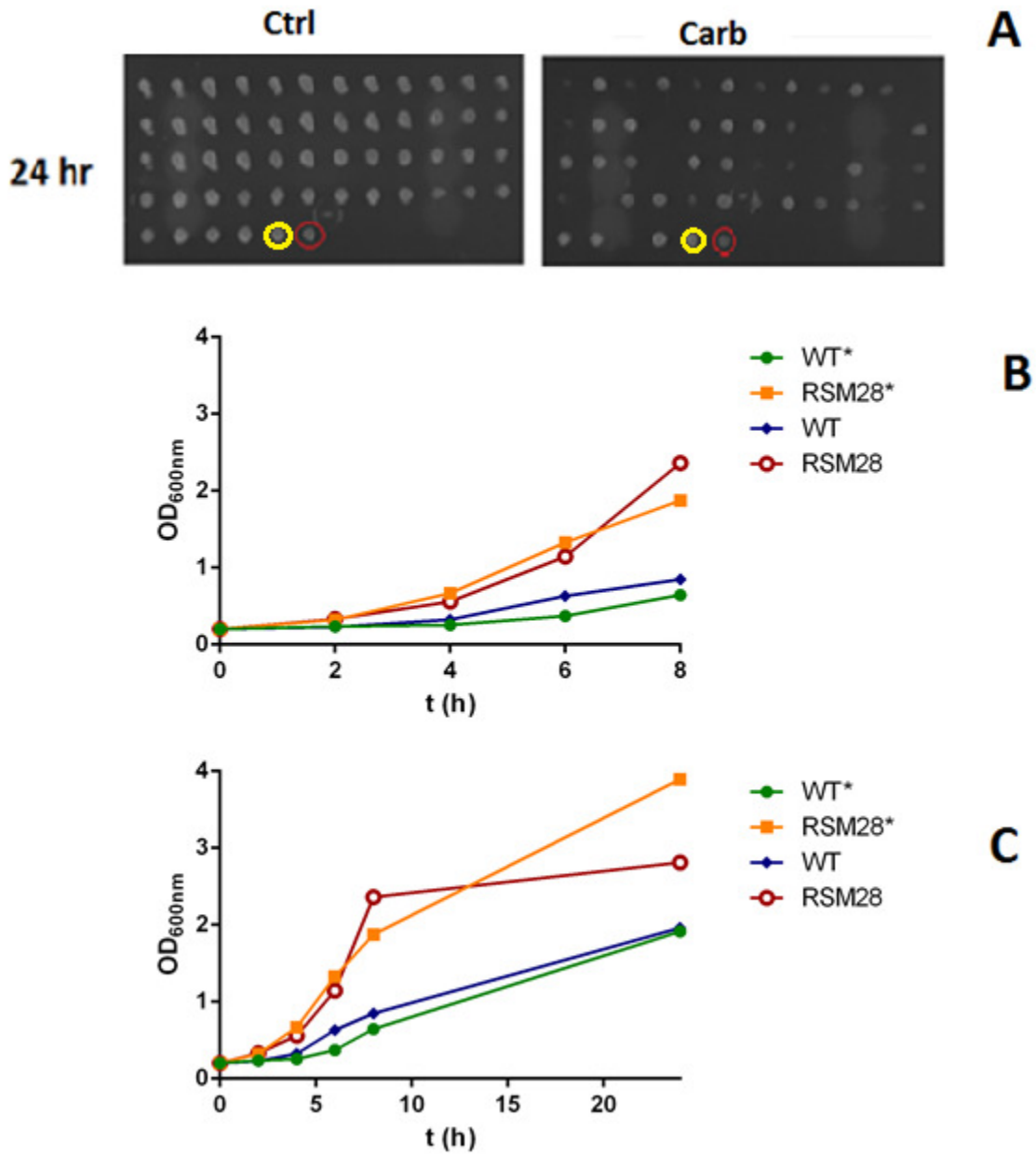



Figura 48: Tratamento do *Δrsm28* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistentes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *RSM28* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δrsm28* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

Por último, encontramos que a linhagem mutante para *UBX3* apresenta resistência à carboplatina (Figuras 12 e 49). O gene *UBX3* codifica uma subunidade do DSC (Complexo Ubiquitina Ligase) que interage com Cdc48p em levedura; UBX

(ubiquitina X ligante) é um domínio proteico que interage com Cdc48p envolvido na fusão membranar (PETERSEN *et al.*, 2004). *UBX3* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado nas leveduras *Kluyveromyces lactis e Eremothecium gossypii*.

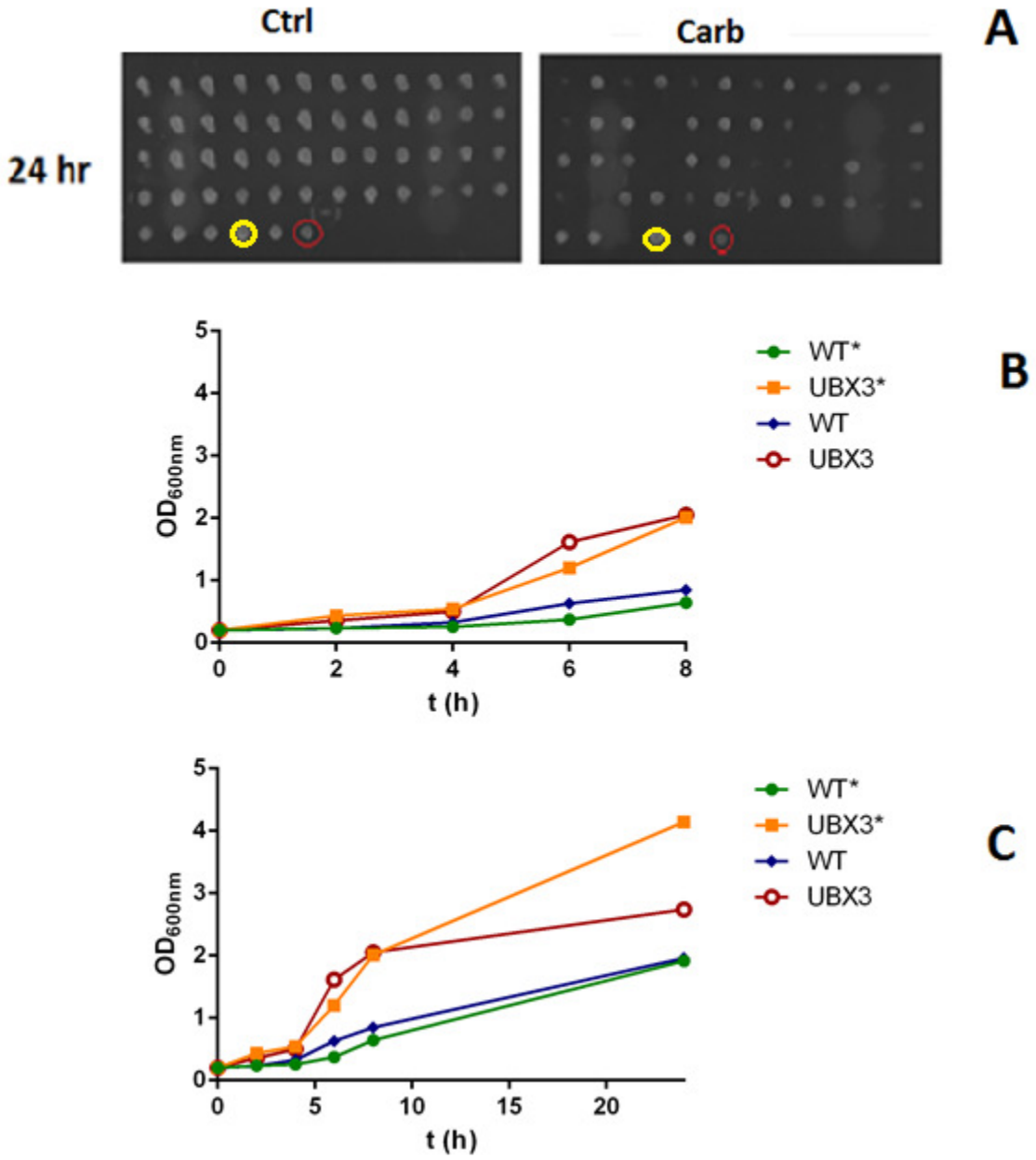



Figura 49: Tratamento do *Δubx3* de *S. cerevisiae*, resistente a 10mM de carboplatina. As linhagens pré-selecionados resistentes a 250µM de carboplatina foram crescidos em meio líquido SD por 24 horas (com ou sem carboplatina), transferidos para meio YPD sólido e seu crescimento foi analisado após 48 horas em estufa 30°C. (A) O mutante de *UBX3* apresentou um aumento da viabilidade após 24 horas de tratamento (a linhagem selvagem (WT) está circulada em vermelho; o *Δubx3* está circulado em amarelo). (B) Crescimento durante o início da fase logarítmica. A figura C mostra o crescimento por até 24 horas. A marcação com * é para destacar os tratados com carboplatina 10mM.

## 6.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANÁLOGOS DE REBECAMICINA

Testes de viabilidade celular por diluição seriada utilizando a linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* foram realizados em condições controle e na presença de análogos de rebecamicina. A viabilidade foi analisada pela capacidade de formação de colônias nas diferentes diluições (Figura 50).

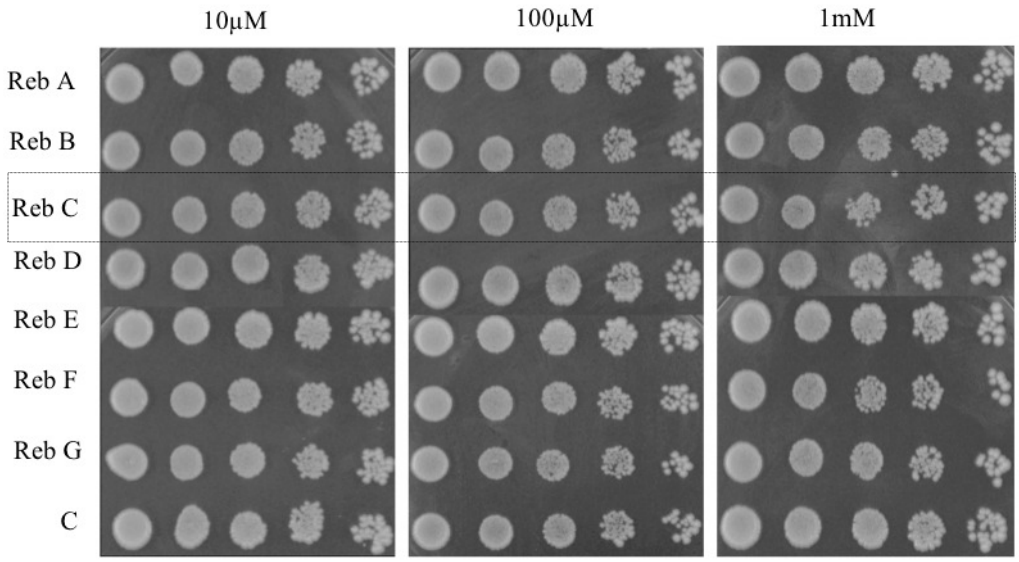



Figura 50: Teste de viabilidade da linhagem selvagem BY4741 de *S. cerevisiae* na presença dos análogos de rebecamicina. As células foram inoculadas em meio YPD líquido em $OD_{600nm}$ inicial de 0,2 por duas horas na presença dos compostos, submetidos a diluição seriada de cinco vezes e incubados em meio YPD sólido a 30°C por 48 horas. (C): controle contendo apenas DMSO 5%.

Os resultados indicam que após 2h de tratamento, o controle (C= sem o composto), assim como os tratados apresentaram crescimento em todas as diluições. No entanto, percebeu-se um leve efeito de diminuição da formação de colônias com relação ao controle, nas células que cresceram na presença do análogo Reb C (Figura 50). Assim, analisamos se esse efeito era real acompanhando a $OD_{600nm}$ ao longo de 48 horas de exposição e verificamos que de fato o análogo Reb C diminui levemente a taxa de crescimento (figura 51).

