

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**



Marco Raabe Argenti

**Ausência da proteína Nek1 aumenta a
instabilidade genômica e o
recrutamento da proteína 53BP1 em
células de glioblastoma**

**Porto Alegre
2023**

Marco Raabe Argenti

**Ausência da proteína Nek1 aumenta
a instabilidade genômica e o
recrutamento da proteína 53BP1 em
células de glioblastoma**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Dinara Jaqueline
Moura

**Porto Alegre
2023**

Catálogo na Publicação

Raabe Argenti, Marco Raabe Argenti

Ausência da proteína Nek1 aumenta a instabilidade genômica e o recrutamento da proteína 53BP1 em células de glioblastoma / Marco Raabe Argenti Raabe Argenti. -- 2023.

61 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2023.

Orientador(a): Profa. Dra. Dinara Jaqueline Moura.

1. Glioblastoma. 2. Reparo de DNA. 3. Quinase 1 Relacionada a NIMA. I. Título.

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço à minha orientadora, Dra. Dinara Jaqueline Moura, a quem devo meus cumprimentos e imensurável admiração pelo seu companheirismo, auxílio intelectual, orientação exímia e seu carinho e zelo sempre apreciado por seus alunos. Este projeto seria inviável sem tê-la comigo. Agradeço ao meu irmão, Bruno, com quem divido tudo em minha vida e a ele devo minhas palavras por todo suporte emocional, amizade e fraternidade envolvida, sendo não só meu irmão, mas meu maior amigo e companheiro de vida. À Luiza, minha namorada, agradeço pelo companheirismo, compreensão nos momentos árdus neste caminho e todo carinho que dividimos juntos desde a graduação. Nela deposito toda minha admiração e amor que merece. A outro grande companheiro de vida, Artur, um fraterno amigo que a vida me proporcionou e com quem divido boa parte dos meus dias, dividindo conhecimento, passando bons momentos e tornando este caminho que traçamos mais leve. Agradeço à minha mãe pelo suporte e tudo que me proporcionou até hoje, sem ela eu não teria feito nem metade desta caminhada até aqui. Por fim, agradeço ao meu pai, Zeca, uma figura de humor único, um viajante do mundo, um acumulador de experiências e aventuras, um parceiro e um cara que me tinha como ídolo e que não está mais presente ao nosso lado. Deixou a mim e ao meu irmão lembranças e histórias gravadas em coleções de fotografias, poemas e em nossas memórias. A ele, dedico este trabalho, concluindo este capítulo da minha trajetória acadêmica relembando a felicidade dele ao me ver ingressar em uma instituição federal, imaginando como seria se hoje estivéssemos juntos.

Resumo

Introdução: Gliomas são neoplasias de células gliais que compreendem a maioria dos tumores primários do SNC, sendo o glioblastoma multiforme (GB) o tipo maligno mais comum, representando 48% entre os tumores malignos do SNC. Os GB são agressivos e têm um prognóstico ruim, mesmo com a tríade de tratamento: ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ), tendo uma sobrevida média baixa de em torno de 14,6 meses. A busca por novos alvos moleculares e estratégias terapêuticas é fundamental. A proteína Nek1 é importante na resposta a danos no DNA, pois interage com proteínas envolvidas nas vias de reparo, apoptose e regulação de ciclo celular, tais como a 53BP1; estudos recentes têm apontado seu envolvimento na quimiorresistência e progressão tumoral. A Nek1, por ser uma proteína com funções cruciais na estabilidade genética através de diversos mecanismos, possui inúmeras rotas bioquímicas que podem ser afetadas na sua presença, ausência ou variação de expressão. Sua interação com proteínas como Ku80, ATR/ATM, Chk1, VHL, MRE11, MSH6 e Rad54 são exemplos de como a Nek1 mostra-se relevante na manutenção da homeostasia genética, envolvendo mecanismos de estabilização de forquilhas de replicação, parada de ciclo, reparo de DNA e outras funções associadas ao microambiente celular. A 53BP1 é outra proteína chave deste estudo, possuindo um papel diretamente relacionado com outra estrutura conhecida no contexto tumoral, a proteína BRCA1. Seu envolvimento sinérgico com a BRCA1 dá-se através da regulação e direcionamento às vias de HR e NHEJ nas primeiras etapas após a sinalização de dano. **Objetivos:** Analisar a

genotoxicidade utilizando o teste de micronúcleo em linhagens com a proteína Nek1 Knockout (Nek1-KO) durante um protocolo clínico simulado, após tratamento com TMZ e o radiomimético zeocina, assim como avaliar a relação da ausência da proteína Nek1 no recrutamento da proteína 53BP1, utilizando uma linhagem com a proteína 53BP1 truncada fluorescente. **Metodologia:** As células (Nek1-WT e Nek1-KO) foram tratadas com TMZ e zeocina por 7 dias, após o tratamento foram lavadas e incubadas com citocalasina B por 36h, fixadas e coradas para avaliação da formação de micronúcleos. O recrutamento da proteína 53BP1 também foi avaliado nas linhagens Nek1-WT e Nek1-KO, por microscopia de fluorescência; após tratamentos, imagens foram adquiridas por 24h no InCell Analyzer 2200 e a contagem de *foci* da 53BP1 foi mensurada. **Resultados e Conclusão:** Os resultados indicam um aumento de genotoxicidade na linhagem Nek1-KO, indicando um envolvimento desta proteína na manutenção da estabilidade genômica. Adicionalmente, foi possível observar uma diminuição na resolução de quebras duplas, pela marcação mais persistente da proteína 53BP1 na linhagem sem a proteína Nek1 (U87-KO), sugerindo uma relação da proteína Nek1 no recrutamento de outras proteínas envolvidas no reparo de quebras duplas.

Palavras-chave: Glioblastoma, Resposta ao dano de DNA, Nek1, 53BP1

Abstract

Introduction: Gliomas are glial cell neoplasms which comprise the majority of primary CNS tumors, with glioblastoma multiforme (GB) being the most common malignant type, representing 48% of CNS malignant tumors. GB are aggressive and have a poor prognosis, even with the triad of treatment: surgical resection, radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ), with a low average survival, around 14,6 months. The search for new molecular targets and therapeutic strategies is essential. The Nek1 protein is key in the response to DNA damage, as it interacts with proteins involved in repair, apoptosis and cell cycle regulation pathways, such as 53BP1; recent studies have pointed to its involvement in chemoresistance and tumor progression. Nek1 is a protein with crucial mechanisms on genetic stability through many mechanisms, it works in many biochemical routes that may be affected by its presence, the lack of it or expression variability. Its interaction with proteins such as Ku80, ATR/ATM, Chk1, VHL, Mre11, MSH6 and Rad54 are examples of how Nek1 is relevant on maintaining the genetic homeostasis, evolving replication fork stability mechanisms, cell cycle arrest, DNA repair and other functions linked to the cellular microenvironment. 53BP1 is another key protein of this study, having a direct relation with another known structure in the tumoral context, the BRCA1 protein. Its synergistic role with BRCA1 happens through the regulation and direction to the HR and NHEJ pathways on the first steps after a damage occurs. **Aim of study:** To analyze genotoxicity using the micronucleus test in strains with the Nek1 Knockout protein (Nek1-KO) during a simulated clinical protocol, after treatment with TMZ and the radiomimetic zeocin, as well as to evaluate the relationship between the absence of the Nek1 protein and the

recruitment of 53BP1 protein, using a strain with the truncated 53BP1 protein.

Methodology: Cells (Nek1-WT and Nek1-KO) were treated with TMZ and zeocin for 7 days, after treatment they were washed and incubated with cytochalasin B for 36h, fixed and stained to evaluate the formation of micronuclei. Recruitment of 53BP1 protein was also evaluated in Nek1-WT and Nek1-KO strains by fluorescence microscopy; after treatments, images were acquired for 24h in the InCell Analyzer 2200 and the fluorescence intensity of 53BP1 was measured. **Results and Conclusion:** The results indicate an increase in genotoxicity in the Nek1-KO cell line, indicating an involvement of this protein in the maintenance of genomic stability. Additionally, it was possible to observe a decrease in the resolution of double breaks, due to the more persistent labeling of the 53BP1 protein in the strain without the Nek1 protein (U87-KO), suggesting a relationship of the Nek1 protein in the recruitment of other proteins involved in the repair of double breaks.

Keywords: Glioblastoma, DNA damage Response, Nek1, 53BP1

Lista de abreviaturas

GB: glioblastoma multiforme

OMS: Organização mundial da saúde

HR: do inglês *Homologous Repair*

NHEJ: do inglês *Non-homologous end joining repair*

SNC: Sistema nervoso central

TMZ: Temozolomida

ZEO: Zeocina

DSB: do inglês *Double strand breaks* SSB: do inglês *Single strand breaks*

CRISPR: do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*

Repeats MGMT - O6-metilguanina-DNA metiltransferase

MMR – do inglês *Mismatch Repair*

MTIC – 5-(3-metil triazen-1-il) imidazol-4-carbozamida

NIMA – do inglês *Never in Mitosis A*

ATM – do inglês *ataxia telangiectasia mutated*

ATR – do inglês *Rad3-related protein*

DDR - do inglês, *DNA Damage Response*

O6 - O6-Metilguanina

SSB - do inglês, *single strand break*

ICL - do inglês, *DNA interstrand crosslink*

Lista de Figuras

Fig. 1: Dados sobre Glioblastomas	14
Fig. 2: Ciclo fútil do MMR	17
Fig. 3: Mecanismos de toxicidade e resistência da TMZ	19
Fig. 4: Nek1 e suas principais interações	24
Fig. 5: Mecanismos celulares e a Nek1	25
Fig. 6: Mecanismo do BRCA1 com 53BP1 para entrada em HR ou NHEJ	27

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1. Diagnóstico e tratamento	14
1.2. Resistência tumoral e relações com vias de reparo de DNA	17
1.3 Proteínas de reparo como alvos moleculares para tratamento	20
1.4 Nek1	21
1.5 53BP1	25
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
3. OBJETIVOS	36
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	37
5. CONCLUSÕES	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7. ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA	

1. REFERENCIAL TEÓRICO

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos primários mais comuns em adultos. Eles podem ocorrer em qualquer parte do sistema nervoso central, mas ocorrem principalmente no cérebro e surgem no tecido glial. Embora esses tumores sejam tipicamente malignos, alguns tipos não se comportam consistentemente de maneira maligna [1]. Os gliomas são astrocíticos, oligodendrocíticos ou uma mistura desses 2 tipos de células e são normalmente categorizados de acordo com a Classificação Internacional de Doenças–Oncologia, versão 3 (CID-O-3) e grau da Organização Mundial da Saúde (OMS). Conforme a classificação de tumores de SNC pela OMS, os gliomas apresentam-se nos quatro graus devido à sua variabilidade. O tumor primário mais comum do SNC, de origem astrocitária, é o GB, sendo uma neoplasia maligna de prognóstico ruim, com dificuldades de manejo e agressividade acentuada.

A classificação da OMS não é mandatória clinicamente, mas baseia-se em critérios de genotipagem e histológicos que caracterizam o desenvolvimento e o comportamento da neoplasia no indivíduo acometido [2]. Normalmente, associa-se o grau com definições genéticas de mutações já estabelecidas, como marcadores comuns entre diferentes tumores. Mutações nos genes IDH1/IDH2 são comuns entre grande parte dos gliomas, estando também associados à alteração de função da proteína alfa-cetoglutarato e da p53 [2, 3]. Neste sentido, a classificação serve como uma forma de agrupar geneticamente as neoplasias conforme suas semelhanças, podendo mudar conforme novas associações entre genes e o desenvolvimento destes tumores.

