

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 27/12/2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Isabella Ottenio de Lourenço

**Estudo estrutural do domínio SH3-*like* ligado em *tandem* da
proteína KIN humana e sua interação com ácido nucleico utilizando
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e
caracterização físico-química por técnicas espectroscópicas**

São José do Rio Preto
2023

Isabella Ottenio de Lourenço

**Estudo estrutural do domínio SH3-*like* ligado em *tandem* da
proteína KIN humana e sua interação com ácido nucleico utilizando
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e
caracterização físico-química por técnicas espectroscópicas**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 141886/2019-6

Orientador: Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2023

L892e	<p>Lourenço, Isabella Ottenio de</p> <p>Estudo estrutural do domínio SH3-like ligado em tandem da proteína KIN humana e sua interação com ácido nucleico utilizando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e caracterização físico-química por técnicas espectroscópicas / Isabella Ottenio de Lourenço. -- São José do Rio Preto, 2023</p> <p>106 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Icaro Putinhon Caruso</p> <p>Coorientadora: Fátima Pereira de Souza</p> <p>1. Biologia Estrutural. 2. Biofísica Molecular. 3. Espectroscopia. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabella Ottenio de Lourenço

Estudo estrutural do domínio SH3-like ligado em *tandem* da proteína KIN humana e sua interação com ácido nucleico utilizando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e caracterização físico-química por técnicas espectroscópicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 141886/2019-6

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Gisele Cardoso Amorim
UFRJ – Câmpus Xerém

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro
UFRJ

São José do Rio Preto
27 de janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso, pelos anos de ensinamento, discussões e desenvolvimento de projetos, os quais me agregaram uma bagagem profissionais que carregarei comigo ao longo de toda minha trajetória na carreira;

A minha coorientadora, Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, pela confiança, ensinamento e ajuda tanto na vida acadêmica-profissional como na vida pessoal. Sou grata pelo acolhimento que recebi durante todos esses anos no grupo de pesquisa, e pela oportunidade de ter feito parte de diferentes discussões e eventos que expandiram minha visão sobre mundo acadêmico e profissional. O apoio, conselhos e ajuda me fizeram chegar aonde cheguei e sou eternamente grata;

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey pelas discussões de resultado, colaboração no atual trabalho e por todo o ensinamento durante os quase dez anos em que estive no grupo de pesquisa. Me sinto honrada por ter tido aula com o Prof. Marcelo logo quando entrei na graduação em Física, na disciplina de Física I, e algum tempo depois ter sido sua orientanda, pois foi um docente em que desde o primeiro momento me despertou o interesse na pesquisa científica;

Ao Ibilce e Departamento de física por ser minha segunda casa por mais de dez anos e que sempre fará parte da minha história;

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 141886/2019-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2019/04646-9, FINEP (Processo FINEP 2016/01749-3) pelo apoio no desenvolvimento de pesquisa, proporcionando infraestrutura.