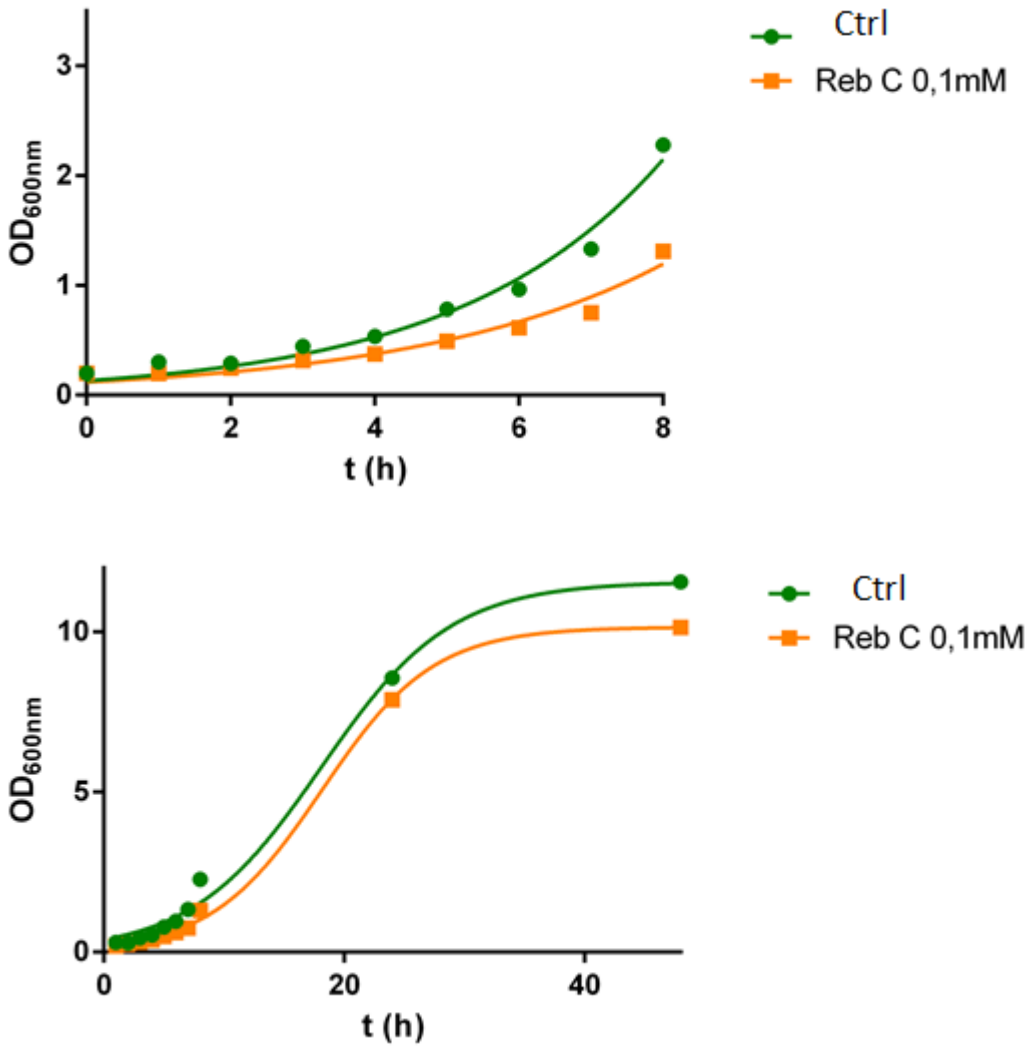



Figura 51: Taxas de crescimento da linhagem selvagem na presença de 0,1 mM de Reb C em comparação com a amostra controle (sem Reb C). (Ctrl): controle contendo apenas DMSO 0,3%.

Assim, através de análise espectrofotométrica e crescimento em meio sólido YPD foi determinada a viabilidade celular da coleção YKO nos tempos de 4 horas após exposição dos clones e da linhagem selvagem a 0,1mM de Reb C, em meio líquido SD e concentração celular inicial 0,0625.

Com os resultados obtidos realizamos um *rankeamento* dos clones mais sensíveis tendo por base o crescimento controle. Das 53 placas analisadas, 2 apresentaram mutantes com alta sensibilidade a dosagem administrada de 0,1 mM de Reb C (Figura 52 e 53). A análise dos clones resistentes (que mantiveram viabilidade igual ou superior à linhagem selvagem) não apresentou resultados significativos, mesmo quando os clones foram expostos a alta concentração (cerca de 1mM) de Reb C.

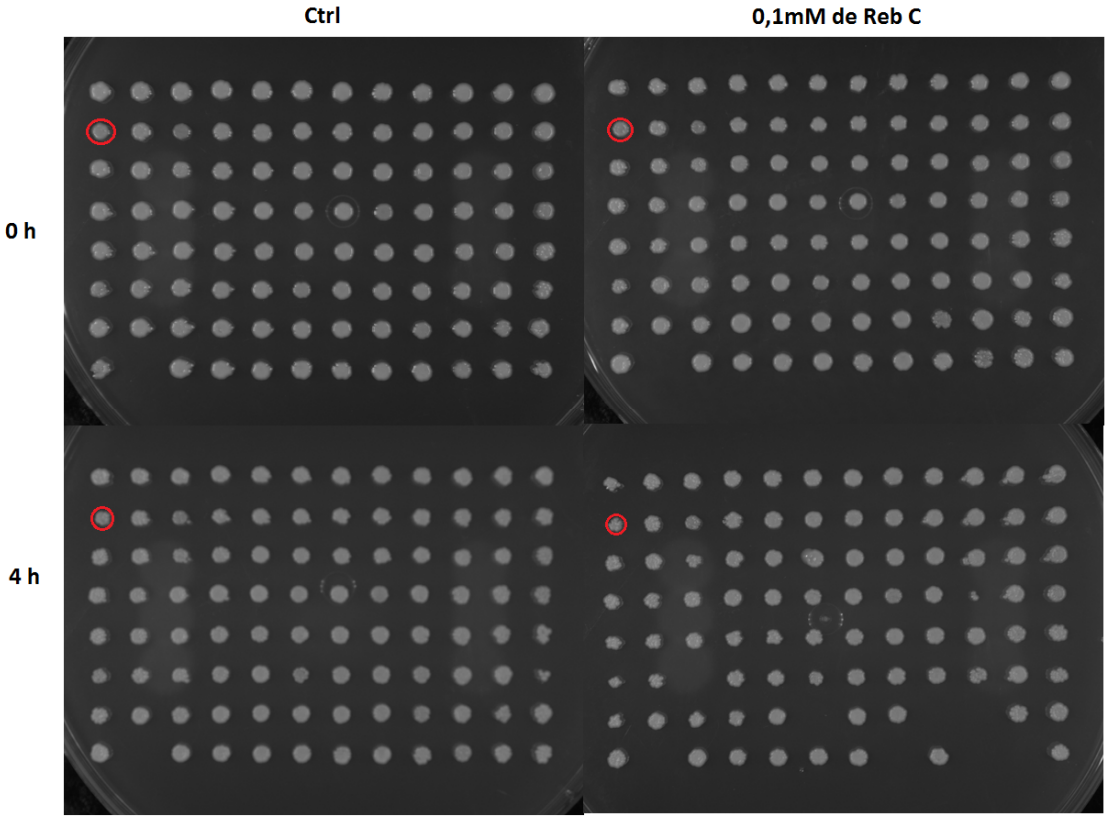



Figura 52: Viabilidade das linhagens mutantes da placa 13 que apresentaram maior sensibilidade quando expostas a Reb C. As células foram incubadas em meio mínimo liquido na presença ou ausência de 0,1mM de RebC em $OD_{600nm}$ inicial de 0,0625 com concentração final de DMSO 0,3%. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas com replicador e pingadas na placa de YPD que foi incubada a 30 °C por 48 horas e fotografadas. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e o poço H2 é o branco, ou seja, contém apenas o meio de cultivo.

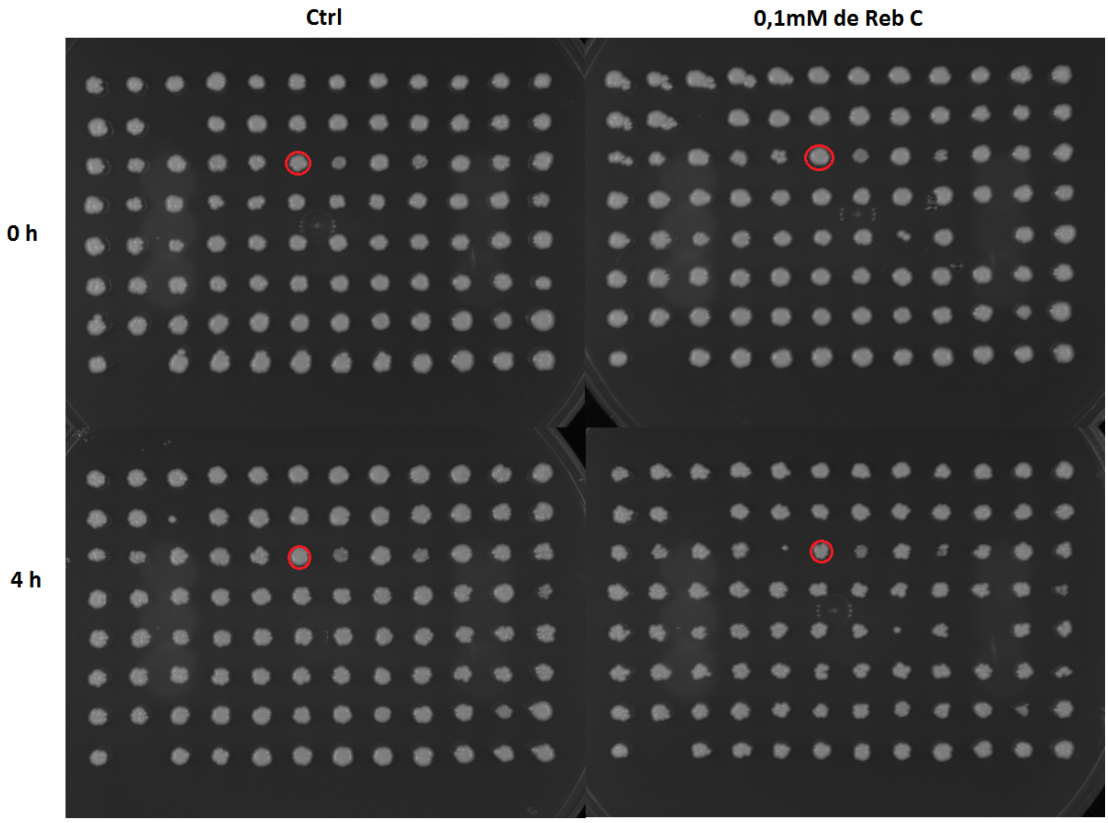



Figura 53: Viabilidade das linhagens mutantes da placa 30 que apresentaram maior sensibilidade quando expostas a Reb C. As células foram incubadas em meio mínimo liquido na presença ou ausência de 0,1mM de RebC em $OD_{600nm}$ inicial de 0,0625 com concentração final de DMSO 0,3%. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas com replicador e pingadas na placa de YPD que foi incubada a 30 °C por 48 horas e fotografadas. Os espaços vazios representam mutantes que apresentam crescimento lento e não puderam ser crescidos juntamente com os demais. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e o poço H2 é o branco, ou seja, contém apenas o meio.

Os resultados das figuras 52 e 53 mostram que de todas as linhagens mutantes analisadas, apenas 9 sofreram significativa perda de viabilidade.

A fim de confirmar esse resultado e avaliar o crescimento em dosagens menores de Reb C, administramos diferentes concentrações nas linhagens pré-selecionadas e realizamos uma diluição seriada de 1:10 (figura 54).

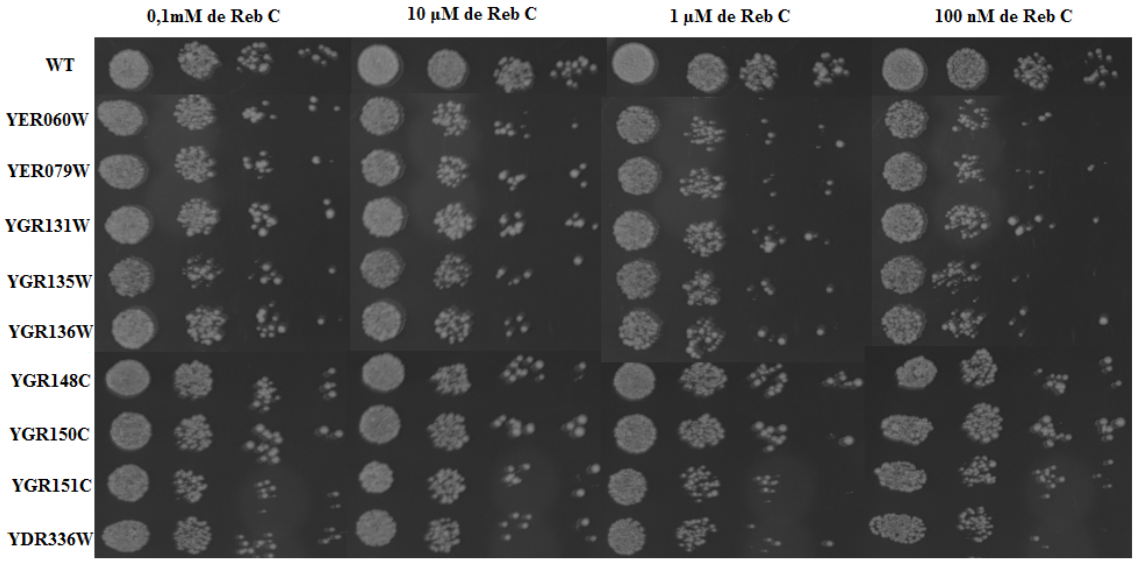



Figura 54: Diluição seriada das linhagens mutantes sensíveis das placas 13 e 30, expostas a 0,1mM, 10µM, 1µM, e 100nM de Reb C. As células foram incubadas em meio mínimo liquido na presença de Reb C durante 24 horas em $OD_{600nm}$ inicial de 0,0625 com concentração final de DMSO 0,3%. alíquotas foram retiradas para diluição seriada e com pipetador e foram pingadas 5µl na placa de YPD que foi incubada a 30 °C por 48 horas e fotografada.