As neoplasias primárias que acometem o SNC são majoritariamente benignas, compreendendo 70,3% contra 29,7% de casos malignos [4]. Dentre os tumores benignos, o mais comum é o meningioma (53,9%), sendo um tumor de crescimento lento com uma diversidade expressiva em termos de genes afetados conforme a região do crânio acometida, normalmente diagnosticada devido aos sintomas causados oriundos dos efeitos nas regiões do cérebro afetadas fisicamente, pelo crescimento do tumor, expressadas através de dores de cabeça, tonturas, convulsões, perdas cognitivas entre outros diversos sintomas associados ao SNC [4]. Por outro lado, dentre as neoplasias malignas, o tumor mais comum são os GB (45%), sendo ainda um câncer com baixa frequência de cura, com expectativa média de vida de 14 a 16 meses, e uma sobrevida máxima de 5 anos em 9,8% dos pacientes, quando submetidos à tratamento (Figura 1) [5].

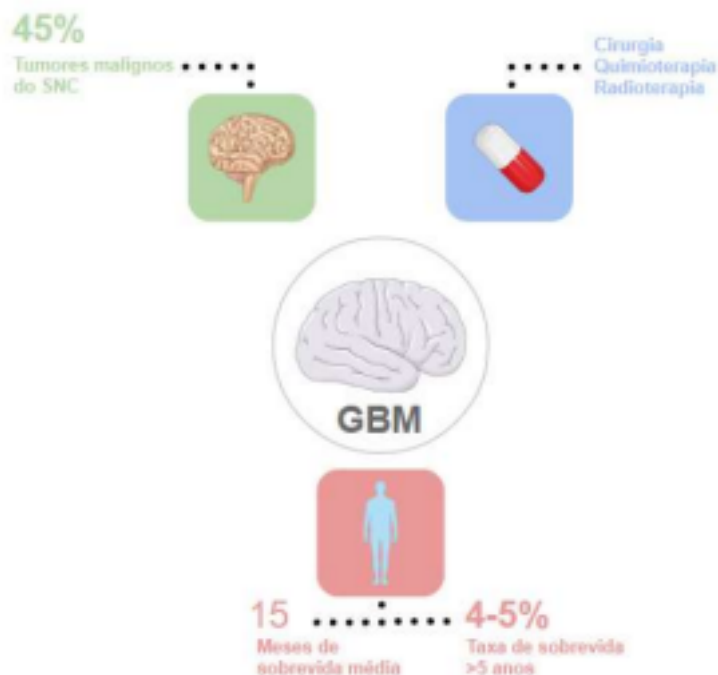


Fig.1 Dados sobre GBs. Os GBs representam 45% dentre todos os tumores malignos do SNC, sendo alvo de intervenções terapêuticas com quimioterápicos, radioterapia e cirurgia. Possui uma sobrevida média de 15 meses e apenas cerca de 5% dos pacientes sobrevivem mais que 5 anos.

Os GB são mais comuns em pacientes idosos (80% dos casos), com idade média de 64 anos e normalmente apresentam um aumento de expressão do gene EGFR, mutação no gene PTN, deleção do CDKN2A e amplificação do MDM2, sendo esta última menos frequente. Mutações nos genes IDH1/IDH2 são comuns (70-80%) nos GB primários de grau WHO I e II e secundários e apenas em 10% dos casos WHO III e IV [6]. Os casos de GB secundários normalmente são oriundos de oligodendrogliomas e astrocitomas de grau I e II, carregando mutações no gene P53 e/ou IDH1/IDH2. A diferença expressiva entre os gliomas de menor severidade e os GB consiste na rápida infiltração em tecidos adjacentes, necrose e vascularização [5].

1.1 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico de GB normalmente acontece através de exames clínicos em torno dos sintomas seguidos de uma biópsia do tecido e ressonância magnética, sendo facilmente diagnosticado através destes métodos [7]. Similar a outras neoplasias, as possíveis intervenções para tratamento consistem na remoção cirúrgica do tecido afetado, quimioterapia e radioterapia. A remoção cirúrgica do tecido já possui técnicas para auxiliar a precisão na ressecção do tecido, como a cirurgia guiada por fluorescência. Este método consiste na administração oral do aminoácido 5-ALA que será metabolizado pelo tecido tumoral em PpIX, uma porfirina fotossensível de metabolização altamente específica pelas áreas acometidas pelo tumor (98%). Em 90% dos casos após a cirurgia o tumor volta a se desenvolver no tecido primário; porém, não invalida a necessidade da cirurgia para atenuação dos efeitos nos tecidos adjacentes bem como para exames histopatológicos e genéticos do tecido a fim de caracterizá-lo. Apesar do avanço das técnicas cirúrgicas, os métodos invasivos no SNC ainda apresentam riscos às regiões adjacentes devido à alta precisão requerida e à sensibilidade do tecido.

Continuamente, a quimioterapia apresenta-se como o método mais comum e eficaz como intervenção em GBs. A TMZ, um agente alquilante, é o pró-fármaco que origina o metabólito ativo MTIC, aprovado pelas agências reguladoras para estes casos. Seu mecanismo consiste na adição de grupamentos metila às bases purinas do DNA (O6-Guanina; N7-guanina e N3-adenina) [8]. Naturalmente, as adições de metilas à O6-Guanina (O6-MeG) são reparadas através da enzima MGMT, removendo a metila e mantendo a

guanina na fita. Porém, quando não reparada, a O6-MeG é erroneamente pareada com uma timina e, conseqüentemente, sinalizando a necessidade de reparo através da via MMR [8]. Subseqüentemente, a via reconhece a timina e remove esta base, mas mantém a lesão O6-MeG na fita pareada e este ciclo de sinalização e remoção de timinas ocorre diversas vezes, causando o chamado ciclo fútil, resultando em quebras sequenciais na fita de DNA (Figura 2) [8, 9]. A partir das lesões de quebra, há a interrupção do ciclo celular em G2/M e o início da apoptose, idealmente [8]. As lesões N7-MeG e N3-MeG são normalmente reparadas de forma eficiente e apenas a última tem característica citotóxica quando permanece na fita de DNA [8].

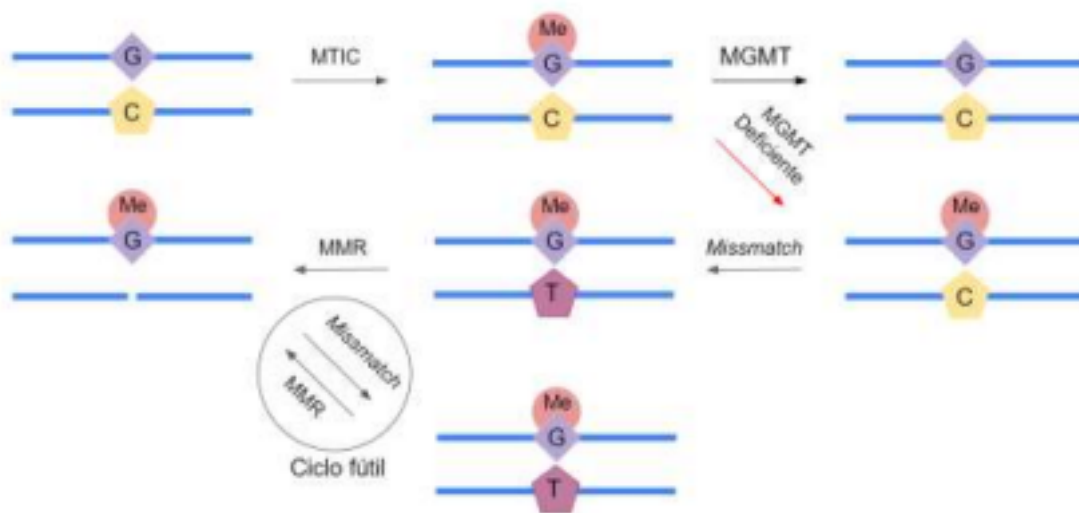


Fig. 2: Ciclo fútil do MMR: A toxicidade causada pela TMZ dá-se através da metilação de guaninas no O-6. A enzima MGMT naturalmente repara essa lesão removendo a metila e restabelecendo a estrutura da fita de DNA; no entanto, excesso de metilações ou organismos com baixa expressão ou deficiência de MGMT permanecem com a metilação no DNA. Outro mecanismo de reconhecimento de dano subsequente detecta que há uma alteração na fita e, em vez de remover a base metilada remove a base pareada - Citosina; Continuamente, a via do MMR reconhece a necessidade de reparo e a síntese da nova base é feita de forma errônea, pareando uma timina à guanina metilada. Por fim, a timina volta a ser reconhecida como um erro pela mesma via para então ser novamente sintetizado uma outra timina, tornando a rota bioquímica estagnada no chamado ciclo fútil, onde há a constante remoção de uma base e a síntese da mesma no mesmo local.

A radioterapia, por sua vez, possui dois mecanismos para causar danos ao DNA e induzir à apoptose. A exposição de células à radiação resulta diretamente na desestruturação das moléculas que formam o DNA, causando estresse severo na fita e quebrando-a nas ligações fosfodiéster em diversas regiões. O objetivo, assim como na quimioterapia, é que aconteça a parada do ciclo celular, e que, as vias de reparo não consigam reparar os danos em sua totalidade, direcionando-as à apoptose. Adicionalmente, há um mecanismo secundário, que acontece simultaneamente através da ionização das moléculas de água presente nas células, gerando radicais livres e causando dano oxidativo ao DNA [10]. Evidentemente há de considerar que tumores que não

são superficiais, as células que estão nos tecidos entre o tumor e a superfície do corpo serão afetadas; contudo, as células tumorais de proliferação rápida foram descritas como mais sensíveis à radioterapia, que as células normais [11]. As intervenções clínicas podem e devem ser combinadas, quando possível. A expectativa média de sobrevida aumentou de 12,6 para 14,6 meses em pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia simultaneamente, quando comparado à intervenção somente com radioterapia [12, 13]. Apesar deste aumento, as intervenções discutidas apresentam problemas nítidos, como efeitos adversos associados à quimioterapia (trombocitopenia, linfopenia e neutropenia) e a radioterapia (danos aos tecidos adjacentes) [14]. Além disso, a seletividade da barreira hematoencefálica às substâncias presentes no sangue também dificultam a entrega da TMZ ao SNC. Porém, as maiores dificuldades no tratamento de GB e mais comumente estudadas consistem nos mecanismos celulares envolvidos na resistência natural e adquirida aos tratamentos clássicos [14, 15].

1.2 Resistência tumoral e relações com vias de reparo de DNA

A sobrevivência de GB submetidos aos tratamentos normalmente dependem de alterações que modifiquem a resposta aos agentes genotóxicos, regulando eficientemente vias de ciclo celular, reparo de DNA e apoptose favorecendo a sobrevivência tumoral [16, 17]. Quando analisamos o mecanismo da TMZ, por exemplo, evidencia-se a necessidade de um balanço complexo de expressão entre a enzima MGMT e a via de reparo MMR, visto que o tratamento torna-se mais eficiente quando temos uma baixa expressão de MGMT e a via do MMR funcional (Figura 3) [18]. Um estudo com mais de 4 mil

indivíduos demonstrou que pacientes contendo maior número de metilações na enzima MGMT resultaram numa sobrevida média maior, independente das variações no MMR [19]. Este dado não só possibilita novos estudos como facilita a predição de como intervir e o que esperar do prognóstico dos indivíduos, visto que as análises foram feitas através da coleta de soro dos pacientes, podendo ser aplicada clinicamente.