Na figura 54 podemos observar que a linhagem *YGR136W* foi mais sensível na concentração de 10 µM, já a linhagem *YGR151C* foi mais sensível na concentração de 1 µM e as linhagens *YER060W*, *YGR135W* e *YDR336W* foram altamente sensíveis na concentração de 100 nM de Reb C. As demais mantiveram o mesmo crescimento nas diferentes concentrações sendo o crescimento sempre menor do que o da linhagem WT.

Para verificarmos se há uma distribuição homogênea dos produtos gênicos envolvidos na resposta a Reb C nos diferentes compartimentos celulares construíram-se os gráficos da figura 55 e as tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Agrupamento por componentes celulares dos genes identificados que apresentaram alta sensibilidade a ao análogo C de rebecamicina. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao "software" SGD Gene Ontology Slim Mapper disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgibin/GO/goSlimMapper.pl

| COMPONENTE CELULAR | FREQUÊNCIA | FREQUÊNCIA GENÔMICA | GENE(S) |
|---|---|---|---|
| **Citoplasma** | 66.7% | 62.9% | *YER079W,PRE9,LSB1,RPL24B, CCM1,YGR151C* |
| **Núcleo** | 44.4% | 34% | *YER079W,PRE9,LSB1,YGR151C* |
| **Membrana** | 33.3% | 24.7% | *FCY21,FHN1,PRE9* |
| **Ribossomo** | 11.1% | 5.6% | *RPL24B* |
| **Mitocôndria** | 11.1% | 18.1% | *CCM1* |
| **Componente celular desconhecido** | 11.1% | 11.4% | *YDR336W* |
| **Células do córtex** | 11.1% | 2.2% | *LSB1* |
| **Sistema endomembrana** | 11.1% | 5.8% | *PRE9* |
| **Citoesqueleto** | 11.1% | 3.3% | *LSB1* |
| **Membrana plasmática** | 11.1% | 5.9% | *FCY21* |

Tabela 8: Agrupamento por processos biológicos dos genes identificados que apresentaram alta sensibilidade a rebecamicina. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao "software" SGD Gene Ontology Slim Mapper disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgibin/GO/goSlimMapper.pl

| PROCESSOS BIOLÓGICOS | FREQUÊNCIA | FREQUÊNCIA GENÔMICA | GENE(S) |
|---|---|---|---|
| **Processo biológico desconhecido** | 33.3% | 18.2% | *YDR336W,YER079W,YGR151C* |
| **Biogênese do complexo de proteínas** | 22.2% | 4.2% | *PRE9,LSB1* |
| **Organização de citoesqueleto** | 11.1% | 3.6% | *LSB1* |
| **Transporte transmembrana** | 11.1% | 3.5% | *FCY21* |
| **Tradução citoplasmática** | 11.1% | 2.7% | *RPL24B* |
| **Proteólise envolvida no processo catabólico de proteína celular** | 11.1% | 3.1% | *PRE9* |
| **Organização mitocondrial** | 11.1% | 5.4% | *CCM1* |
| **Regulação da organização das organelas** | 11.1% | 3% | *LSB1* |
| **Outros** | 11.1% | | *FHN1* |

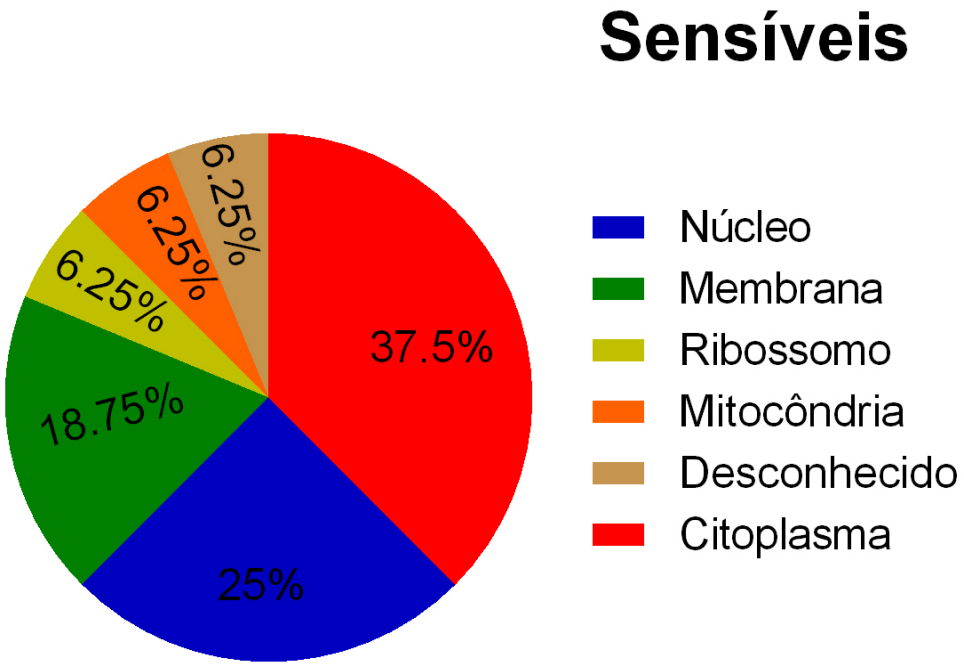



Figura 55: Distribuição nos compartimentos celulares dos produtos gênicos responsáveis pelas respostas de sensibilidade a Reb C.

Na figura 55 podemos observar que os produtos gênicos que levam a sensibilidade a Reb C estão em sua grande maioria distribuídos no citoplasma e no núcleo e juntos perfazem 62% dos alvos, sugerindo alta permeabilidade da droga. Levando em consideração o mecanismo descrito para a ação da rebecamicina através da inibição da ação da topoisomerase I, nossos resultados estão coerentes.

Utilizamos a ferramenta de bioinformática GeneMANIA para analisar as possíveis vias metabólicas que relacionam os genes encontrados para resistência ao análogo Reb C. As figuras 56, 59 e 63 mostram o resultado dessas análises associados a resistência. Foram analisados através do GeneMANIA apenas os genes já caracterizados, ou seja, os clones apresentados na tabela 7 e 8 cujo compartimento celular ou processo celular não são conhecidos, não serão apresentados nos demais dados. No entanto, esses genes são de fundamental importância para pesquisas futuras, já que no momento pouco ou nada se sabe sobre eles.

### 6.2.1 Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com o transporte transmembrana e organização de citoesqueleto

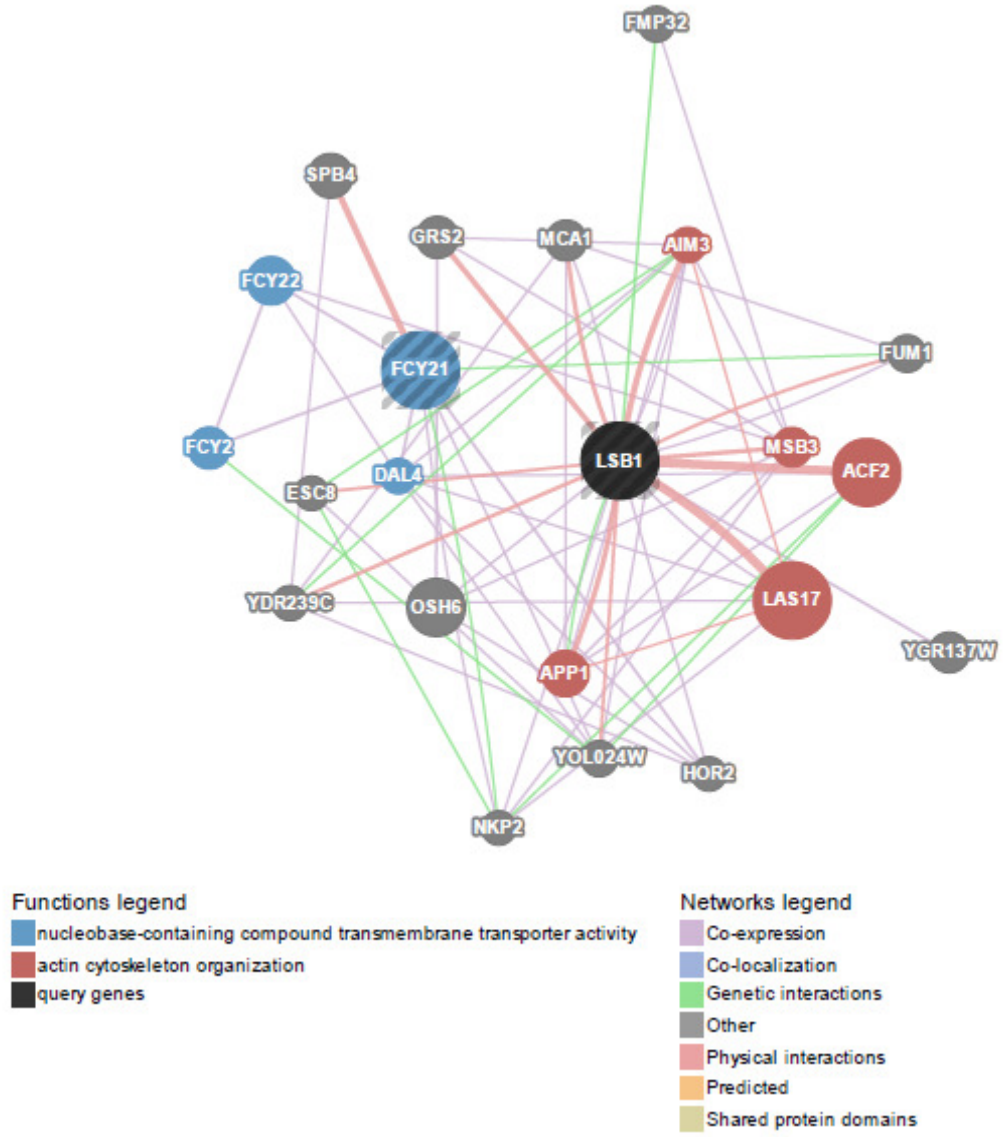



Figura 56: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade ao análogo de rebecamicina. Foram utilizados como entrada para análise os genes *FCY21* e *LSB1*. Todas as linhagens perderam sua viabilidade após 24 horas de exposição a Reb C.

A linhagem mutante para o gene *FCY21* apresentou alta sensibilidade à exposição à Reb C (Figura 57). O gene *FCY21* codifica uma putativa purina-citosina permease, que medeia o transporte ativo de purinas e citosina. O mutante para *FYC21* apresenta resistência ao 5-fluorocitosina, um antifúngico que interfere na síntese de DNA e de proteína, no reparo de danos no DNA, e no controle do ciclo celular (WAGNER *et al*., 2001). A inativação de *FCY2* melhora a resistência à cisplatina em

células de levedura uma vez que *Δfcy2* ativa a síntese constitutiva de novos nucleotídeos de purina, ocasionando um aumento de purinas intracelulares, impedindo assim a ligação da cisplatina com o DNA, já que a cisplatina se liga fortemente a guanina e adenina (KOWALSKI *et al.*, 2008). *FCY21* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado nas espécies *Magnaporthe oryzae* e *Neurospora crassa*.

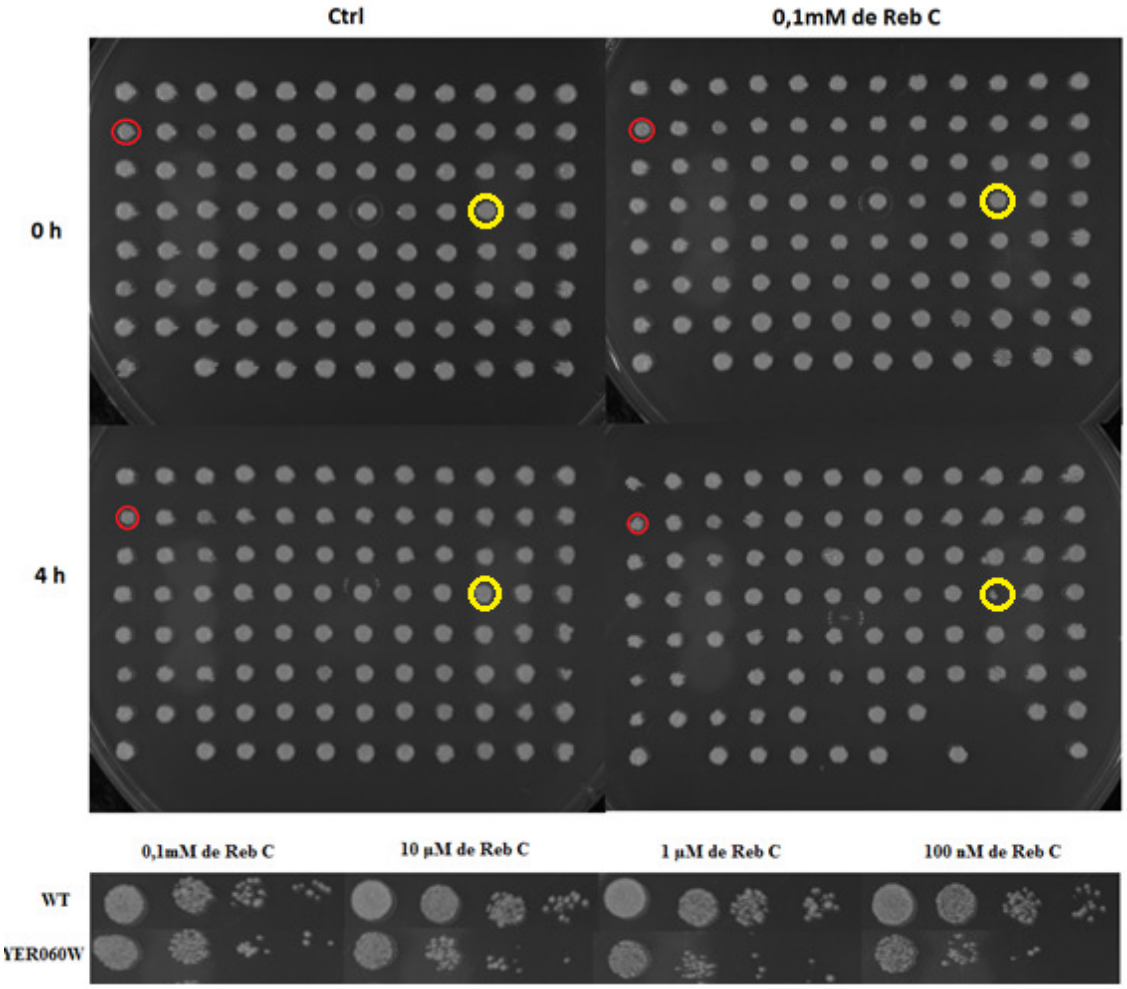



Figura 57: Viabilidade da linhagem mutante para o gene *YER060W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δyer060w*.

Outra linhagem selecionada foi a *Δlsb1* (Figura 58). O gene *LSB1* codifica um regulador negativo da polimerização de actina promovendo a atividade do fator. Interage através de um domínio SH3 com a proteína homóloga Las17p envolvida na síndrome de Wiskott-Aldrich em humanos, e juntamente com *PIN3* inibe a nucleação dos filamentos de actina. A superexpressão de *LSB1* bloqueia o passo de internalização

por endocitose mediada pelo receptor arginina permease (CAN1) (SPIESS *et al*., 2013). Essa proteína aumenta em abundância e forma um *foci* nuclear durante estresse no processo de replicação de DNA (TKACH *et al*., 2012). *LSB1* possui homólogo estrutural ao domínio SH3 presente em muitas proteínas transdutoras de sinal em humanos. Esses domínios medeiam as interações proteína-proteína e facilitam a formação de grandes complexos de sinalização através da ligação em sequências ricas em prolina. (EULITZ *et al*., 2013)

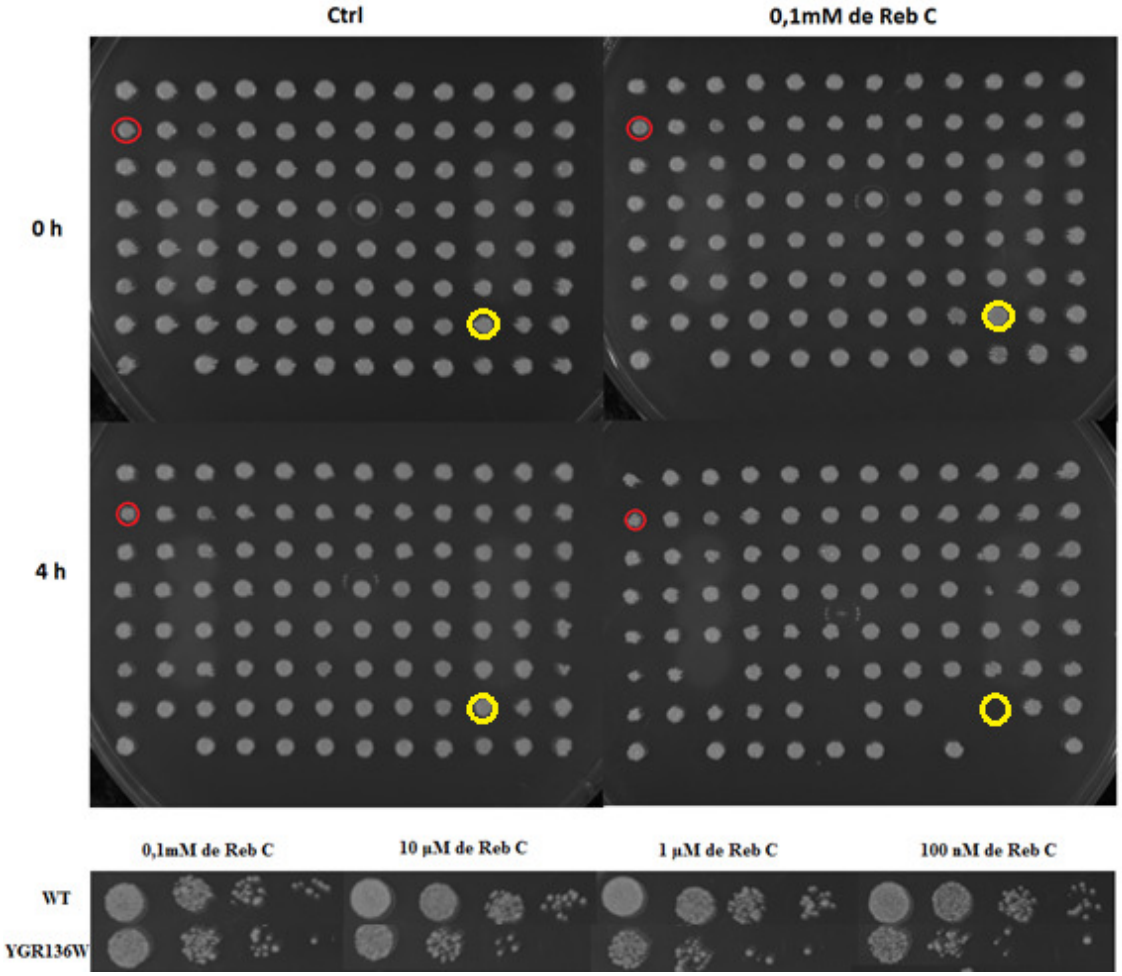



Figura 58: Viabilidade da linhagem mutante para *YGR136W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δygr136w*.

### 6.2.2 Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com o metabolismo de proteína

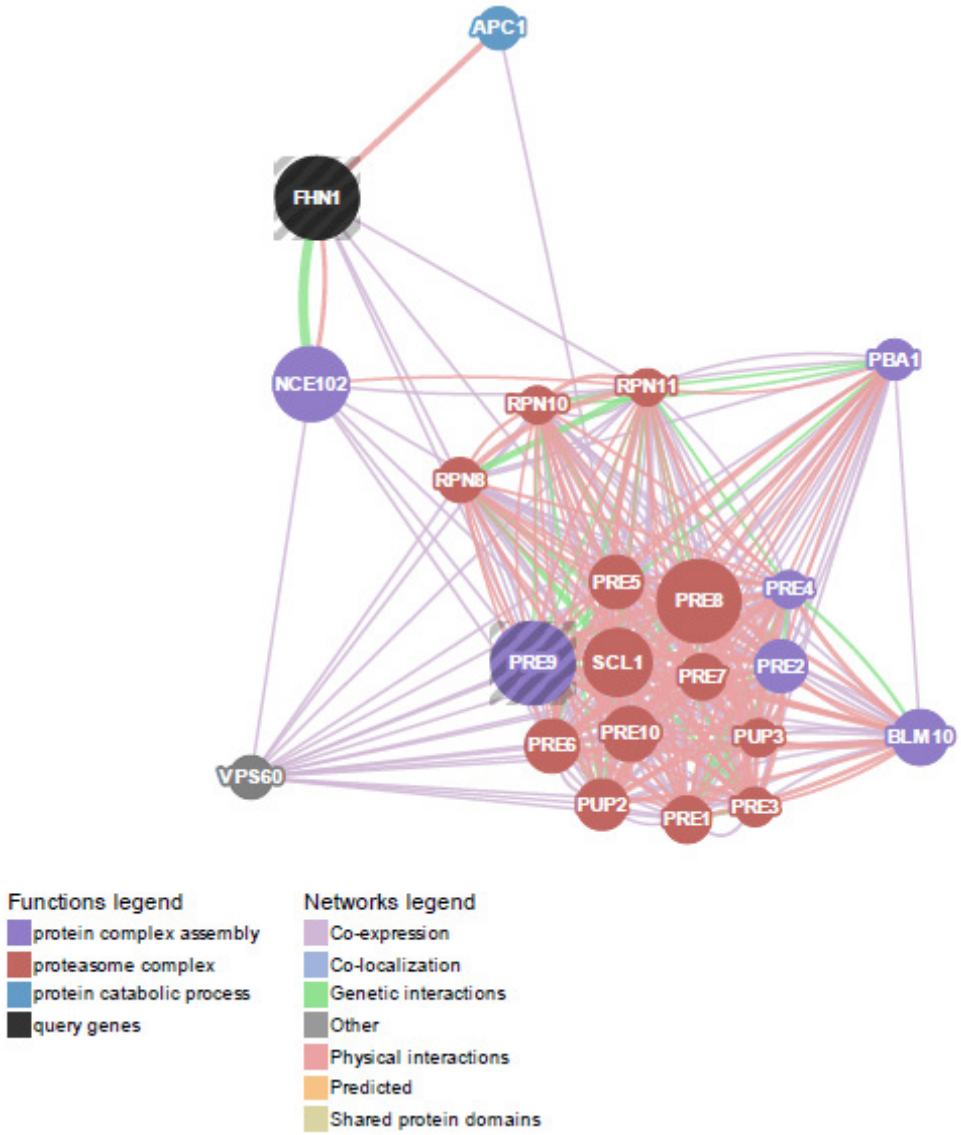



Figura 59: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a Reb C. Foram utilizados como entrada para análise os genes *FHN1* e *PRE9*. Todas as linhagens perderam sua viabilidade após 24 horas de exposição a Reb C.

A linhagem mutante *Δfhn1* apresentou perda total de viabilidade com 4 horas de exposição à 0.1mM de Reb C (Figura 60). O gene *FHN1* codifica uma proteína de função desconhecida parálogo ao NCE102 (também de função desconhecida) induzida por exposição ao cetoconazol. Possui um elemento de ligação a reguladores esterol nas regiões promotoras, onde foi identificado um sítio de ligação ao Upc2p (LOIBL *et al.*, 2010; AGARWAL *et al.*, 2003). *FHN1* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado nas espécies *Kluyveromyces lactis* e *Ashbya gossypii*.

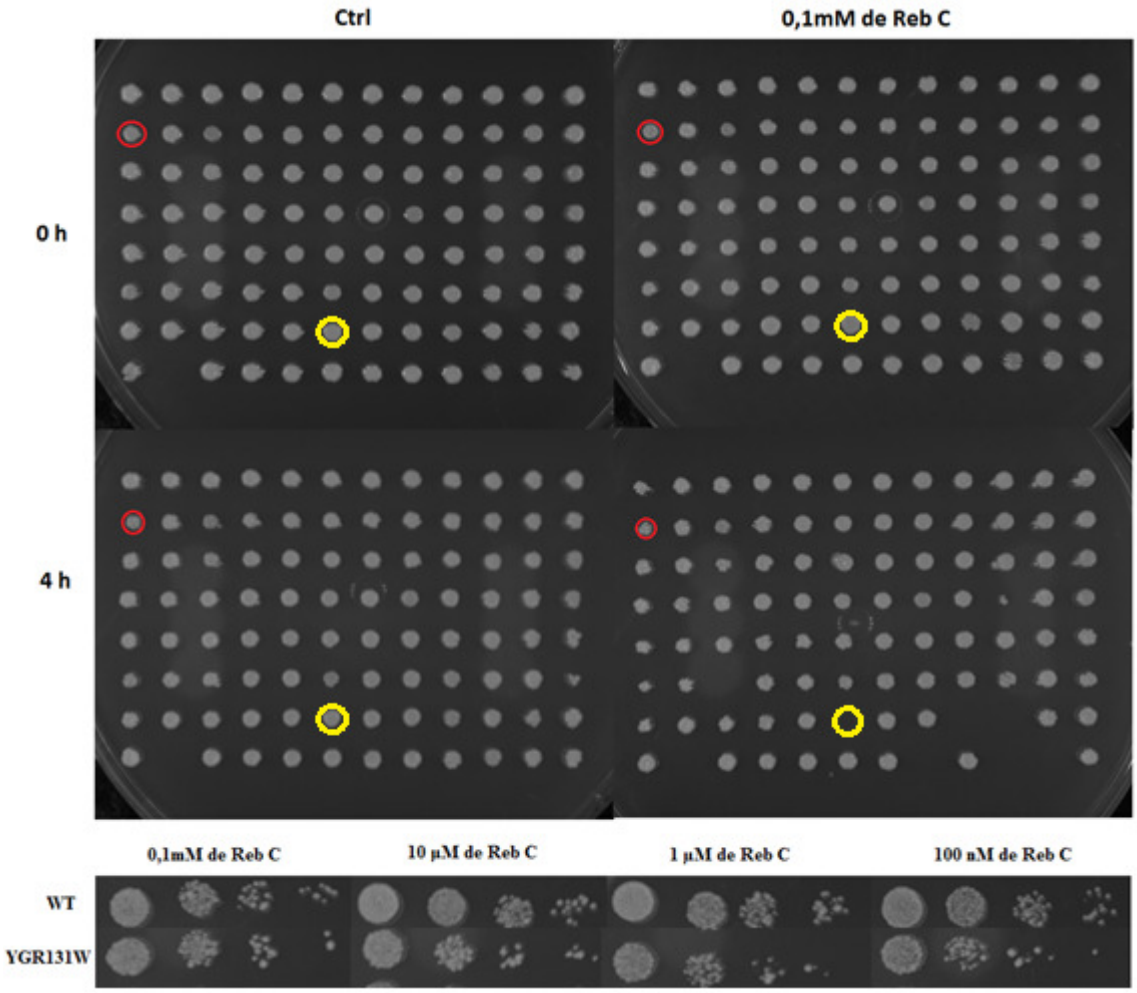



Figura 60: Viabilidade da linhagem mutante de *YGR131W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δygr131w*.