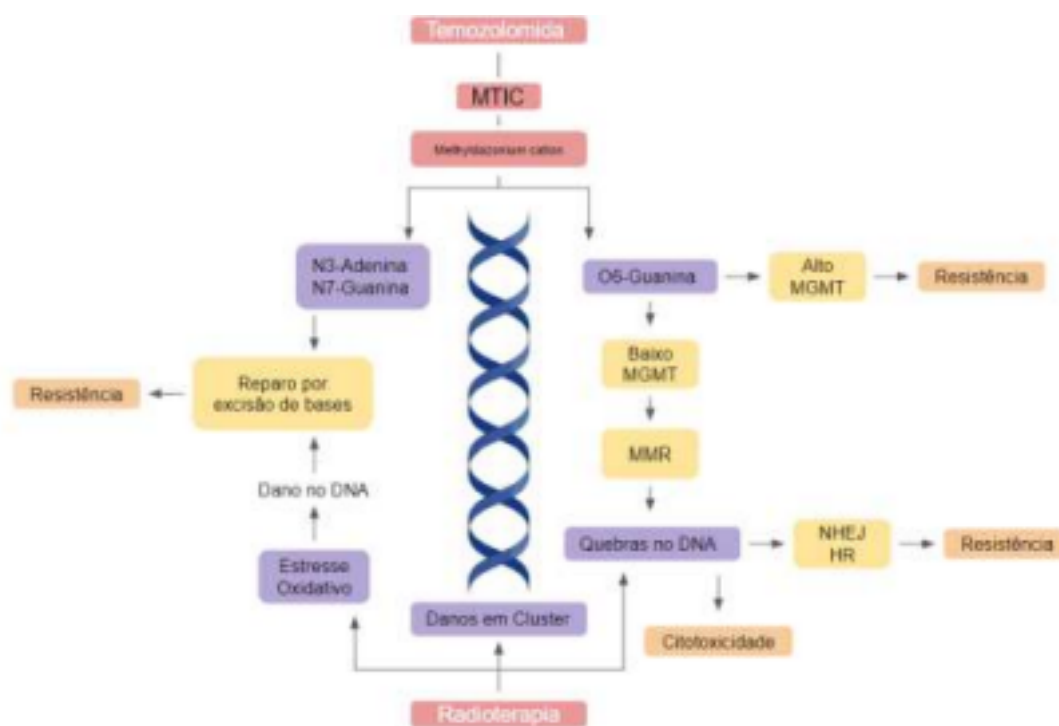


Fig. 3 Mecanismos de citotoxicidade e resistência da TMZ: O metabólito da TMZ possui a capacidade de metilar as purinas nos sítios N3 de adeninas, N7 e O6 de guaninas. As metilações presentes nos nitrogênios são majoritariamente reparadas pela via BER, conferindo resistência ao tratamento por não acumular danos e não resultar em morte celular. No entanto, as metilações no O6 das guaninas podem conferir resistência caso haja uma atividade efetiva da enzima MGMT ao remover as guaninas; em contrapartida, níveis baixos de MGMT limitam o reparo ao ciclo fútil e subsequente quebras no DNA. Da mesma forma, a radioterapia causa danos no DNA gerados pelo stress oxidativo oriundo da excitação de moléculas oxigenadas gerando espécies reativas de oxigênio na matriz nuclear. Esses danos são também comumente reparados em gliomas. Por outro lado, a radiação ionizante gera quebras duplas de forma direta, sem reações intermediárias. Nos casos onde o ciclo fútil mostrou-se presente e as quebras duplas causadas pela radiação ionizante foram exacerbadas, a citotoxicidade estará presente devido à incapacidade de reparo. Caso os mecanismos de reparo prévios ao NHEJ e HR de sinalização de dano por estruturas como a Nek1 estejam atuando de forma funcional e o reparo aconteça de forma efetiva, as células apresentam resistência ao tratamento.

Outro estudo conduzido *in vivo* demonstrou que há uma relação direta entre a redução do surgimento e crescimento de gliomas, bem como o aumento da sobrevida média de indivíduos, quando há a indução do aumento da expressão de RAD51, proteína de papel central no HR [20]. Paralelamente, a perda da função de ATRX, proteína relevante na síntese de DNA durante o HR, demonstrou-se relevante no surgimento de gliomas; no entanto, o efeito inverso também é verdadeiro, quando sua atividade está ocorrendo naturalmente há uma atenuação no surgimento e crescimento de gliomas devido ao seu papel na síntese de DNA durante o HR [21]. A via de reparo NHEJ também é alterada devido à perda de função de ATRX, porém as justificativas por trás do mecanismo dela nesta via ainda permanecem inconclusivos, mas hipóteses sugerem que sua ausência resulta numa modulação conformacional disfuncional de heterocromatina impossibilitando o recrutamento de proteínas associadas à via NHEJ para que aconteça o reparo [22].

É importante compreender que o surgimento de tumores depende de danos sequenciais ao DNA que não foram reparados e permanecerão nas gerações celulares subsequentes, porém, quando já há um tumor presente no tecido, a disfunção das vias e proteínas descritas aparenta ser favoráveis à sensibilização aos tratamentos, visto que a indução de dano pela radioterapia e quimioterapia resultará em danos não reparados e, conseqüentemente, em morte celular.

1.3 Proteínas de reparo como alvos moleculares para tratamento

Continuamente, a perspectiva sobre alvos moleculares envolvendo vias de reparo não estão somente relacionadas às proteínas intrínsecas às vias. Os mecanismos de reparo serão somente acionados e terão as devidas proteínas recrutadas quando as vias de DDR estão funcionando de forma eficiente, visto que todo dano causado ao DNA deve ser previamente reconhecido para que posteriormente seja reparado. Classicamente, estuda-se as proteínas ATM/ATR, conhecidas pelo seu papel no DDR. Quando há lesões de quebra dupla no DNA, a ATM reconhece rapidamente os sítios afetados e fosforila diversos alvos protéicos, assim como a ATR, que atuarão em vias subsequentes, como a CHK2, p53 e BRCA1, regulando eventos de apoptose, reparo e parada de ciclo celular [22].

Disfunções no DDR apresentam outras formas de perpetuação de dano e progressão tumoral. Forquilhas de replicação paradas sem posterior reparo devido à ausência de sinalização de dano resulta em stress replicativo e arranjos cromossômicos anormais, o que gerará DSBs [23]. A formação de *R-loops* - pareamento de DNA com RNA e uma fita livre de DNA - pode gerar variações na expressão genética e instabilidade genômica [24]. Este tipo de estrutura gerará não só expressão alterada de genes, mas também pode resultar em quebras no DNA durante a replicação.

Considerando o baixo prognóstico associado às intervenções propostas clinicamente, novos alvos moleculares surgiram com o propósito de intervenção no tratamento de GB. Estudos do nosso grupo de pesquisa propuseram que há uma relação direta entre os níveis de expressão de Nek1, uma cinase com papel importante no DDR, e a resistência ao tratamento com TMZ e com a

agressividade do tumor [25, 26]. No entanto, um fator limitante às terapias de inibição de proteínas de reparo é a toxicidade associada a esses tratamentos e o sítio alvo, neste caso o SNC [27, 28]. Buscando formas de contornar os problemas citados, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um estudo *in vivo* utilizando uma fibra de PVA contendo TMZ que é um inibidor de Nek1, mostrando eficácia na redução do tumor e aumento de sobrevida [28]. Outro trabalho do grupo de pesquisa demonstrou que há maior sensibilidade à intervenção com zeocina e TMZ em linhagens de GB deficientes para Nek1. Este mesmo estudo demonstrou que há uma maior ativação de γ H2AX, Chk2 e p53, porém sem alterações no ciclo celular. A formação de γ H2AX dá-se através da fosforilação da H2AX nos sítios de DSBs, e a maior ativação de Chk2 e p53 são condizentes com a expressão de γ H2AX denotando a parada de ciclo celular em G2/M para o reparo [29].

1.4 Nek1

As vias de DDR não são somente afetadas pela ATM/ATR, a Nek1 é uma proteína de extrema relevância no contexto de sinalização de danos e é associada à progressão no câncer de próstata, redução da sensibilidade à terapia em células de carcinoma renal, redução na sobrevida livre da doença, malignidade e agressividade em câncer de tireóide, além de conferir resistência à TMZ em GB [30, 31, 32, 33, 34]. Dados ainda não publicados do grupo de pesquisa sugerem que o silenciamento genético através de CRISPR em modelos celulares de glioblastoma (U87MG), sensibilizam as células à intervenção com zeocina, uma substância radiomimética.

A Nek1 interage com proteínas envolvidas não só nas vias de reparo de

DNA, mas como de regulação de ciclo celular (Figura 4). Estudos demonstraram que diversas proteínas como a ATRX, MRE11, 53BP1 e outras estruturas envolvidas no início das vias HR, NER, MMR e Fanconi [35, 36]. A importância da Nek1 no ciclo celular e estabilidade cromossomal já foi demonstrada *in vivo* em modelos onde a proteína fora silenciada geneticamente, ao demonstrar a incapacidade de parada do ciclo celular em G1/S e G2/M, além do surgimento de aberrações cromossômicas nas gerações posteriores à radioterapia. Neste contexto, possui também um papel significativo no HR ao fosforilar a Rad54 (Ser572) durante a fase G2, mecanismo necessário para que haja a restauração da forquilha de replicação parada através da sua degradação e posteriormente inicia-se a síntese de DNA junto à fita homóloga durante o reparo. É relevante constatar que a sinalização da Nek1 e ATM/ATR não dependem uma da outra, visto que dados já demonstraram que a expressão da Nek1 não foi alterada em situações onde a ATM/ATR apresentavam-se inativas. Porém, outros dados sugerem que a Nek1 possui um papel, possivelmente não exclusivo, de interagir a fim de estabilizar o complexo ATR-ATRIP para a sinalização de dano ao DNA, estimulando a autofosforilação de ATR.

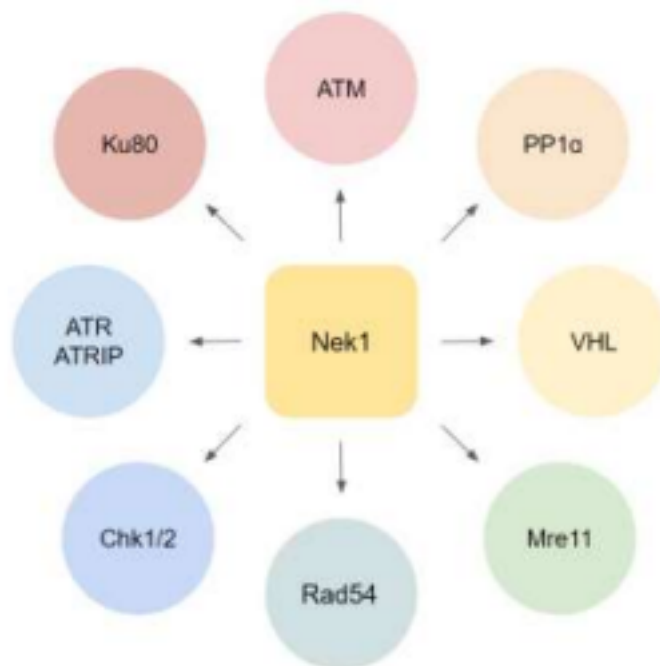


Fig. 4: Nek1 e suas principais interações. A Nek1 possui relação direta com as proteínas ATM, PP1 α , VHL, Mre11, Rad54, Chk1/2, ATR/ATRIP e Ku80. Suas interações consistem em modificações pós-traducionais, regulando ciclo celular, DDR, estabilização da fita de DNA, controle indireto de pontos chave de vias de reparo e estabilização de complexos também associados ao DDR.