Outro mutante selecionado em nosso *screening* foi o *Δpre9* que apresentou total perda de viabilidade em 4 horas de exposição a 0.1mM de Reb C (Figura 61). O gene *PRE9* codifica uma subunidade Alfa 3 do proteassoma 20S, a única subunidade não essencial do 20S. Pode ser substituído pela subunidade alfa 4 (Pre6p) sob condições de estresse para criar uma isoforma proteassomal mais ativa (VELICHUTINA *et al.*, 2004).

O gene *PRE9* possui um homólogo humano chamado *PSMA4*, cujo produto está relacionado à proliferação celular por sua associação com o risco de câncer de pulmão e a apoptose. A baixa regulação da expressão de *PSMA4* diminui a atividade do proteassoma e resulta no acúmulo de proteínas ubiquitinadas, levando a uma indução da

apoptose. O Proteassoma é responsável pela degradação de proteínas envolvidas na ativação ou repressão de muitos processos celulares, incluindo a transcrição, a progressão do ciclo celular e a apoptose. Sendo assim, disfunções no proteassoma são conhecidas por levar a muitas doenças, incluindo câncer (LIU *et al*., 2009; HANSEN *et al*., 2010).

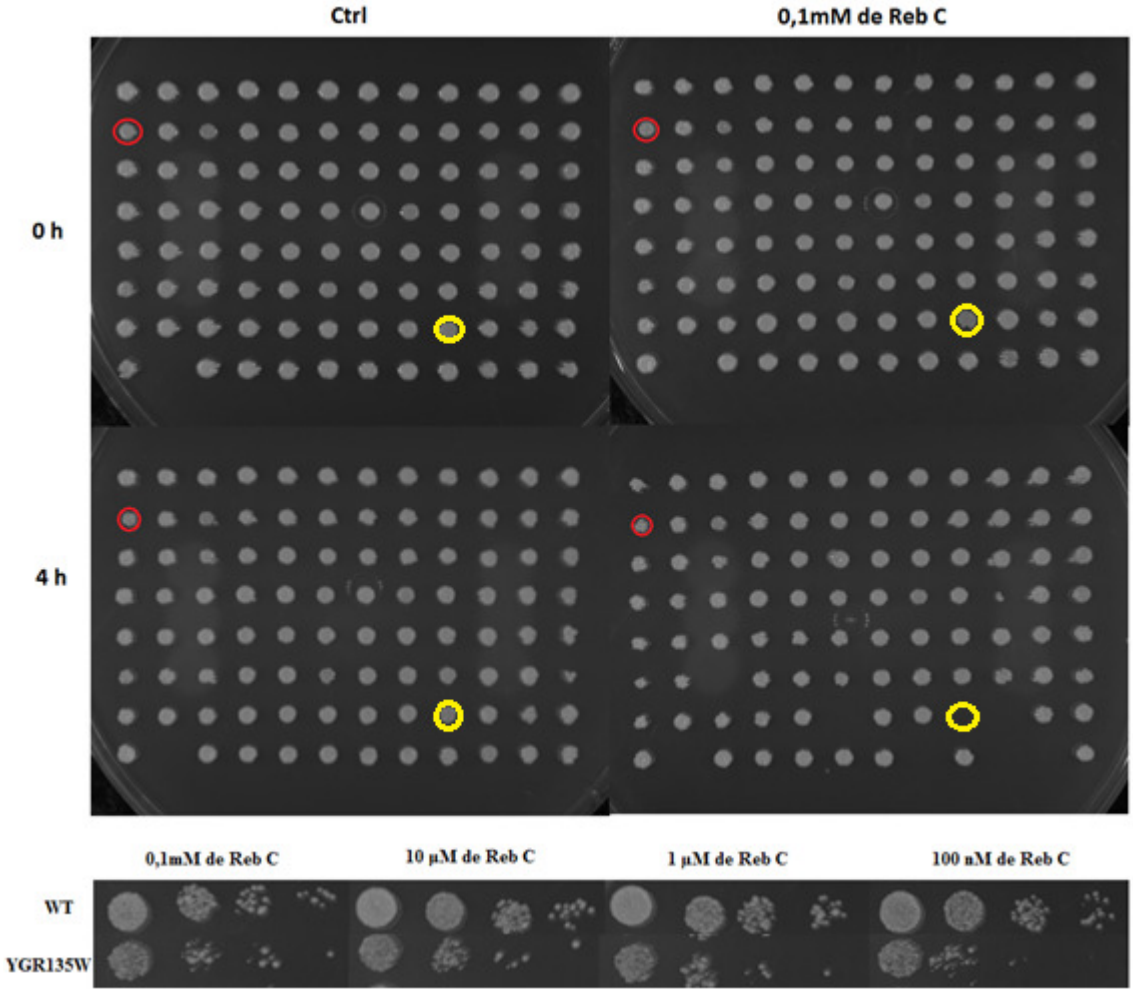



Figura 61: Viabilidade da linhagem mutante para o gene *YGR135W* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δygr135w*.

As sequencias de aminoácidos do gene *PRE9* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 50%) às sequências homólogas de humano. PSMA4 foi a proteína humana que apresentou maior identidade (53%, *E value* $2e^{-89}$) (Figura 62).

proteasome subunit alpha type-4 isoform 1 [Homo sapiens]

Sequence ID: **ref|NP_002780.1|** Length: 261 Number of Matches: 1

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 270 bits(691) | 2e-89() | Compositional matrix adjust. | 127/238(53%) | 177/238(74%) | 3/238(1%) | |

Features:

```
Query  3    SRRYDSRTTIFSPEGRLYQVEYALESISHAGTAIGIMASDGIVLAAERKVTSTLLEQDTS  62
            SRRYDSRTTIFSPEGRLYQVEYA+E+I HAGT +GI+A+DG++LAAER+    LL++
Sbjct  2    SRRYDSRTTIFSPEGRLYQVEYAMEAIGHAGTCLGILANDGVLLAAERRNIHKLLDEVFF  61

Query  63   TEKLYKLNDKIAVAVAGLTADAEILINTARIHAQNYLKTYNEDIPVEILVRRLSDIKQGY  122
            +EK+YKLN+ +A +VAG+T+DA +L N  R+ AQ YL  Y E IP E LV  L DIKQ Y
Sbjct  62   SEKIYKLNEDMACSVAGITSDANVLTNELRLIAQRYLLQYQEPIPCEQLVTALCDIKQAY  121

Query  123  TQHGGLRPFGVSFIYAGYDDRYGYQLYTSNPSGNYTGWKAISVGANTSAAQTLLQMDYKD  182
            TQ GG RPFGVS +Y G+D  YG+QLY S+PSGNY GWKA  +G N++AA ++L+ DYK+
Sbjct  122  TQFGGKRPFGVSLLYIGWDKHYGFQLYQSDPSGNYGGWKATCIGNNSAAAVSMLKQDYKE  181

Query  183  -DMKVDDAIELALKTLSKTTDSSALTYDRLEFATIRKGANDGEVYQKIFKPQEIKDIL  239
             +M +  A+ LA+K L+KT D S L+ +++E AT+ +   +G+   ++ K +E++ ++
Sbjct  182  GEMTLKSALALAIKVLNKTMDVSKLSAEKVEIATLTR--ENGKTVIRVLKQKEVEQLI  237
```

Figura 62: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *PRE9* da levedura *S. cerevisiae* com PSMA4 de humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas propriedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

### 6.2.3 Genes associados à resistência ao análogo de rebecamicina Reb C envolvidos com a tradução de proteínas.

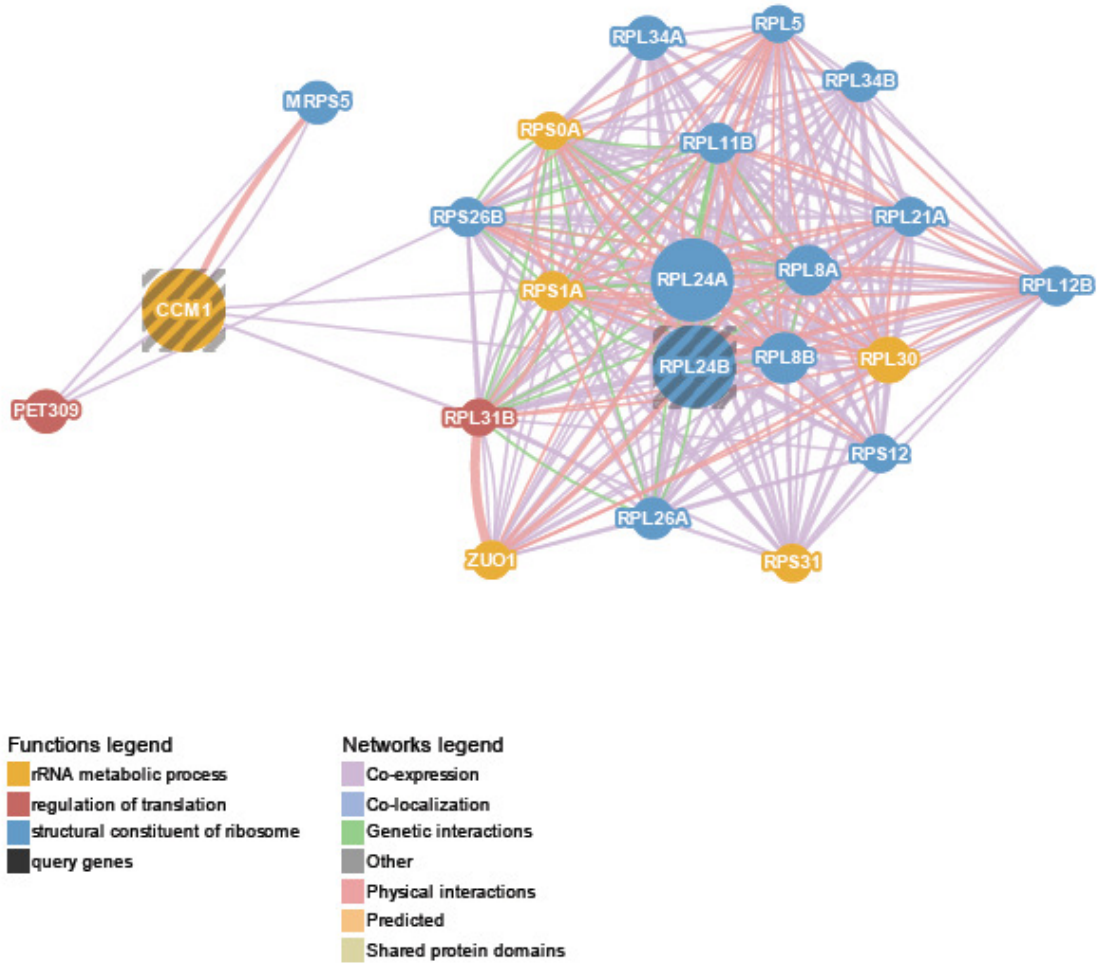



Figura 63: Quadro de interações e vias metabólicas dos genes que quando ausentes levam as células a apresentarem alta sensibilidade a Reb C. Foram utilizados como entrada para análise os genes *CCM1* e *RPL24B*. Todas as linhagens perderam sua viabilidade após 24 horas de exposição a Reb C.

A linhagem *Δccm1* apresentou alta sensibilidade e perda de viabilidade na presença de Reb C (Figura 64). O gene *CCM1* (*COB* and *COX1* mRNA maturation) codifica uma proteína de ligação ao rRNA mitocondrial 15S que contém repetição pentatricopeptideo (PPR), sendo necessários para remoção de íntron de pré-mRNAs de *COB* (citocromo b) e *COX1* (subunidade 1 da citocromo oxidase c), além de um papel na estabilização do 15S rRNA mitocondrial e na maturação do COB e COX1 mRNAs. A supressão de *CCM1* resulta numa perda completa e irreversível de capacidade respiratória e provoca um defeito do transporte de elétrons na membrana plasmática.

CCM1p que tem como alvo rRNA está provavelmente envolvido na biogênese de ribossomos mitocondriais e na tradução (MORENO *et al*., 2012; PUCHTA *et al*., 2010). *CCM1* não possui homólogo humano óbvio, porém ele é altamente conservado nas espécies *Kluyveromyces lactis* e *Ashbya gossypii*.

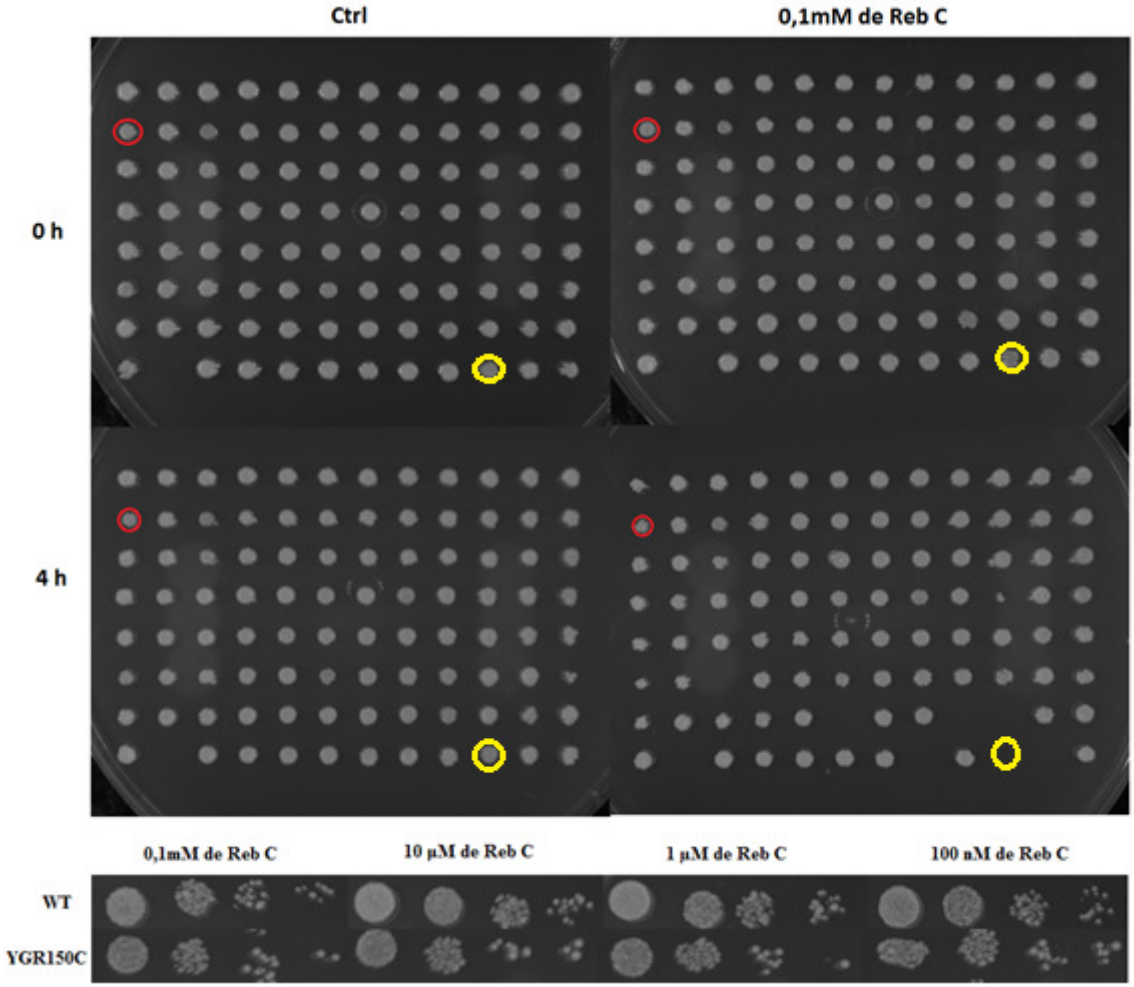



Figura 64: Viabilidade da linhagem mutante para o gene *YGR150C* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δygr150c*.

Por fim, nosso *screening* selecionou a linhagem *Δrpl24b* (Figura 65). O gene *RPL24B* codifica uma proteína ribossômica L24B da subunidade 60S pertencente à classe de proteínas ribossomais presentes apenas em archaebacteria e eucariontes (RPL24), mas não em ribossomos de procariontes. Análises do mutante de levedura *Δrpl24b* mostraram que essa proteína está envolvida na associação das subunidades pequenas e grandes de ribossomos para aumentar a eficiência da tradução. Embora não seja essencial para a viabilidade celular, essa proteína está implicada na reiniciação da

tradução de mRNA policistrônico (mRNA grande contendo a informação de vários genes) (ZHOU *et al*., 2010; NISHIMURA *et al*., 2005).

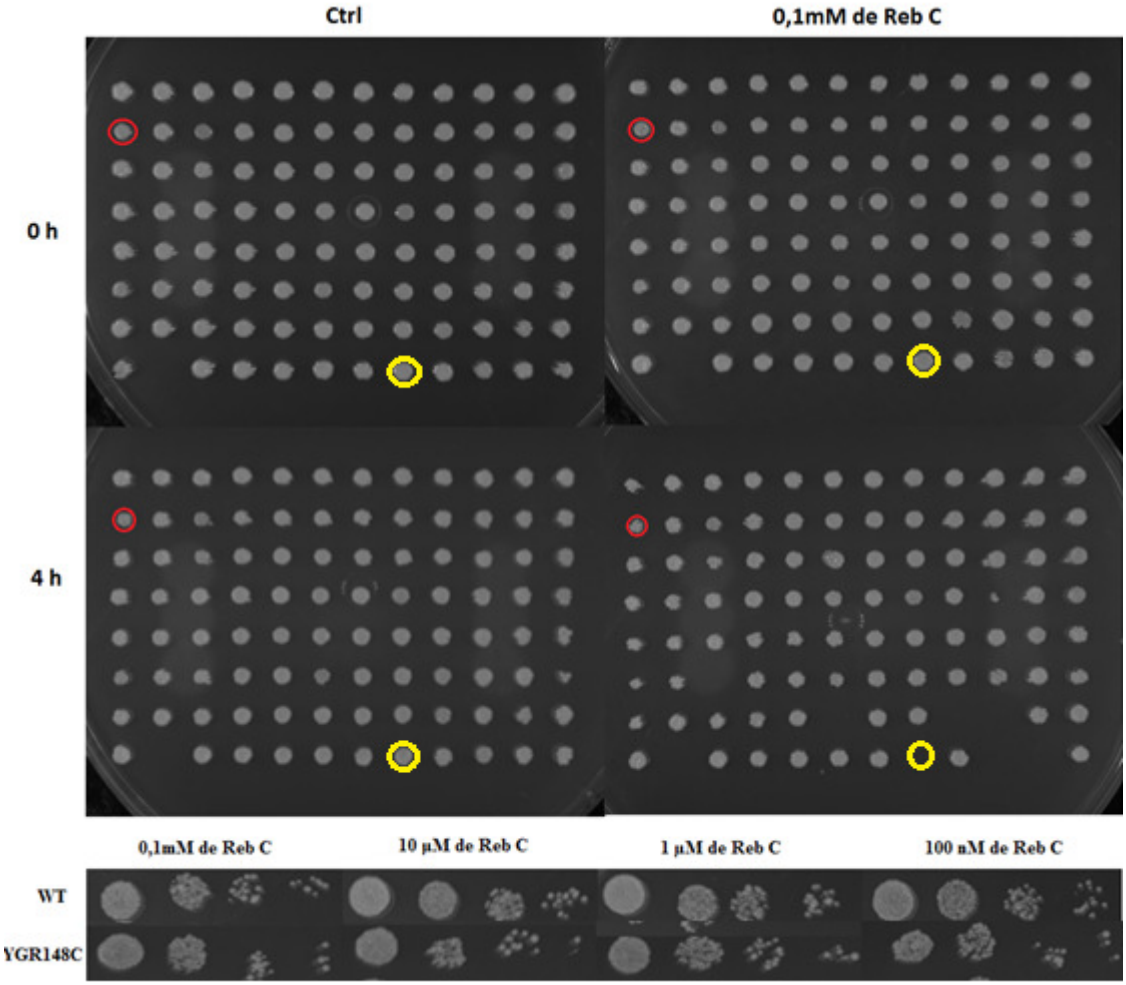



Figura 65: Viabilidade da linhagem mutante para o gene *YGR148C* da placa 13 que apresentou alta sensibilidade quando exposta a Reb C. A marcação em vermelho é a identificação da linhagem WT e a marcação em amarelo é a da linhagem *Δygr148c*.

As sequencias de aminoácidos do gene *RPL24B* foi analisada por BLAST e apresentaram identidade (> 50%) às sequências homólogas de humano. RPL24 foi a proteína humana que apresentou maior identidade (57%, *E value* $3e^{-38}$) (Figura 66).

PREDICTED: 60S ribosomal protein L24 isoform X1 [Homo sapiens]
Sequence ID: **ref|XP_005247754.1|** Length: 121 Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 110

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 130 bits(328) | 3e-38() | Compositional matrix adjust. | 63/110(57%) | 82/110(74%) | 0/110(0%) | |

Features:

```
Query  1    MKVEVDSFSGAKIYPGRGTLFVRGDSKIFRFQNSKSASLFKQRKNPRRIAWTVLFRKHHK  60
            MKVE+ SFSG KIYPG G  + R D K+F+F N+K  S F  ++NPR+I WTVL+R+ HK
Sbjct  1    MKVELCSFSGYKIYPGHGRRYARTDGKVFQFLNAKCESAFLSKRNPRQINWTVLYRRKHK  60

Query  61   KGITEEVAKKRSRKTVKAQRPITGASLDLIKERRSLKPEVRKANREEKLK  110
            KG +EE+ KKR+R+ VK QR ITGASL  I  +R+ KPEVRKA RE+ ++
Sbjct  61   KGQSEEIQKKRTRRAVKFQRAITGASLADIMAKRNQKPEVRKAQREQAIR  110
```

Figura 66: Alinhamento das sequências de aminoácidos de *RPL24B* da levedura *S. cerevisiae* com RPL24 em humanos. O sinal de "+" no alinhamento das sequências indica a variação de aminoácidos com as mesmas prorpiedades entre as proteínas. Foi utilizada a ferramenta BLASTp para a obtenção desses resultados.

Mutação em um dos alelos em RPL24 em conjunto com a ativação do supressor de tumor p53 em resposta a deficiências de proteínas ribossomais pode provoca uma malformações congênitas em ratos e um papel na patogênese de malformações congénitas em seres humanos (BARKIC *et al.*, 2009).

MYC uma oncoproteína que promove o crescimento celular e a síntese de proteínas, quando ativada induz o aumento dos níveis de transcrição das subunidades ribossomais, tais como RPL24 e a síntese de proteínas. Um mecanismo pelo qual MYC aumenta a síntese de proteínas é a regulação da transcrição da biogênese ribossomal (HERKERT & EILERS, 2010).

Os resultados obtidos com o análogo Reb C mostram uma possível correlação deste como um antitumoral, já que um dos alvos encontrados estão relacionados com a regulação do proteassoma que é uma via amplamente inibida por diversos anticancerígenos (JIANG *et al.,*2013; MANNA *et al.,*2013) e ao ribossomo onde muitas proteínas ribossomais, tais como RPL24 estão associados como reguladores do controle do ciclo celular ou a apoptose (YANG *et al*., 2013).

## 7. CONCLUSÃO

A busca de eficientes terapias para o câncer é uma constante no meio científico. Há sempre a necessidade de introdução de novos fármacos e novas aplicações dos já existentes na terapia, seja pela falta de eficiência dos fármacos atuais ou pelo alto nível de toxicidade dos mesmos.

Com esse estudo identificamos 19 genes associados à resistência a carboplatina sendo que 9 deles possuem genes ortólogos em humanos e outros 2 são homólogos estruturais de camundongos, associados principalmente ao mecanismo de reparo de DNA e ao transporte celular. Foram também identificadas 9 linhagens que estavam associados a sensibilidade a carboplatina, sendo que 6 delas possuem ortólogos em humanos, estão associados ao transporte endossomal, a biogênese e função do ribossomo e ao bloqueio do ciclo celular na fase G1.

Na busca por um análogo antitumoral de rebecamicina identificamos um possível anticancerígeno Reb C que apresentou 9 genes associados a resistência, dos quais 3 deles possuem homólogos humanos relacionados ao ribossoma e ao proteassoma.

Como já citado anteriormente, não se sabe ao certo quais são os mecanismos de entrada da carboplatina no núcleo, o que está de acordo com o fato de a maior parte das proteínas envolvidas na resposta de sensibilidade a droga estarem no citoplasma. Isto porque provavelmente após a entrada na célula há um metabolismo complexo envolvido no transporte e detoxificação da carboplatina, antes que ela alcance o núcleo, onde efetua sua atividade.

A utilização da levedura *S. cerevisiae* como uma plataforma experimental e de baixo custo para os estudos moleculares se mostrou eficiente já que graças a ela conseguimos concluir com nossos objetivos de maneira eficiente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABADA, P.B.; LARSON, C.A.; MANOREK, G.; ADAMS, P. AND HOWELL, S.B. Sec61_ Controls Sensitivity to Platinum-Containing Chemotherapeutic Agents through Modulation of the Copper-Transporting ATPase ATP7A. **MOLECULAR PHARMACOLOGY**, v.82, n. 3, 2012.