No contexto de DDR, a Nek1 está presente na sinalização na maior parte dos danos causados ao DNA: estresse replicativo, DSB, SSB e ICL (Figura 5) [37]. Nek1 promove a estabilização da forquilha de replicação de forma indireta, fosforilando Rad54, responsável por este mecanismo [37]. A interação da Nek1 com a proteína Ku80 promove a aproximação da proteína às extremidades em quebras duplas, sendo um ponto de início para o NHEJ, apesar de já ter sido demonstrado que na ausência de Ku80 o NHEJ não é afetado, presumindo a existência de uma via paralela compensando o mecanismo [38]. Indiretamente, a Nek1 está presente na regulação do ciclo celular através da interação com a Chk1, através da estabilização do complexo ATR/ATRIP, seguido da autofosforilação de ATR e a subsequente interação com a Chk1 [39]. A Nek1 também interage fosforilando tanto o complexo Mre11 como a proteína VHL. A VHL regula, juntamente à Nek1, a proliferação celular, volume de matriz

extracelular e a cília primária de tecidos. A Mre11 por sua vez possui uma atividade nas vias subsequentes de exonuclease, removendo as extremidades lesionadas da via que serão posteriormente direcionadas ao reparo homólogo [40]. Por fim, a Nek1 regula a divisão celular não só através das paradas de ciclo, mas através do eixo ATM>PP1 α que irá desfosforilar a Nek1 e inibir a separação de centríolos [41].

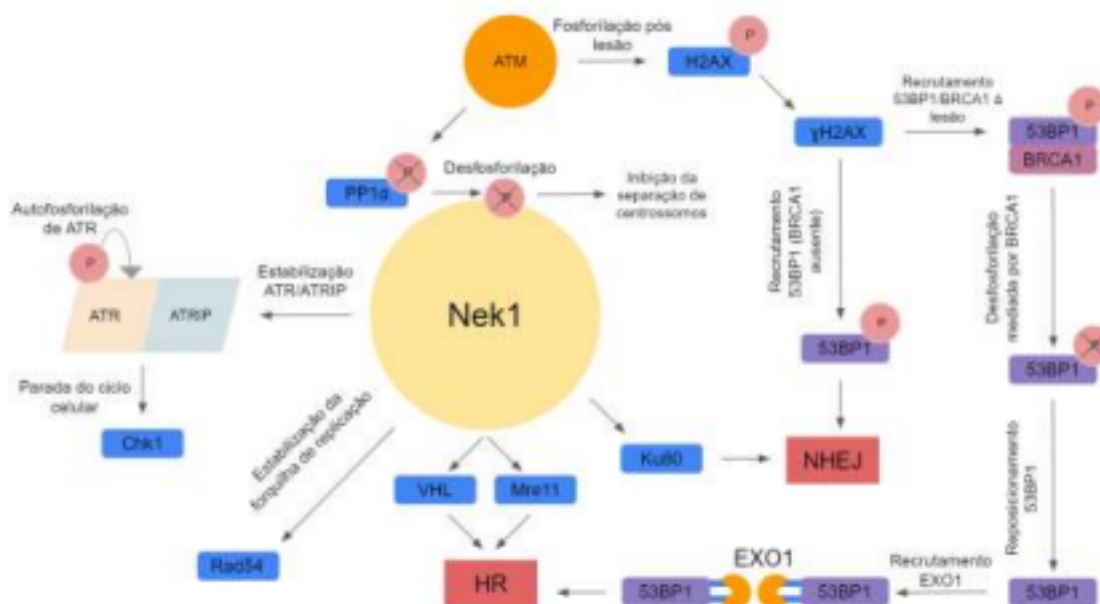


Fig. 5: Mecanismos celulares e a Nek1: A Nek1 possui diversas formas de controlar mecanismos celulares. A parada do ciclo celular é realizada através da estabilização da ATR/ATRIP e consequente autofosforilação seguida da sinalização à Chk1. A estabilização e a inibição da segregação de centríolos são mediadas por modificações pós-traducionais indiretas, como na interação com ATM/PP1 α ou diretas, como na estabilização da forquilha de replicação através da interação com a Rad54. A via de reparo homólogo, descrita outras vezes nesta tese através do mecanismo envolvendo BRCA1/53BP1 pode ser ativada pela sinalização entre a Nek1 e o complexo Mre11 assim como à proteína VHL. Os mecanismos regulados pela Nek1 para a realização do reparo atuam paralelamente ao desencadeamento de sinais nas reações geradas pela ATM, no eixo H2AX> γ H2AX>BRCA1/53BP1. Este eixo possui dois destinos possíveis conforme a expressão de BRCA1, direcionando ao NHEJ ou ao HR. A entrada em NHEJ pode também ser mediada pela Nek1 de forma independente de ATM através da proteína Ku80.

Há uma relação direta entre a perda de função da Nek1 e diversos tumores como cólon, pulmão e pâncreas e sua superexpressão já foi associada à resistência tumoral em gliomas [42]. Esta relação é estudada em diversos

contextos e a sensibilização à quimioterapia foi demonstrada em células de câncer de próstata, ao inibir o eixo TLK>Nek1>VDAC1 quando expostas a determinados antitumorais [43].

1.5 53BP1

A 53BP1 é uma proteína importante no DDR de quebras duplas devido ao seu mecanismo de escolha entre a via NHEJ e a via HR [44]. Inicialmente descrita como uma proteína que interage com a p53, hoje outros mecanismos são conhecidos [45]. No contexto do DDR, a sua capacidade de interagir com histonas elucidou seu papel na iniciação de vias de reparo. Outro alvo relevante da ATM é a H2AX, uma histona classicamente reconhecida como um marcador de quebras duplas relevantes na sinalização ao HR; conseqüentemente, a H2AX fosforilada recruta tanto a proteína BRCA1 ao local de dano como a 53BP1 [21]. As proteínas BRCA1 e 53BP1 possuem um papel sinérgico para o funcionamento do NHEJ. Durante a fase G1, a presença de 53BP1 na extremidade da lesão impede a ressecção; no entanto, nas etapas sequenciais do ciclo (S/G2) a BRCA1 promove a remoção da 53BP1 possibilitando a atividade das nucleases [22]. Logo, em situações de deficiência de BRCA1 o reparo por NHEJ acontece de forma aberrante, impedindo que o HR aconteça. Estudos em torno destas duas estruturas sugerem que há uma relação direta entre BRCA1 e 53BP1 na transição do NHEJ para o HR dependendo da funcionalidade destas duas proteínas (Figura 6) [22, 30].

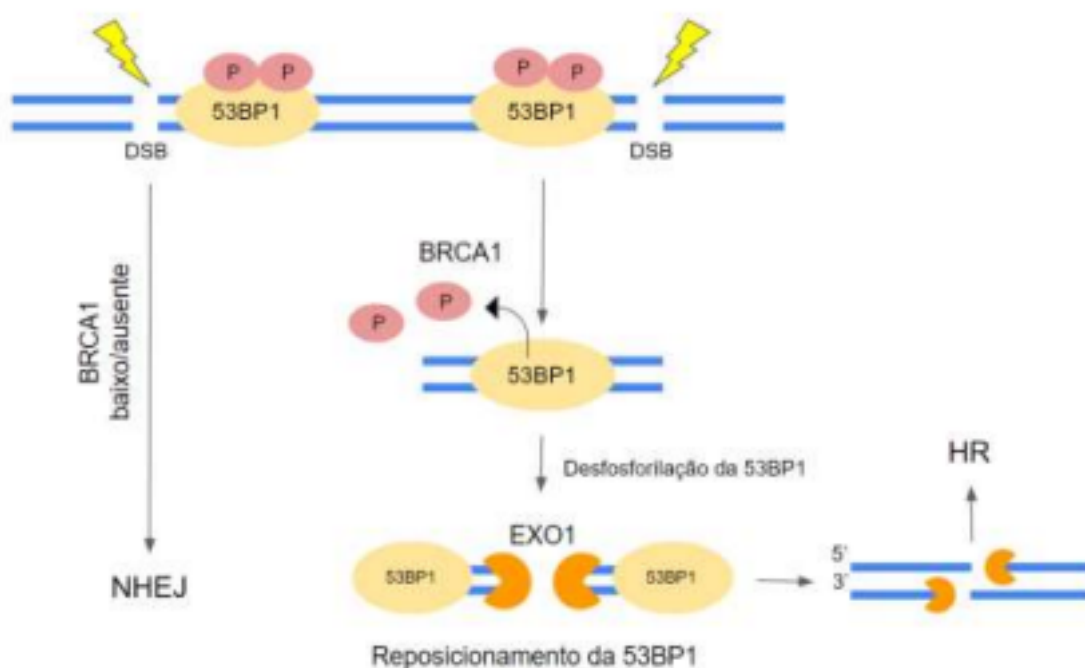


Fig.6: Mecanismo do BRCA1 com 53BP1 para entrada em HR ou NHEJ. Após a quebra dupla acometer a fita de DNA, a 53BP1 localiza-se próxima ao sítio de dano de forma fosforilada; em seguida, a BRCA1 desfosforila a 53BP1, mediada por outras proteínas, deslocando a 53BP1 à posições mais distantes do local de quebra. Por fim, as exonucleases são recrutadas e iniciam o processo de degradação dos limites danificados da fita seguido do HR. Na situação onde a desfosforilação for ineficiente devido à ausência ou baixa expressão de BRCA1, o NHEJ será desencadeado de forma aberrante.

No contexto tumoral, estudos já demonstraram que alterações na 53BP1 e na BRCA1 estão associadas à progressão tumoral e resistência aos tratamentos. Células de câncer de mama deficientes em 53BP1 apresentam-se resistentes ao tratamento com cisplatina e inibidores de PARP - uma polimerase importante no reparo de DNA e alvo terapêutico - demonstrando a importância da 53BP1 no contexto tumoral [46, 47]. Em tumores de mama que apresentam depleção nos receptores de estrogênio e progesterona, fator de crescimento epidermal (triplo negativo) e baixa expressão de 53BP1 demonstraram sobrevida menor e metástases distantes, indicando uma associação entre o prognóstico e a expressão desta estrutura [46].

O papel da 53BP1 no nucleoplasma é consideravelmente bem entendido, porém, ela também está presente no citoplasma e variações na sua expressão podem estar associadas à tumorigênese. Disfunções mitocondriais são associadas com diversos prognósticos, mas no contexto tumoral possui um mecanismo dicotômico. A mitofagia, um processo de degradação mitocondrial mediado pela autofagia pode contribuir com a sobrevivência de um tumor através da adaptação do tecido ao estresse do ambiente tumoral; contudo, pode também resultar em morte celular devido à atividade excessiva de *clearance* mitocondrial [48]. Um estudo recente propôs que a atividade da 53BP1 no citoplasma era independente da p53, assim, utilizou-se uma linhagem com p53 inativa e deficiente em 53BP1, expuseram-na ao CCCP - uma droga comumente utilizada em estudos de indução de mitofagia e demonstraram que a massa, potencial de membrana e a quantidade de mitocôndrias aberrantes foi significativamente maior nas linhagens sem 53BP1 do que a linhagem selvagem [49]. Conclui-se assim que, apesar do papel conhecido da 53BP1 no contexto nuclear, modulando o direcionamento para as vias NHEJ e HR não é o único mecanismo em que ela está presente; simultaneamente, apresenta-se de forma relevante no meio extra-nuclear participando de forma direta ou indireta e independente de p53 em vias dissociadas do reparo de DNA.