AGARWA, A.K.; ROGERS, P.D.; BAERSON, S.R.; JACOB, M.R.; BARKER, K.S. *et al*. Genome-wide Expression Profiling of the Response to Polyene, Pyrimidine, Azole, and Echinocandin Antifungal Agents in *Saccharomyces cerevisiae.* **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v. 278, n. 37, p. 34998–35015, 2003.

ALDERDEN, R.A.; HALL, M.D.; HAMBLEY, T.W. The Discovery and Development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 5, 2006.

AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N. Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. **Chemother Res Pract**, 2011.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.E.;KINGSTON, E. *et al*. Current protocols in molecular biology. **John Wiley and Sons, New York**, 1994.

BAILLY C.; QU X.; ANIZON F.; *et al*. 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, 1999.

BARKIĆ, M.; CRNOMARKOVIĆ, S.; GRABUSIĆ, K.; BOGETIĆ, I.; PANIĆ, L. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24deficient mice and promotes their survival. **Mol Cell Biol**. v.29, n.10, p.2489-504, 2009.

BLAIR, B.G.; LARSON, C.A.; SAFAEI, R.; HOWELL, S.B. Copper Transporter 2 Regulates the Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 13, p. 4312–4321, 2009.

BUTTAR, N.S.; FERNANDEZ-ZAPICO, M.E.; URRUTIA, R. Key role of Krüppel-like factor proteins in pancreatic cancer and other gastrointestinal neoplasias. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 22, n.5, p.505-11, 2006.

BOTSTEIN, D. AND FINK, G.R. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. **Genetics**. v. 189, p.695–704, 2011.

BROACH, J.R.; PRINGLE, J.R. AND JONES, E.W. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor**, New York, 1991.

BUCCI, C.; LIJTCKE, A.; MORTIMER, O.S.; OLKKONEN, V.M.; DUPREE, P. *et al*. Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. **FEBS Letters**. v.366, p. 65-71, 1995.

BURSTEIN, H.J.; OVERMOYER, B.; GELMAN, R. *et al*. Rebeccamycin analog for refractory breast cancer: A randomized phase II trial of dosing schedules. **Invest New Drugs**, v. 25, n.2, p. 161–164, 2007.

CAROZZI, V.; CHIORAZZI, A.; CANTA, A.; *et al.* Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat modelo f peripheral neurotoxicity. **Eur J Cancer**, Dec, 2008.

CHIARIELLO, M.; BRUNI, C.B.; BUCCI, C. The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are diferentially phosphorylated in vitro. **FEBS Letters**. v.453, p.20-24, 1999.
CLÉMENT, M.J.; RATHINASAMY, K.; ADJADJ, E.; TOMA, F.; CURMI, P.A. AND PANDA, D. Benomyl and Colchicine Synergistically Inhibit Cell Proliferation and Mitosis: Evidence of Distinct Binding Sites for These Agents in Tubulin. **Biochemistry**. v. 47, p. 13016–13025, 2008.

CLARKE, M.; DUMON, S.; WARD, C.; JÄGER, R.; FREEMAN, S. *et al*. MYBL2 haploinsufficiency increases susceptibility to age-related haematopoietic neoplasia. **Leukemia**. v.27, n.3, p.661-70, 2013.

DE FEO, C. J.; MOOTIEN, S.; UNGER, V.M. Tryptophan Scanning Analysis of the Membrane Domain of CTR-Copper Transporters. **J Membrane Biol**, v. 234, p.113–123, 2010.

DOLGOVA, N.V.; NOKHRIN, S.; YU, C.H.; GEORGE, G.N. AND DMITRIEV, O.Y. Copper chaperone Atox1 interacts with the metal-binding domain of Wilson's disease protein in cisplatin detoxification. **Biochem. J**. v.454, p.147–156, 2013.

DOWLATI, A.; CHAPMAN, R.; SUBBIAH, S. *et al*. "Randomized phase II trial of different schedules of administration of rebeccamycin analogue as second line therapy in non-small cell lung cancer." **Invest New Drugs**, v.23, n.6, p.563-7, 2005.

EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacol. Ther**. v.34, p.155–166, 1987.

EDGREN, H.; MURUMAGI, A.; KANGASPESKA, S.; NICORICI, D.; *et al*. Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing. **Genome Biol**. v. 12, n.1, 2011.

EULITZ, S.; SAUER, F.; PELISSIER, M.C.; BOISGUERIN, P.; *et al*. Identification of Xin Repeat Proteins as Novel Ligands of the SH3 Domains of Nebulin and Nebulette and Analysis of Their Interaction During Myofibril Formation and Remodeling. Mol Biol Cell. 2013.

FLURY, I.; GARZA, R.; SHEARER, A.; ROSEN, J.; CRONIN, S.; HAMPTON, R.Y. INSIG: a broadly conserved transmembrane chaperone for sterol-sensing domain proteins. **The EMBO Journal**. v. 24, p.3917–3926, 2005.

FONTES, A.P.S.; CÉSAR, E.T.; BERALDO, H. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. **Cadernos temáticos**, v.6, n.5, p.13-18, 2005.

GALEA, A.M. AND MURRAY, V. The Anti-tumour Agent, Cisplatin, and its Clinically Ineffective Isomer, Transplatin, Produce Unique Gene Expression Profi les in Human Cells. **Cancer Informatics**, v. 6, p.315–355, 2008.

GERRARD, S.R.; BRYANT, N.J. AND STEVENS, T.H. *VPS21* Controls Entry of Endocytosed and Biosynthetic Proteins into the Yeast Prevacuolar Compartment. **Molecular Biology of the Cell**. v. 11, p.613–626, 2000.

GHILLEBERT, R.; SWINNEN, E.; SNIJDER, P.; SMETS, B. AND WINDERICK, J. Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J**. v.434, p.243–251, 2011.

**Giaever, G.; Chu, A.M.; Ni, L.** *et al*. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nature**, v. 418, p. 387-391, 2002.

GOODWIN, A.; WANG, S.W.; TODA, T. *et al*. Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces* pombe. **Nucleic Acids Research**, v.27, n.20, 1999.

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.

GUTHRIE, C. AND FINK, G.R. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology. **Academic Press, San Diego**, v. 169, 1991.

HANDE, K.R. Topoisomerase II inhibitors. **Update On Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 13–26, 2008.

HANSEN, H.M.; XIAO, Y.; RICE, T.; BRACCI, P.M.; WRENSCH, M.R. *et al*. Fine mapping of chromosome 15q25.1 lung câncer susceptibility in African-Americans. **Human Molecular Genetics.** v.19, n.18, p.3652–3661, 2010.

HEINICKE, S.; LIVSTONE, M.S.; LU, C. *et al.* The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): A Comparative Genomics Analysis Tool for Biologists. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, p.766, 2007.

HERKERT, B. AND MARTIN EILERS. Transcriptional Repression: The Dark Side of Myc. **Genes Cancer**. v. 1, n.6, p.580–586, 2010.

HO, C.H.; PIOTROWSKI, J.; DIXON, S.J.; BARYSHNIKOVA, A.; COSTANZO, M. AND BOONE, C. Combining functional genomics and chemical biology to identify targets of bioactive compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 15, p.66–78, 2011.

HOYT, M.A.; MACKE, J.P.; ROBERTS, B.T. AND GEISER, J.R. *Saccharomyces cerevisiae PAC2* Functions With *Cin1,* 2 and *4* in a Pathway Leading to Normal Microtubule Stability. **Genetics**. v.146, p.849-857, 1997.

HUANG, B.; JOHANSSON, M.J.O. AND BYSTRÖM, A.S. *et al*. An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. **RNA**. n.11, p.424–436, 2005.

HUBER, A.; FRENCH, S.L. TEKOTTE, H.; YERLIKAYA, S.; STAH, M. Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. **The EMBO Journal**. v.30, p.3052–3064, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE, D.J.; HERSKOWITZ, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **PNAS**, v. 99, n. 22, p. 14298–14302, 2002.

JENNER, L.; MELNIKOV, S.; LOUBRESSE, N.G.; BEN-SHEM, A.; ISKAKOVA, M.; URZHUMTSEV, A. Crystal structure of the 80S yeast ribosome. **Current Opinion in Structural Biology**. v.22, p.759–767, 2012.

JIANG, H.; SUN, J.; XU, Q.; LIU, Y. *et al*. Marchantin M: a novel inhibitor of proteasome induces autophagic cell death in prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**. p.4, 2013.

JINAWATH, N.;VASOONTARA, C.; JINAWATH, A. *et al*. Oncoproteomic Analysis Reveals Co-Upregulation of RELA and STAT5 in Carboplatin Resistant Ovarian Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 5, n.6, p.11198, 2010.

KASHUBA, V.; DMITRIEV, A.A.; KRASNOV, G.S.; PAVLOVA, T.; IGNATJEV, I. NotI Microarrays: Novel Epigenetic Markers for Early Detection and Prognosis of High Grade Serous OvarianCancer. **Int J Mol Sci**. v.13, n. 10, p.13352-77, 2012.

Kelland, L. Tumour resistance to cisplatin and carboplatin mediated by inadequate levels of platinum reaching target DNA. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573-584, 2007.

KELLY, D. E.; LAMB, D.C. AND KELLY, S.L. Genome-wide generation of yeast gene deletion strains. **Comp Funct Genom**. v.2, p.236–242, 2001.
KIM, R.; HIRABAYASHI, N.; NISHIYAMA, M.; *et al*. mRNA expression of topoisomerase II in human tumors and normal tissues. **Japanese Journal of Surgery**, v. 21, n.5, p. 587-589, 1991.

KOLODNER R.D., CLEVELAND D.W., PUTNAM C.D. Aneuploidy Drives a Mutator Phenotype in Cancer **Science.** v. 333, n. 6045, p. 942-943. ago. 2011.

KOWALSKI, D.; PENDYALA, L.; DAIGNAN-FORNIER, B.; *et al*. Disregulation of Purine Nucleotide Biosynthesis Pathways Modulates Cisplatin Cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae.* **Mol Pharmacol**. v.74, n.4, p.1092-100, 2008.

LANGER, T.; DINNESEN, A.A.Z. RADTKE, S.; MEITERT, J. AND ZOLK, O. Understanding platinum-induced ototoxicity. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 34, n.8, 2013.

LECOMPTE, O.; RIPP, R.; THIERRY, J.C.; MORAS, D. AND POCH, O. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. **Nucleic Acids Research**. v. 30, n. 24, 2002.

LEE, Y.Y.; CHOI, C.H.; DO, I.G.; SONG, S.Y.; LEE, W.; PARK, H.S. Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. **Gynecologic Oncology**. v.122, p.361–365, 2011.

LIANG, Y.; LIN, J.C.; WANG, K.; CHEN, Y.J.; LIU, H.H. *et al*. A nuclear ligand MRG15 involved in the proapoptotic activity of medicinal fungal galectin AAL (Agrocybe aegerita lectin). **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1800, p. 474–480, 2010.

LIAO, C.; HU, B.; ARNO, M.J. AND PANARETOU, B. Genomic Screening in Vivo Reveals the Role Played by Vacuolar H_ ATPase and Cytosolic Acidification in Sensitivity to DNA-Damaging Agents Such as Cisplatin. **Mol Pharmacol**. v.71, p.416–425, 2007.

LIPPMAN, S.I. AND BROACH, J.R. Protein kinase A and TORC1 activate genes for ribosomal biogenesis by inactivating repressors encoded by Dot6 and its homolog Tod6. **PNAS.** v.106, p.19928–1993, 2009.

LIU, J.J.; KIM, Y.; YAN, F.; DING, Q. *et al*. Contributions of rat Ctr1 to the uptake and toxicity of copper and platinum anticancer drugs in dorsal root ganglion neurons. **Biochemical Pharmacology**. v.85, p.207–215, 2013.

LIU, Y.; LIU, P.; WEN, W.; JAMES, M.A.; WANG, Y.; BAILEY-WILSON, J.E. *et al*. Haplotype and Cell Proliferation Analyses of Candidate Lung Cancer Susceptibility Genes on Chromosome 15q24-25.1. **Cancer Res**. v.69, n.19, p.7844–7850, 2009.

LOIBL, M.; GROSSMANN, G.; STRADALOVA, V.; KLINGL, A.; RACHEL, R. C Terminus of Nce102 Determines the Structure and Function of Microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* Plasma Membrane. **EUKARYOTIC CELL**. v. 9, n. 8, p. 1184–1192, 2010.

MANNA, S.; SINGHA, B.; PHYO, S.A.; GATLA, H.R. *et al*. Proteasome Inhibition by Bortezomib Increases IL-8 Expression in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells: The Role of IKKα. **J Immunol**. v.191, n.5, p.2837-46, 2013.

MARMINON C.; ANIZON F.; MOREAU P. *et al*. Rebeccamycin derivatives as dual DNA-damaging agents and potent checkpoint kinase 1 inhibitors. **Molecular Pharmacology**. v. 74, n. 6, p. 1620-1629, 2008.