Considerando os mecanismos descritos, a 53BP1 aparenta ser um alvo importante a ser avaliado no contexto de GB, visto que a descrição do seu mecanismo em diferentes contextos de tratamento e expressão associadas ao DDR podem modular seu recrutamento, alterando, possivelmente, a eficiência do reparo de DNA. além de sensibilizar às intervenções terapêuticas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
2. Bendahou, M. A., Arrouchi, H., Lakhlili, W., Allam, L., Aanniz, T., Cherradi, N., Ibrahimi, A., & Boutarbouch, M. (2020). Computational Analysis of IDH1, IDH2, and TP53 Mutations in Low-Grade Gliomas Including Oligodendrogliomas and Astrocytomas. *Cancer Informatics*, 19, 117693512091583. <https://doi.org/10.1177/1176935120915833>
3. Miller, K. D., Ostrom, Q. T., Kruchko, C., Patil, N., Tihan, T., Cioffi, G., Fuchs, H. E., Waite, K. A., Jemal, A., Siegel, R. L., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(5), 381–406. <https://doi.org/10.3322/caac.21656>
4. Nørøxe, D. S., Poulsen, H. S., & Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open*, 1(6), e000144. <https://doi.org/10.1136/esmooopen-2016-000144>
5. TAMIMI, A. F., & JUWEID, M. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In *Glioblastoma* (pp. 143–153). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>
6. Gilard, V., Tebani, A., Dabaj, I., Laquerrière, A., Fontanilles, M., Derrey, S., Marret, S., & Bekri, S. (2021). Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. *Journal of Personalized Medicine*, 11(4), 258.

<https://doi.org/10.3390/jpm11040258>

7. Zhang, J., F.G. Stevens, M., & D. Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114. <https://doi.org/10.2174/1874467211205010102>
8. Fuchs, R. P., Isogawa, A., Paulo, J. A., Onizuka, K., Takahashi, T., Amunugama, R., Duxin, J. P., & Fujii, S. (2021). Crosstalk between repair pathways elicits double-strand breaks in alkylated DNA and implications for the action of temozolomide. *ELife*, 10, e63560. <https://doi.org/10.7554/eLife.63560>
9. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>
10. Bernier, J., Hall, E. J., & Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 737–747. <https://doi.org/10.1038/nrc1451>
11. Ohka, F., Natsume, A., & Wakabayashi, T. (2011). Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurology Research International*, 878425. <https://doi.org/10.1155/2012/878425>
12. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
13. Sun, C., Ding, Y., Zhou, L., Shi, D., Sun, L., Webster, T. J., & Shen, Y. (2017). Noninvasive nanoparticle strategies for brain tumor targeting.

Nanomedicine, 13(8), 2605–2621. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.001>

14. Hiddingh, L., Tannous, B. A., Teng, J., Tops, B., Jeuken, J., Hulleman, E., Boots-Sprenger, S. H., Vandertop, W. P., Noske, D. P., Kaspers, G. J., Wesseling, P., & Wurdinger, T. (2014). EFEMP1 induces γ -secretase/Notch-mediated temozolomide resistance in glioblastoma. *Oncotarget*, 5(2), 363–374. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1620>

15. Martins, M. B., Perez, A. M., Bohr, V. A., Wilson, D. M. III, Kobarg, J., & Bonatto, D. (2021). NEK1 deficiency affects mitochondrial functions and the transcriptome of key DNA repair pathways. *Mutagenesis*, 36(3), 223-236. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab008>

16. Pavan, I. C. B., Peres de Oliveira, A., Dias, P. R. F., Basei, F. L., Issayama, L. K., Ferezin, C. d. C., Silva, F. R., Rodrigues de Oliveira, A. L., Alves dos Reis Moura, L., Martins, M. B., Simabuco, F. M., & Kobarg, J. (2021). On Broken Ne(c)ks and Broken DNA: The Role of Human NEKs in the DNA Damage Response. *Cells*, 10(3), 507. <https://doi.org/10.3390/cells10030507>

17. Ganesa, S., Sule, A., Sundaram, R. K., & Bindra, R. S. (2022). Mismatch repair proteins play a role in ATR activation upon temozolomide treatment in MGMT-methylated glioblastoma. *Scientific Reports*, 12(1), 5827. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10739-3>

18. Binabaj, M. M., Bahrami, A., ShahidSales, S., Joodi, M., Joudi Mashhad, M., Hassanian, S. M., Anvari, K., & Avan, A. (2018). The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 378-386. <https://doi.org/10.1002/jcp.25862>

19. Westermark, U. K., Lindberg, N., Roswall, P., Bråsäter, D., Helgadottir, H. R., Hede, S.-M., Zetterberg, A., Jasin, M., Nistér, M., & Uhrbom, L. (2011). RAD51

- can inhibit PDGF-B–induced gliomagenesis and genomic instability. *Neuro-Oncology*, 13(12), 1277–1287. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor121>
20. Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Nunez, F. J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., Krasinkiewicz, J., Doherty, R., Lemons, R., Brosnan-Cashman, J. A., Li, Y., Roh, S., Zhao, L., Appelman, H., Ferguson, D., ... Castro, M. G. (2016). ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Science Translational Medicine*, 8(328). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8228>
21. Marechal, A., & Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
22. Daley, J. M., & Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 34(8), 1380–1388. <https://doi.org/10.1128/MCB.01304-13>
23. Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S. M., Gronroos, E., Chew, S. K., Rowan, A. J., Schenk, A., Sheffer, M., Howell, M., Kschischo, M., Behrens, A., Helleday, T., Bartek, J., ... Swanton, C. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 494(7438), 492–496. <https://doi.org/10.1038/nature11935>
24. Chan, Y. A., Hieter, P., & Stirling, P. C. (2014). Mechanisms of genome instability induced by RNA-processing defects. *Trends in Genetics*, 30(6), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.03.003>
25. Bush, N. A. O., Chang, S. M., & Berger, M. S. (2017). Current and future

strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical Review*, 40(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1007/s10143-016-0769-0>

26. Moura, Dinara Jaqueline; Morás, Ana Moira; Lenz, Guido (2021). Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Biociências, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

<https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/handle/123456789/1863?mode=full>

27. Sasmita, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 14(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/ajco.12716>

28. Moura, Dinara Jaqueline; Reinhardt, Luiza Steffens (2019). Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biociências, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

<https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/handle/123456789/995?mode=full>

29. Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C.-X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J. M., & Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell*, 141(2), 243–254.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>

30. Singh, V., Jaiswal, P. K., Ghosh, I., Koul, H. K., Yu, X., & De Benedetti, A. (2019). Targeting the TLK1/NEK1 DDR axis with Thioridazine suppresses outgrowth of androgen independent prostate tumors. *International Journal of Cancer*, 145(4), 1055-1067. <https://doi.org/10.1002/ijc.32206>

31. Singh, V., Jaiswal, P. K., Ghosh, I., Koul, H. K., Yu, X., & De Benedetti, A. (2019). The TLK1-Nek1 axis promotes prostate cancer progression. *Cancer*

Letters, 453, 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.048>

32. Singh, V., Khalil, M. I., & De Benedetti, A. (2020). The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle*, 19(3), 363-375. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1703563>

33. Zhu, J., Cai, Y., Liu, P., & Zhao, W. (2016). Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(4), 522-527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.139>

34. Melo-Hanchuk, T. D., Martins, M. B., Cunha, L. L., Soares, F. A., Ward, L. S., Vassallo, J., & Kobarg, J. (2020). Expression of the NEK family in normal and cancer tissue: An immunohistochemical study. *BMC Cancer*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6496-x>

35. Melo-Hanchuk, T. D., Slepicka, P. F., Meirelles, G. V., Basei, F. L., Lovato, D. V., Granato, D. C., Pauletti, B. A., Domingues, R. R., Leme, A. F. P., Pelegrini, A. L., Lenz, G., Knapp, S., Elkins, J. M., & Kobarg, J. (2017). NEK1 kinase domain structure and its dynamic protein interactome after exposure to Cisplatin. *Scientific Reports*, 7(1), 5445. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05607-3>

36. Pavan, I. C. B., Peres de Oliveira, A., Dias, P. R. F., Basei, F. L., Issayama, L. K., Ferezin, C. de C., Silva, F. R., Rodrigues de Oliveira, A. L., Alves dos Reis Moura, L., Martins, M. B., Simabuco, F. M., & Kobarg, J. (2021). On Broken Ne(c)ks and Broken DNA: The Role of Human NEKs in the DNA Damage Response. *Cells*, 10(3), 507. <https://doi.org/10.3390/cells10030507>

37. Gallego, M. E., Bleuyard, J.-Y., Daoudal-Cotterell, S., Jallut, N., & White, C. I. (2003). Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 35(5), 557–565.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01829.x>

38. Liu, S., Ho, C. K., Ouyang, J., & Zou, L. (2013). Nek1 kinase associates with ATR–ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2175–2180.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1213797110>

39. Reginato, G., & Cejka, P. (2020). The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA. *DNA Repair*, 91–92, 102869.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102869>

40. Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R., & Bayliss, R. (2012). Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 19), 4423–4433. <https://doi.org/10.1242/jcs.111195>

41. Zhu, J., Cai, Y., Liu, P., & Zhao, W. (2016). Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(4), 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.089>

42. Singh, V., Bhoir, S., Chikhale, R. v., Hussain, J., Dwyer, D., Bryce, R. A., Kirubakaran, S., & de Benedetti, A. (2020). Generation of Phenothiazine with Potent Anti-TLK1 Activity for Prostate Cancer Therapy. *iScience*, 23(9), 101474.

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101474>

43. Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mohammadzadeh, A., Yousefi, B., Mihanfar, A., Karimian, A., & Majidinia, M. (2019). 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. *DNA Repair*, 73, 110–119.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.12.006>

44. Iwabuchi, K., Bartel, P. L., Li, B., Marraccino, R., & Fields, S. (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 6098–6102.

<https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.6098>

45. Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J. M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., Haffty, B. G., Tommiska, J., Blomqvist, C., Drapkin, R., Adams, D. J., Nevanlinna, H., Bartek, J., Tarsounas, M., Ganesan, S., & Jonkers, J. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 688–695.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.1831>

46. Cao, L., Xu, X., Bunting, S. F., Liu, J., Wang, R.-H., Cao, L. L., Wu, J. J., Peng, T.-N., Chen, J., Nussenzweig, A., Deng, C.-X., & Finkel, T. (2009). A Selective Requirement for 53BP1 in the Biological Response to Genomic Instability Induced by Brca1 Deficiency. *Molecular Cell*, 35(4), 534–541.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.034>

47. Denisenko, T. v., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2021). Mitophagy in carcinogenesis and cancer treatment. *Discover Oncology*, 12(1), 58.

<https://doi.org/10.1038/s41571-020-00421-3>

48. Youn, C. K., Kim, H. B., Wu, T. T., Park, S., Cho, S. il, & Lee, J.-H. (2017). 53BP1 contributes to regulation of autophagic clearance of mitochondria.