MARMINON C.; ANIZON F.; MOREAU P. *et al.* Rebeccamycin derivatives as dual DNA-damaging agents and potent checkpoint kinase 1 inhibitors. **Molecular Pharmacology**. v. 74, n. 6, p. 1620-1629, 2008.

MARTINEZ, I. & DIMAIO, D. B-Myb, cancer, senescence, and microRNAs. **Cancer Res**. v.71, n.16, p.5370-3, 2011.

MATEI, D.; FANG, F.; SHEN, C. *et al*. Epigenetic Resensitization to Platinum in Ovarian cancer. **Cancer Res**, v.72, p.2197-2205, 2012.

MCWHINNEY, S.R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H.L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 1, 2009.

MCWHINNEY, S.R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H.L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 1, 2009.

MESA-ARANGO, A.C.; SCORZONI, A. AND ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as anti-fungal and iMmunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**. v.3, n.286, 2012.

MOON, D.H.; LEE, J.M.; NOONAN, A.M.; ANNUNZIATA, C.M.; MINASIAN, L.; HOUSTON, N.; HAYS, J.L. AND KOHN, E.C. Deleterious BRCA1/2 mutation is an independent risk factor for carboplatin hypersensitivity reactions. **British Journal of Cancer**. v.109, p.1072–1078, 2013.

MORENO, J.I.; PATLOLLA, B.; BELTON, K.R.; JENKINS, B.C. *et al*. Two independent activities define Ccm1p as a moonlighting protein in *Saccharomyces cerevisiae.* **Biosci. Rep**. v.32, p.549–557, 2012.

NAIM, V.; DEBATISSE, T.M. & ROSSELLI, F. ERCC1 and MUS81–EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. **Nature Cell Biology**. v.15, p.1008–1015, 2013.

NEELSEN, K.J.; ZANINI, I.M.Y.; HERRADOR, R. AND LOPES, M. Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. **JCB.** v. 200, n. 6, p.699-708, 2013.

NELSON, A.E.; ROBINSON, B.G.; MASON, R.S. Oncogenic osteomalacia: is there a new phosphate regulating hormone?. **Clin Endocrinol**. v.47, n.6, p.635-42, 1997.

NISHIZAWA, T.; ALDRICH, C.C.; AND SHERMAN, D.H. Molecular analysis of the rebeccamycin l-amino acid oxidase from L*echevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. **Journal of Bacteriology**, p. 2084–2092, 2005.

ON THE BANKS OF THE RED CEDAR. Disponível em: <http://onthebanks.msu.edu/Exhibit/1-6-8/barnett-rosenberg/>. Acesso em 24 de maio de 2012.

PAPADOPOULOS, M.C.; SAADOUN, S. AND VERKMAN, A.S. Aquaporins and cell migration. **Pflugers Arch**. v.456, n.4, p. 693–700, 2008.

PETERSEN, R.H.; WALLACE, M.; HOFMANN, K.; KOCH, G.; JOHNSEN, A.H.; HENDIL, K.B. AND GORDON, C. The Ubx2 and Ubx3 Cofactors Direct Cdc48 Activity to Proteolytic and Nonproteolytic Ubiquitin-Dependent Processes. **Current Biology**. v.14, p.824–828, 2004.

PIKE, B.L.; YONGKIETTRAKUL, S.; TSAI, M.D. AND HEIERHORST, J. Mdt1, a Novel Rad53 FHA1 Domain-Interacting Protein, Modulates DNA Damage Tolerance and G2/M Cell Cycle Progression in *Saccharomyces cerevisiae.* **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.** v.24, n.7, p. 2779–2788, 2004.

PINTARD, L.; LECOINTE, F.; BUJNICKI, J.M.; BONNEROT, C.; *et al.* Trm7p catalyses the formation of two 2'-O-methylriboses in yeast tRNA anticodon loop. **The EMBO Journal**. v. 21, n. 7, p. 1811±1820, 2002.

PUCHTA, O.; LUBAS, M.; LIPINSKI, K.A.; PIATKOWSKI, J.; MALECKI, M. AND GOLIK, P. DMR1 (CCM1/YGR150C) of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes an RNA-Binding Protein from the Pentatricopeptide Repeat Family Required for the Maintenance of the Mitochondrial 15S Ribosomal RNA. **Genetics**. v.184, p.959–973, 2010.

RASHEED, Z.A. AND RUBIN, E.H. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. **Oncogene**, v.22, p.7296–7304, 2003.

RATHINASAMY, K. AND PANDA, D. Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. **FEBS Journal**. v.273, p.4114–4128, 2006

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. v. 205, p. 698–699, 1965.

RUGGIERO, A.; TROMBATORE, G.; TRIARICO, S.; ARENA, R.; FERRARA, P. *et al*. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. **Anti-Cancer Drugs**. 2013.

RUSSO, P.; SIMONEN, M.; UIMARI, A.; TEESALU, T.; MAKAROW, M. Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast *HSP150* gene encoding a secretory glycoprotein. **Mol Gen Genet**. v.239, p.273-280, 1993.

Saccharomyces GENOME DATABASE. Disponível em: <SDS http://www.yeastgenome.org >. Acesso em: 24 maio de 2012.

SALAS, J.A. AND MÉNDEZ, C. Indolocarbazole antitumour compounds by combinatorial biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.13, p.152–160, 2009.

SÁNCHEZ, C.; BUTOVICH, I.A.; BRAÑA, A.F. *et al*. The Biosynthetic Gene Cluster for the Antitumor Rebeccamycin: Characterization and Generation of Indolocarbazole Derivatives. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 519–531, 2002.

SÁNCHEZ, C.; MÉNDEZ, C. AND SALAS, J.A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. **Nat. Prod. Rep**,v. 23, p. 1007–1045, 2006.

SCHENK, P. W.; BOERSMA, A.W.M.; BRANDSMA, J.A.; DULK, H.D.; BURGER, H. *SKY1* Is Involved in Cisplatin-induced Cell Kill in *Saccharomyces cerevisiae*, and Inactivation of Its Human Homologue, *SRPK1*, Induces Cisplatin Resistance in a Human Ovarian Carcinoma Cell Line. **CANCER RESEARCH**. v.61, p.6982–6986, 2001.

SCHENK, P.W.; BROK, M.; BOERSMA, A.W.M. *et al*. 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**, n.64, p. 259–268, 2003.

SECCO, D.; WANG, C.; SHOU, H.; WHELAN, J. Phosphate homeostasis in the yeast Saccharomyces cerevisiae, the key role of the SPX domain-containing proteins. **FEBS Letters**. v.586, p.289–295, 2012.

SHELTZER, J.M.; BLANK, H.M.; PFAU, S.J.; *et al*. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. **Science,** v. 333, n. 6045, p. 1026-30, 2011.

SHI, L., NISHIOKA, W. K., THNG, J., *et al*. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. **Science**. v.263, n.5150, p. 1143-1145, 1994.

SONG, I.S.; SAVARA, J.N.; SIDDIK, Z.H.; *et al*. Roles of copper transporter ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and resistant cells.**Mol Cancer Ther**, n.3, p.1543-1552, 2004.

SONG, I.S.; SAVARAJ, N.; SIDDIK, Z.H.; *et al.* Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. **Mol Cancer Ther**, v.3, n.12, 2004.

STEFANSSON, O.A.; VILLANUEVA, A.; VIDAL, A.; MARTÍA, A. AND ESTELLER, M. *BRCA1* epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. **Epigenetics**. v.7, n.11, p.1225–1229, 2012.

STEWART, D.J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 63, p.12–31, 2007.

STEWART, L.; REDINBO, M.R.; QIU, X.; *et al*. A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. **Science**, v. 279, 1998.

STRATHERN, J.N.; JONES, E.W. AND BROACH, J.R. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor**, New York, 1981.

SU, N.Y.; OUNI, I.; PAPAGIANNIS, C.V. AND KAISER, P. A Dominant Suppressor Mutation of the *met30* Cell Cycle Defect Suggests Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Met4-Cbf1 Transcription Complex by Met32. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v. 283, n. 17, p. 11615–11624, 2008.

SUN, B.; HONG, J.; ZHANG, P.; DONG, X.; SHEN, X.; *et al*. Molecular Basis of the Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Eaf3 Chromo Domain with Methylated H3K36. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v. 283, n. 52, p. 36504–36512, 2008.

TAKUJIWADA, N.T.; YAMAMOTO, K.T. AND OKADA, K. The Arabidopsis STV1 Protein, Responsible for Translation Reinitiation, Is Required for Auxin-Mediated Gynoecium Patterning. **The Plant Cell.** v. 17, p.2940–2953, 2005.

TAM, W.F.; HÄHNEL, P.S.; SCHÜLER, A.; *et al*. STAT5 Is Crucial to Maintain Leukemic Stem Cells in Acute Myelogenous Leukemias Induced by MOZ-TIF2. **Cancer Res**. v.73, n.1, 2013.

TAO, Y.; LETEUR, C.; YANG, C. *et al*. Radiosensitization by Chir-124, a selective CHK1 inhibitor: effects of p53 and cell cycle checkpoints. **Cell Cycle**, v. 8, p. 1196–205, 2009.

THEESFELD, C.L. AND HAMPTON, R.Y. Insulin-induced Gene Protein (INSIG)-dependent Sterol Regulation of Hmg2 Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) in Yeast. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v.288, n.12, p. 8519–8530, 2013.

TIAN, G.; HUANG, Y.; ROMMELAERE, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; AMPE, C. AND COWAN, N.J. Pathway Leading to Correctly Folded b-Tubulin. **Cell**. v.86, p.287–296, 1996.

TKACH, J.M.; YIMIT1, A.; LEE, A.Y.; RIFFLE, M.; COSTANZO, M.; *et al.* Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nat Cell Biol**. v.14, n.9, p.966-76, 2012.

TORRES, E.M.; DEPHOURE, N.; PANNEERSELVAM, A.; TUCKER, C.M., *et al*. Identification of Aneuploidy-tolerating Mutations. **Cell**. v. 143, n.1, p. 71-83, 2010.

TSANG, H.T.H.; CONNELL, J.W.; BROWN, S.E.; THOMPSON, A.; REID, E.; SANDERSON, C.M. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. **Genomics**. v.88, P.333–346, 2006.

TSE, A.N.; RENDAHL, K.G.; SHEIKH, T. *et al*. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 591–602, 2007.

VELICHUTINA, I.; CONNERLY, P.L.; ARENDT, C.S.; LI, X. AND HOCHSTRASSER, M. Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. **The EMBO Journal**. v.23, p. 500–510, 2004.

VELTEL, S.; GASPER, R.; EISENACHER, E. & WITTINGHOFER, A. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPaseactivating protein for Arf-like 3. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 15, n. 4, 2008.

WAGNER, R.; STRAUB, M.L.; SOUCIET, J.L.; POTIER, S. AND MONTIGNY, J. New Plasmid System To Select for *Saccharomyces cerevisiae* Purine-Cytosine Permease Affinity Mutants. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. v. 183, n.14, p. 4386–4388, 2001.

WALKER, L.A.; GOW, N.A R.; MUNRO, C.A. Elevated Chitin Content Reduces the Susceptibility of *Candida* Species to Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n.1, p.146–154, 2013.

WANG, D. AND LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 307-320, 2005.

WEILLE, J.; FABRE, C.; BAKALARA, N. Oxysterols in cancer cell proliferation and death. **Biochemical Pharmacology**. v.86, p.154–160, 2013.

WILSON, M.A.; MEAUX, S. AND HOOF, A.V. A Genomic Screen in Yeast Reveals Novel Aspects of Nonstop mRNA Metabolism. **Genetics**. v.177, p.773–784, 2007.

WINZELER, E. A., SHOEMAKER, D. D., ASTROMOFF, A. *et al*. Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. **Science**, v. 285, p. 901, 2011.

WOZNIAK, K. AND BLASIAK, J. Recognition and repair of DNA cisplatin adducts. **Acta Biochim Polon**, v. 49, n. 3, p.583-596, 2002.

YANG , M.; SUN , H.; WANG , H.; ZHANG , S.; YU, X. AND ZHANG, L. Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. **Med Oncol**. v.30, p.646, 2013.

YANG, H.; LIU, C.; JAMSEN, J.; WU, Z.; WANG, Y.; CHEN, J.; ZHENG, L.; SHEN, B. The DNase domain-containing protein TATDN1 plays an important role in chromosomal segregation and cell cycle progression during zebrafish eye development. **Cell Cycle**. v.11, n.24, p.4626-32, 2012.

YAO, Y.; LING, Q.; WANG, H. AND HUANG, H. Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. **Development**. v.135, p.1325-1334, 2008.

ZABLUDOFF, S.D.; DENG, C.; GRONDINE, M.R. *et al*. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. **Mol Cancer Ther**, v.7, p. 2955–66, 2008.

ZHANG, G.B.; CHEN, J.; WANG, L.R. *et al*. RRM1 and ERCC1 expression in peripheral blood versus tumor tissue in gemcitabine/carboplatin treated advanced non-small cell lung câncer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 69, p.1277–1287, 2012.

ZHAO B.; BOWER M.J.; MCDEVITT P.J.; *et al*. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 277, n. 48, p. 46609-46615, 2002.

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

ZHOU, F.; ROY, B.; ARNIM, A.G.V. Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. **BMC Plant Biology**. v.10, p.193, 2010.