Scientific Reports, 7(1), 45290. <https://doi.org/10.1038/srep45290>

3. OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar a influência da deleção da proteína Nek1 em linhagens de GBs frente a tratamento com TMZ e o radiomimético zeocina na resposta a quebras duplas por meio da avaliação da proteína 53BP1 em tratamentos agudos, assim como, avaliar a resposta mutagênica em tratamentos crônicos.

ESPECÍFICOS:

- a) Construir linhagens de GB expressando a proteína 53BP1 truncada marcada com fluoróforo.
- b) Avaliar a expressão da proteína 53BP1 em linhagens com e sem a proteína Nek1, após tratamento com TMZ e zeocina, em 1, 4 e 24 horas, por microscopia de fluorescência.
- c) Avaliar o perfil de mutagenicidade após tratamento crônico com TMZ e zeocina em linhagens com e sem expressão da proteína Nek1.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

**Absence of Nek1 protein contributes to genomic instability in
glioblastoma cells**

Marco Raabe Argenti¹, Victoria Rapack Jacinto Silva¹, Ana Carolina Silva
Pinheiro¹, Ana Moira Morás¹, Dinara Jaqueline Moura^{1*}

¹Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Life Sciences of Porto
Alegre (UFSCPA)

Corresponding author. Address: Rua Sarmento Leite, 245/Lab. 714,
90050-170. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3303 8861;
E-mail address: dinaram@ufcspa.edu.br (D. J. Moura)

Os dados aqui apresentados são parte de um artigo intitulado **The effect
of Nek1 knockout on Zeocin and TMZ treatment in U87 cells**

Abstract

Introduction: Gliomas are glial cell neoplasms which comprise the majority of primary CNS tumors, with glioblastoma multiforme (GB) being the most common malignant type, representing 48% of CNS malignant tumors. GB are aggressive and have a poor prognosis, even with the triad of treatment: surgical resection, radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ), with a low average survival. In this sense, The search for new molecular targets and therapeutic strategies is essential. The Nek1 protein is key in the response to DNA damage, as it interacts with proteins involved in repair, apoptosis and cell cycle regulation pathway. More recently, Nek1 has been shown to be overexpressed in different glioma cell lines and, interestingly, the level of expression is directly related to the degree of tumor severity, proliferation rate and resistance to TMZ. **Aim of study:** To analyze genotoxicity using the micronucleus test in strains with the Nek1 Knockout protein (Nek1-KO) during a simulated clinical protocol, after treatment with TMZ and the radiomimetic zeocin, as well as to evaluate the relationship between the absence of the Nek1 protein and the recruitment of 53BP1 protein, using a strain with the truncated 53BP1 protein. **Methodology:** Cells (Nek1-WT and Nek1-KO) were treated with TMZ and zeocin for 7 days, after treatment they were washed and incubated with cytochalasin B for 36h, fixed and stained to evaluate the formation of micronuclei. Recruitment of 53BP1 protein was also evaluated in Nek1-WT and Nek1-KO strains by fluorescence microscopy; after treatments, images were acquired for 24h in the InCell Analyzer 2200 and the fluorescence intensity of 53BP1 was measured. **Results and Conclusion:** The results indicate an increase in genotoxicity in the Nek1-KO cell line, indicating an involvement of this protein in the maintenance

of genomic stability. Additionally, it was possible to observe a decrease in the resolution of double breaks, due to the more persistent labeling of the 53BP1 protein in the strain without the Nek1 protein (U87-KO), suggesting a relationship of the Nek1 protein in the recruitment of other proteins involved in the repair of double breaks.

Key-words: Nek1, glioblastoma cells, micronucleus, 53BP1

1. Introduction

The multiforme glioblastoma (GB) is the most common CNS primary tumor, which has a poor prognosis, being extremely aggressive, with an incidence of 57% of all gliomas and 48% among the malignant CNS tumors [1, 2]. This tumor has astrocytic origin and due to its characteristics is considered a grade IV tumor, according to the World Health Organization (WHO). GBs are treated with surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Despite recent developments in these therapies, the GB currently has an average survival of 14.6 months from diagnosis [3].

Temozolomide is the standard chemotherapy and most efficient for GB treatment [2]. It is an alkylating agent, which acts by DNA methylation of purines, inducing cell death by disrupting the DNA. Some adverse effects, such as thrombocytopenia, lymphopenia, neutropenia and the difficulty of reaching the CNS due to the blood brain barrier (BBB) hamper the treatment on GB. Furthermore, tumor resistance to TMZ is one of the barriers faced on chemotherapy intervention and is an area of study that tries to understand the cellular mechanisms behind acquired and natural resistance [5].

Tumors, such as GBs, can become resistant to chemotherapy and the mechanisms underlying this are usually linked to alterations that modify chemotherapeutic response through the cellular mechanisms, which includes DNA damage response (DDR), apoptosis, cell cycle regulation and mitochondrial activity. There is a specific protein called Nek1 (NIMA-Related Protein Kinase I), directly associated to DDR through the interactions with proteins involved in modulating the pathways of DNA damage verification and

cell cycle [6, 7]. Nek 1 is involved in the response of different damage inducing agents, including ionizing radiation (IR), alkylating agents, ultraviolet radiation and hydrogen peroxide [8, 9].

In the tumoral context, Nek1 is associated with cancer progression in prostate tissue, lowering sensibility to DNA damage therapy in renal carcinoma cells, disease free survival reduction in cervical cancer, malignancy and aggressiveness in thyroid cancers and TMZ resistance in GB cells [10, 11, 12, 13, 14]. In glioma cells, Nek1 may be an important target, once its role in GB malignancy is related to cell growth promotion and chemoresistance [14].

Recently, we reported an electrospun polyvinyl alcohol (PVA) microfiber (MF) brain-implant prepared for the controlled release of Nek1 protein inhibitor (iNek1) and TMZ or TMZ-loaded nanoparticles to GB treatment. Our results support previous findings [15] and strongly suggest that Nek1 is an important target in GB cells and its inhibition significantly decreases cell viability when combined with TMZ. In addition, the formulations revealed a high drug loading, which prolonged the drug's release improving the antitumor effects of iNek1 and TMZ in the treatment of GB in rats.

Furthermore, previous data from our research group about the participation of Nek1 in response to DNA damage induced by zeocin in GB cells indicated a differentiated cellular response according to the exposure time. Nek1 knockout increases sensitivity to DNA damage induced by zeocin plus TMZ and DNA damage signalization in acute response activating γ H2AX, Chk2, and p53. However, in chronic exposure Nek1 knockout reduces DNA damage signalization impairing cell cycle arrest. The impact of Nek1 reducing cellular

viability in chronic exposure to low levels of zeocin indicates that the protein Nek1 represents a valuable target for radiation sensitization [16].

Although Nek1 appears to be an interesting target in response to radiomimetic agents, its role needs to be better explored. In this sense, this work aims to evaluate the influence of the deletion of the Nek1 protein in GB cell lines when treated with TMZ and the radiomimetic zeocin in the response to double breaks by 53bp1 protein fluorescence measurement and the micronucleus induction.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-glutamine, antibiotics (penicillin/streptomycin) and Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Temozolomide (TMZ), puromycin and Hoechst 33342 were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Zeocin was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY). The Plasmid apple-53bp1 trunc, expressing 53BP1, was acquired from Adgene (Watertown, MA, USA). The Lenti-X 293T cells and Xfect were purchased by Clontech (Mountain View, CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2 Cell line

Human GB cell U87 MG was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) bank and cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 units.mL⁻¹ penicillin and 100 µg.mL⁻¹ streptomycin. The cell culture was regularly tested to ensure absence of mycoplasma. Cell identification was checked by karyotype (data not shown).

2.3 Nek1 Knockout cell

From this cell was originated a second cell line, with a knockout for the protein Nek1 by CRISPR (U87-KO). Briefly, plasmid PX459 V2.0, expressing CAS9 protein and RNA guide molecules for Nek1 protein were transfected in the U87 cell line. The cells were transduced with a pool (1:1:1:1:1) of five sequences of RNA guide and selected by puromycin. The knockout efficiency was checked by immunoblotting and PCR [17].

2.4 Micronucleus Assay

The micronucleus (MN) assay was performed with modifications to cell lines [18, 19]. U87-WT and U87-KO cells were incubated for five days with TMZ, Zeocine or combined treatment with zeocine plus TMZ. After treatment, the cultures were washed twice with the medium and the Cyt-B was added at final concentration of 2 µg.mL⁻¹. Cultures were harvested 36 h after Cyt-B addition. The cells were separated from the bottle by trypsinization and the cellular suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. Then, cells were resuspended in a KCl 0.075M solution maintained at 4 °C for 3 min (mild

hypotonic treatment). Subsequently, the cells were centrifuged and a methanol/acetic acid (3:1) solution was gently added. This fixation step was repeated twice and finally, cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid and dropped onto clean slides. The slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3–4 min. Slides were mounted and codified prior to the microscopic analysis. Micronucleated cells were counted in 2000 binucleated cells with well preserved cytoplasm.

2.5 53BP1 trunked protein construction

The cellular model expressing the 53BP1 fluorescent protein was made by lentiviral transduction [20]. Briefly, lentiviral particles were produced by 53BP1trunc-Apple plasmid expression in Lenti-X 293T cells (Clontech), according to the manufacturer's protocol. In a polystyrene plate, 2×10^6 Lenti-X 293T cells were cultivated to be exposed, in the next day, to reporter transfection with Xfect (Clontech). After 6 hours, culture medium was removed and substituted by a new one, free from transfection complexes. After 48 hours, the medium was collected and filtered. Viral particles were concentrated with Lenti-X concentrator (clontech). Around 50.000 U87-WT and U87-KO glioblastome cells were seeded per well, in a 12 well plate and transduced with lentiviral particles (53BP1trunc Apple), in the next day, in a medium containing $4-10 \text{ mg.mL}^{-1}$ of polybrene. Medium was changed after 24 hours and cells submitted to a new medium containing 3 mg.mL^{-1} of puromycin. Protein expression was confirmed by fluorescence microscopy.

2.6 53BP1 live cells imaging

U87-WT and U87-KO with 53BP1-trucApple cells were seeded ($1,6 \times 10^4$ per well) in 96 well plates. Cultures were maintained in ideal conditions until they reached confluence. After reaching confluence, they were washed with PBS and treated for 5 minutes with Hoechst 33342 nuclear dye (5 mg.mL^{-1}), washed with PBS and treated for 24 hours in these conditions: Negative control containing only DMEM and FBS (CN); TMZ $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, Zeo $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and TMZ $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ plus Zeo $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Images were acquired in the In Cell Analyzed 2200 (GE Healthcare Life Sciences), equipped with a 40x lens and a humidified chamber for 24 hours. Image captures were made hourly for a 24 hour period during the treatment. Data quantification was made through image combining in Fiji app [21] through overlapping of individual acquisition channels for nuclear dye and 53BP1 fluorescence. Quantification was made manually through foci counting.

2.7 Statistical analyses

All experiments were independently performed three times and the results were expressed as mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA with multiple comparison. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

The Nek1 protein became of interest to our research group from data that showed the different expression profiles of this structure in GB [22]. This study has revealed that the overexpression of the Nek1 protein is directly linked to the degree of tumor severity, proliferation rate, and resistance to TMZ treatment in various glioma cell lines [22]. The results are intriguing, as they suggest that the

level of Nek1 expression can serve as a potential indicator of glioma cell behavior and response to treatment.

Recently, we investigated the role of Nek1 in DNA damage response after exposure to Zeocin. Our results show that within 5 days, Zeocin treatment increased sensitivity in the U87-KO cell line at all doses evaluated and, when administered together with TMZ, there was a subtle increase in sensitivity also in the U87-WT together with TMZ [16]. In addition, we showed a reduced H2AX activation in response to zeocin treatment [16], which may indicate a failure in the damage signaling processes as previously demonstrated in treatment with camptothecin [23]. The impaired in DNA damage signalization could induce genetic instability and increase mutagenic lesions [23, 24]. To investigate the possibility of chromosomal instability, in the present work, we evaluated the micronucleus formation after 5 days of treatment. The results shown in Figure 1 show that treatments with zeocin and zeocin combined with TMZ induce an increase in micronucleus formation, however, genomic instability in the U87-KO cell line is increased, differing significantly from the U87-WT cell line.

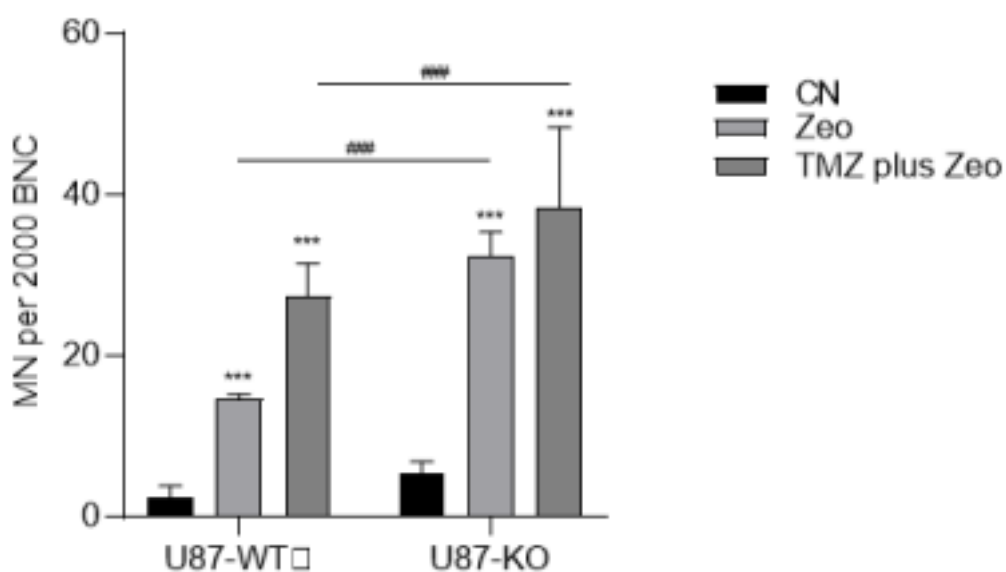


Figure 1. Micronucleated cell (MN) frequency in the Micronucleus test.

U87- WT and U87-KO cells were exposed for 5 days and the MN frequency is expressed per 2000 binucleated cells (BNC). Bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments. ** $p < 0.001$ treated vs. control and ### $p < 0.001$ comparison between cell lines (two-way ANOVA with multiple comparisons).

As mentioned before, it is known that Nek1 co-localizes with key proteins involved in the initial response to DSBs including γ -H2AX [10]. Our recent results showed that zeocin treatment induced a clear increase in γ -H2AX activation after acute exposure and Nek1 deficient cells had an increased activation only at the highest dose of zeocin plus TMZ in relation to WT. However, Nek1 dependence was subtle in chronic treatments with lower concentrations of zeocin [16]. The impaired DNA damage signalization could induce genetic instability and increase mutagenic lesions. Our results show the increase of micronucleus formation corroborates this possibility, confirming an increase in genomic instability that may explain the increased sensitivity in the absence of Nek1 protein.

The two mechanisms usually involved in double strand breaks (DSB) are the non-homologous end joining (NHEJ) and homologous repair (HR). DNA repair is required in every case that the cell cycle is stopped, through DDR, so DNA breaks are repaired. In this context, Nek1 plays the role of interacting with proteins associated with DDR, such as RAD54 (Ser572), ATM/ATR and MRE11, giving HR a headstart and promoting replication fork stability [25, 26]. MRE11 is directly associated with replicative capacity of a tumor, being an aggressiveness hallmark, data obtained from breast cancer tissue and confirmed in *in vitro* cell lines of the same type [27]. 53BP1, in turn, blocks the resection in the extremity

of DNA strands for NHEJ to happen. So, 53BP1 plays critical roles in DNA DSB repair by promoting non-homologous end joining (NHEJ), and loss of 53BP1 abolishes PARPi sensitivity in BRCA1-deficient cells by restoring homologous recombination (HR). 53BP1, similar to many other DDR and repair proteins, must accumulate at sites of DNA DSBs.

Seeking to understand the increase in genomic instability, we constructed a strain with the labeled 53BP1 protein to verify the kinetics of damage formation and absence and presence of Nek1. Since Nek1 is involved early in a DNA damage sensing/repair pathway, we evaluated the kinetics of DSB during 24 h of treatment. Our results indicated an 53BP1 fluorescence increase in all treatments after 1 h in both cell lines, however, while in the U87-WT cell line there was a decrease in marking over the 24 hours, in the U87-KO this decrease was smaller, with a significant difference between cells treated with zeocin, TMZ and co treatment and untreated cells, suggesting a delay in DSB resolution or a direction for the repair pathway by NHEJ (Figure 2).

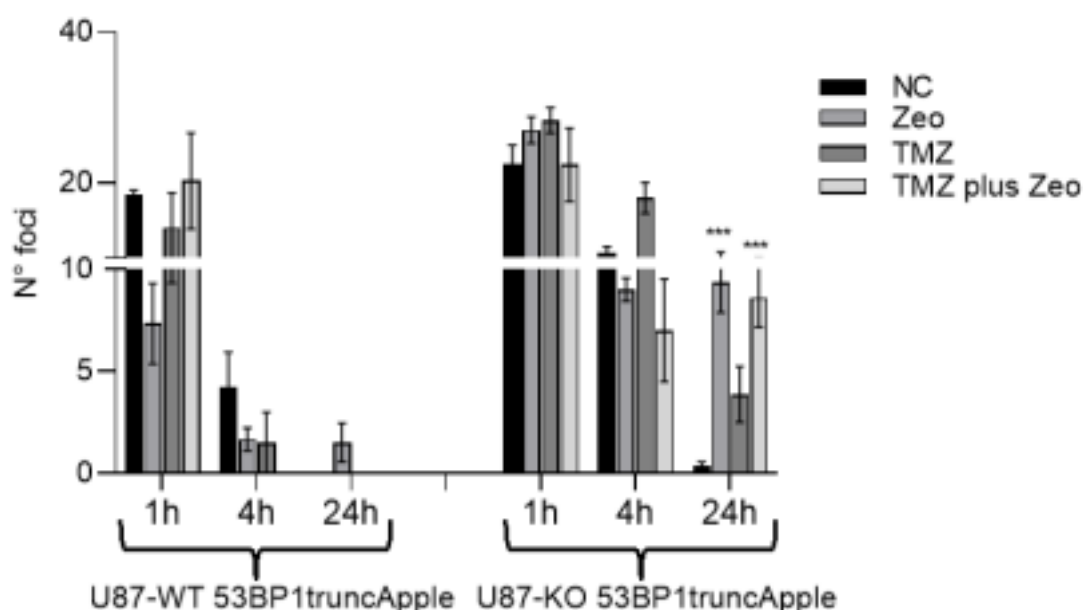


Figure 2. 53BP1 protein recruitment over 24 hours of treatment with zeo, TMZ or co-treatment. The data are presented as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$

(compared to NC) and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ (comparison between cell lines) (two-way ANOVA with multiple comparisons).

We also express these results by dispersion comparing lines under each of the treatment conditions. Our results demonstrated that the absence of Nek1, appears to delay repair of DSB by maintaining 53BP1 protein signaling for 24 hours (Figure 3).

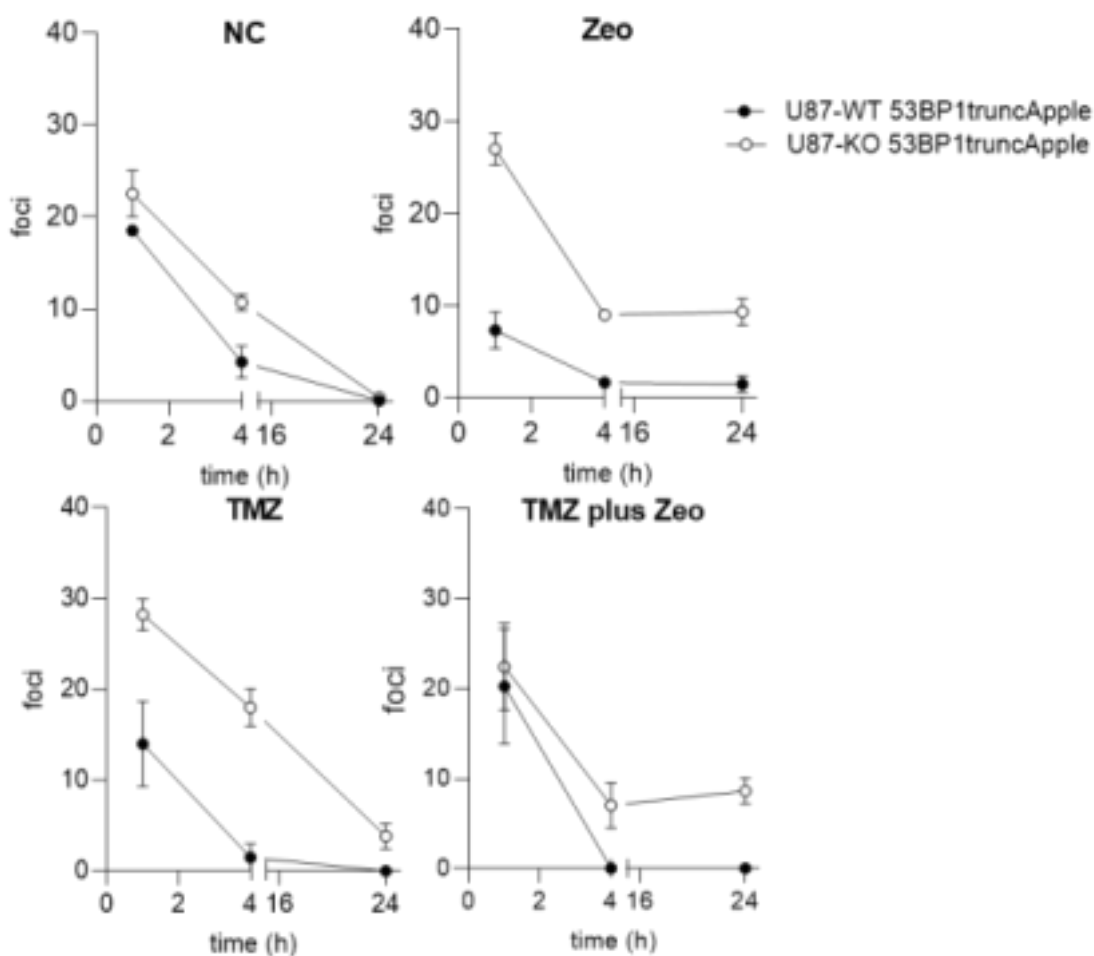


Figure 3. 53BP1 protein recruitment over 24 hours of treatment with zeo, TMZ or co-treatment. The data are presented as the mean \pm SEM.

The data collected from the 53BP1 recruitment assay show us a clear distinction between the knockout and wild type cell lines in a time dependent manner. On the first hour of all treatments there is a high amount of 53BP1

colocalized with nuclei staining that logically drops over time in the U87-WT cell line. This is expected, since both repair pathways, HR and NHEJ are happening - even though we can't differ which one is more active at this point - and 53BP1 starts to become less expressive. When the treatment ends - 24 hours - there is nearly no *foci*, indicating that repair must have happened and the cell cycle goes on. However, when we compare this result to the knockout cell line, on both 4h and 24h time frames we can observe slighter reduction on *foci* counting. When comparing the negative control, which has no treatment, with the treatment groups, we can observe that 53BP1 remains on the site - colocalizing with the nucleus - and showing us a delay in repair.

It is relevant to consider that the Zeocin and Zeocin + TMZ group are similar, while the TMZ itself shows almost no foci in the 24h endpoint. This may be due to the capacity of causing damage in a smaller treatment window. We know that TMZ causes DNA damage through the methylation of purines in the DNA, and that takes more time. The data acquired from the micronucleus assay during the five day treatment show us that TMZ itself causes more chromosomal aberrations when compared to Zeocine alone, since it may cause less cell death in the very first cycles. TMZ toxicity can take a few cell cycles to start causing apoptosis, and every cell generation will end up carrying the chromosome aberrations from the prior generation. This way, it is understandable how in a 24h time frame Zeocine and Zeocine plus TMZ are similar in terms of 53BP1 recruitment, showing us that TMZ may not be delaying the DNA repair in the first 24 hours of treatment when compared to the control and other treatment groups. It is plausible that Zeocin is causing more damage and, thus, more 53BP1 recruitment, since it causes DSBs directly to the DNA and indirectly through

oxidative stress, causing clustered damages.

It is known that 53BP1 can be recruited by ATM through the ATM>H2AX> γ H2AX pathway, but other mechanisms needed to DNA repair may be affected by the absence of Nek1. These results show us that not only repair is being delayed, but it is being affected by a mechanism not directly related to 53BP1, but most likely to cell cycle regulation. That includes not only CHKs but pathways prior to that, such as the ATR/ATRIP complex and possibly Rad54, both interacting with Nek1 to work through the DDR. In conclusion, we observed that the chromosomal aberrations are higher in the TMZ plus zeocine in both cell lines, but significantly more in the knockout line, but in a smaller time frame, when observing 53BP1 expression, we see that TMZ is not delaying the repair as much as Zeocin. Our studies corroborate to show that the Nek1 protein can be an important molecular target for the treatment of GB, however more studies are needed to confirm this possibility.

Acknowledgements

Research was supported by grants from the Brazilian Agencies 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' and 'Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul' (FAPERGS).

References

1. Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, *16*(7), 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
2. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
3. Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *70*(4), 299-312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>
4. Ohka, F., Natsume, A., & Wakabayashi, T. (2012). Current Trends in Targeted Therapies for Glioblastoma Multiforme. *Neurology Research International*, *2012*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/878425>
5. Sun, C., Ding, Y., Zhou, L., Shi, D., Sun, L., Webster, T. J., & Shen, Y. (2017). Noninvasive nanoparticle strategies for brain tumor targeting. *Nanomedicine*, *13*(8), 2605-2621. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.001>
6. Hiddingh, L., Tannous, B. A., Teng, J., Tops, B., Jeuken, J., Hulleman, E., Boots Sprenger, S. H., Vandertop, W. P., Noske, D. P., Kaspers, G. J., Wesseling, P., & Wurdinger, T. (2014). EFEMP1 induces γ -secretase/Notch-mediated

temozolomide resistance in glioblastoma. *Oncotarget*, 5(2), 363-374.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.1620>

7. Martins, M. B., Perez, A. M., Bohr, V. A., Wilson III, D. M., Kobarg, J. (2021).

NEK1 deficiency affects mitochondrial functions and the transcriptome of key

DNA repair pathways. *Mutagenesis*, 36(3), 223-236.

<https://doi.org/10.1093/mutage/geab002>.

8. Pavan, I. C. B., Peres de Oliveira, A., Dias, P. R. F., Basei, F. L., Issayama, L.

K., Ferezin, C. d. C., Silva, F. R., Rodrigues de Oliveira, A. L., Alves dos Reis

Moura, L., Martins, M. B., Simabuco, F. M., & Kobarg, J. (2021). On Broken

Ne(c)ks and Broken DNA: The Role of Human NEKs in the DNA Damage

Response. *Cells*, 10, 507. <https://doi.org/10.3390/cells10030507>.

9. Polci, R., Peng, A., Chen, P.-L., Riley, D. J., & Chen, Y. (2004). NIMA-Related

Protein Kinase 1 Is Involved Early in the Ionizing Radiation-Induced DNA

Damage Response. *Cancer Research*, 64, 8800–8803.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2358>.

10. Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., & Halazonetis, T. D. (2000). p53

binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA

double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*, 151(7), 1381-1390.

<https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1381>.

11. Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A.,

Targeting the TLK1/NEK1 DDR axis with Thioridazine suppresses outgrowth of

androgen independent prostate tumors. *Int J Cancer* 2019, 145 (4), 1055-1067.

<https://doi.org/10.1002/ijc.32109>.

12. Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A., The

TLK1-Nek1 axis promotes prostate cancer progression. *Cancer Lett* 2019, 453,

131-141. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.023>

13. Singh, V.; Khalil, M. I.; De Benedetti, A., The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1.

Cell Cycle 2020, 19 (3), 363-375.

<https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1725368>

14. Zhu, J.; Cai, Y.; Liu, P.; Zhao, W., Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. Biochem Biophys Res Commun 2016, 476 (4), 522-527.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.059>

15. Morás, Ana Moira; Lenz, Guido; Moura, Dinara Jaqueline; (2021). Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Biociências, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

<https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/handle/123456789/1863?mode=full>

17. Matsuoka, A., Yamazaki, N., Suzuki, T., Hayashi, M., & Sofuni, T. (1992). Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 272(3), 223–236.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90014-G](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90014-G)

18. Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Bohm, K. J., Prots, I., Unger, E., Thier, R., Bolt, H. M., & Degen, G. H. (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. Archives of Toxicology, 78(10), 575–583.

<https://doi.org/10.1007/s00204-004-0554-2>

19. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1–2), 81–95.

[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

20. Menegotto, P. R., da Costa Lopez, P. L., Souza, B. K., de Farias, C. B.,

- Filippi-Chiela, E. C., Vieira, I. A., Schwartzmann, G., Lenz, G., & Roesler, R. (2017). Gastrin-Releasing Peptide Receptor Knockdown Induces Senescence in Glioblastoma Cells. *Molecular Neurobiology*, 54(2), 888–894. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9552-4>
21. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
22. Zhu, J.; Cai, Y.; Liu, P.; Zhao, W. (2016). Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 476(4), 522-527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.058>
23. Pelegrini, A. L., Moura, D. J., Brenner, B. L., Ledur, P. F., Maques, G. P., Henriques, J. A. P., Saffi, J., & Lenz, G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, 25(5), 447–454. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq029>
24. Role of MRE11 in Cell Proliferation, Tumor Invasion, and DNA Repair in Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 104(19), 1485–1502. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs371>
25. Surpili, M. J., Delben, T. M., & Kobarg, J. (2003). Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry*, 42, 15369–15376. <https://doi.org/10.1021/bi034575v>
26. Spies, J., Waizenegger, A., Barton, O., Sürder, M., Wright, W. D., Heyer, W. D., & Löbrich, M. (2016). Nek1 regulates Rad54 to orchestrate homologous recombination and replication fork stability. *Molecular Cell*, 62, 903–917. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.032>.

27. Yuan, S. S., Hou, M. F., Hsieh, Y. C., Huang, C. Y., Lee, Y. C., Chen, Y. J., & Lo, S. (2012). Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 104. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs371>.

5. CONCLUSÕES

Nos dados produzidos por esta dissertação, os tratamentos com zeocina e TMZ sozinhas e associadas demonstraram maior genotoxicidade nas células U87-Nek1-KO, podendo inferir a maior sensibilidade através do ensaio de micronúcleos. O objetivo deste trabalho foi atingido ao trabalharmos com as células com marcação fluorescente para 53BP1 de forma eficiente e avaliarmos o perfil de aberrações cromossômicas, expressão de 53BP1 e associá-los de forma lógica.

Os dados de fluorescência demonstraram que em ambas linhagens há expressiva presença de 53BP1 na primeira hora de tratamento em todos os grupos. Porém, no segundo momento avaliado (4h), a presença de 53BP1 é maior no grupo knockout quando comparado ao grupo selvagem, e esta lógica se mantém na última avaliação, menos no tratamento com TMZ isolada (24h). Estes dados sugerem que há um atraso no reparo de DNA causado pela ausência da Nek1.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “NIMA-related Kinase 1 e seu papel na resistência tumoral”, aprovado pela Comissão de Pesquisa (ComPesq) da UFCSPA (Parecer N° 026/2017). Deste projeto maior foi desenvolvida uma tese e a dissertação aqui apresentada.

A busca pela eficiência no tratamento do câncer tem levado a um aprimoramento do conhecimento dos mecanismos celulares associados à resistência tumoral aos fármacos e à radioterapia. Embora os resultados obtidos mostram a eficiência da sensibilização após o silenciamento da Nek1, é importante realizar avaliações posteriores em relação ao ciclo celular e à ativação de vias de reparo específicas para entender a genotoxicidade encontrada no estudo e se há reparo acontecendo durante o período de tratamento de 5 dias, e como a genotoxicidade permanece alta. Para aprimorar ainda mais as conclusões previamente descritas, é necessário ampliar o tempo de tratamento e analisar proteínas chave do ciclo celular. É possível que a atividade da Nek1 sobre as Chks e mecanismos de estabilização durante o reparo esteja sendo compensada por outra estrutura, o que deve ser investigado para melhor compreender a resistência tumoral aos tratamentos.

Como descrito na dissertação, estudos já utilizam inibidores de proteínas específicas associadas aos tratamentos clássicos. Neste sentido, a investigação mais profunda acerca dos mecanismos celulares envolvidos no reparo de DNA podem não só abrir porta para novos estudos, mas propor, futuramente, novas associações de alvos terapêuticos. Apesar das limitações

devido à toxicidade conhecida de inibidores de proteínas, estudos do nosso grupo de pesquisa já propuseram intervenções no local do tumor, podendo associar os tratamentos com o direcionamento do tratamento no sítio específico.

A aquisição de mais dados de vias associadas à Nek1 poderiam corroborar a discussão deste estudo. Atento à necessidade de compreender como que o ciclo celular está sendo regulado durante os tratamentos propostos, podendo inferir novas conclusões ou corroborar os dados obtidos na avaliação de imunofluorescência deste estudo. É de interesse do grupo elaborar novos estudos em torno dos mecanismos paralelos ao reparo de DNA onde a Nek1 está atuando, possibilitando-nos compreender a lógica por trás da sensibilização de GB aos tratamentos na ausência de Nek1.

7. ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA



Atestado

Atestamos que o projeto de pesquisa intitulado "*NIMA-related Kinases 1 e seu papel na resistência tumoral*" está registrado na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre com o número 026/2017, sob responsabilidade de Dinara Jaqueline Moura.

Salientamos que este registro **não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa.**

Salientamos ainda que este registro **não garante a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.**

Porto Alegre, 05 de maio de 2020.

Henrique Silveira
Secretário da Comissão de Pesquisa
UFCSPA