RESUMO

A proteína KIN atua como reguladora de danos no DNA e está envolvida na replicação desse ácido nucleico. Seu gene, localizado no cromossomo 10 em células humanas, é filogeneticamente conservado e ubiquamente expresso em eucariotos. Em humanos, essa proteína possui 45 kDa e é estruturalmente composta por quatro domínios, sendo: domínio dedo de zinco do tipo C2H2, domínio central homólogo à proteína RecA de *E. coli*, domínio de sinal de localização nuclear e domínio SH3-like em *tandem* (dSH3thKIN) formado por dois subdomínios SH3. Estudos mostraram que o dSH3thKIN apresenta em sua estrutura um motivo de ligação a RNA conhecido como motivo KOW e, portanto, esse domínio é considerado como o principal mediador de interação da proteína KIN com RNA. Essa interação dSH3thKIN/RNA é fundamental para o desempenho das atividades biológicas da KIN. Entretanto, há uma escassez de informações estruturais e de interação do dSH3thKIN na literatura. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar o assinalamento das ressonâncias ^1H , ^{15}N e ^{13}C do domínio, determinar sua estrutura tridimensional em solução, caracterizar a estabilidade térmica, química e de pH desse domínio e investigar sua interação com RNA de levedura e homopolímeros de RNA e DNA. Um total de 98,4% das ressonâncias do domínio foram assinaladas e a resolução de sua estrutura tridimensional apresentou dois subdomínios com arranjos de barris- β formados por cinco fitas- β cada um. A análise de movimentos térmicos da cadeia principal do dSH3thKIN mostrou que esse domínio apresenta uma flexibilidade interna reduzida apesar de ser formado por dois subdomínios. A caracterização da estabilidade térmica e de pH do domínio revelou uma temperatura de desenovelamento de aproximadamente 59 °C, com uma tendência de agregação que leva a formação de estruturas como amiloides, e uma estabilidade das estruturas secundárias entre pH 5,5 e 9,5. O processo de desenovelamento químico do dSH3thKIN ocorreu de modo reversível, sugerindo que esse domínio apresenta um enovelamento independente no contexto da proteína KIN. As medidas de interação do domínio com ácidos nucleicos mostraram a seguinte ordem de afinidade: poli(rG) > poli(rC) > RNA de levedura > poli(rU) > poli(rA) > poli(A) DNA, indicando que o dSH3thKIN apresenta uma maior afinidade pelas bases de guaninas e citosinas e RNA de levedura. A análise dos parâmetros termodinâmicos da ligação dSH3thKIN/RNA sugere que a maior contribuição para a formação do complexo é a interação eletrostática. Detalhes estruturais sobre o sítio de ligação de ácido nucleico no dSH3thKIN revelou que embora a associação tenha uma contribuição devido a interações eletrostáticas, há um caráter de estabilização por interações de curta distância, ligações de H e interações de *Van der Waals*. Sendo A72 e E96, que estão localizados no motivo KOW, e lisinas (K31, K34, K35, K36, K75 e K125) são importantes para a formação e estabilização do complexo. Em conclusão, o presente trabalho apresenta um conjunto de resultados estruturais e de interação com ácido nucleico para o dSH3thKIN que podem contribuir para um melhor entendimento do papel da proteína KIN nos processos de replicação, transcrição e tradução de DNA.

Palavras-chave: Domínio SH3. Ligação *tandem*. KIN humana. RMN. Interação proteína-ácido nucleico. Reparo DNA.

ABSTRACT

The KIN protein acts as a DNA damage regulator and participates in the replication of this nucleic acid. Its gene, located on chromosome 10 in human cells, is phylogenetically conserved and ubiquitously expressed in eukaryotes. In humans, this protein has 45 kDa and is structurally composed of four domains: C2H2-type zinc finger domain, central domain homologous to the *E. coli* RecA protein, nuclear localization signal domain, and SH3-like in tandem domain (dSH3thKIN), made up of two SH3 subdomains. Studies have shown that dSH3thKIN presents in its structure an RNA-binding *motif* known as KOW *motif* and, therefore, this domain is considered as the main mediator of interaction of the KIN protein with RNA. This dSH3thKIN/RNA interaction is critical to the performance of KIN's biological activities. However, there is a paucity of structural and interactional information on dSH3thKIN in the literature. Thus, the present work aimed to assign the ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonances of the domain, determine its three-dimensional structure in solution, characterize the thermal, chemical and pH stability of this domain and investigate its interaction with yeast RNA and homopolymers of RNA and DNA. A total of 98.4% of domain resonances were assigned and the resolution of its three-dimensional structure showed two subdomains with β -barrel arrangements formed by five β -strands each. The analysis of thermal movements of the main chain of dSH3thKIN showed that this domain has reduced internal flexibility despite being formed by two subdomains. The characterization of the thermal and pH stability of the domain revealed an unfolding temperature of around 59 °C, with an aggregation tendency that leads to the formation of structures such as amyloid, and a stability of secondary structures between pH 5.5 and 9.5. The chemical unfolding process of dSH3thKIN occurred reversibly, suggesting that this domain presents an independent folding in the context of the KIN protein. Domain interaction measurements with nucleic acids showed the following affinity order: poly(rG) > poly(rC) > yeast RNA > poly(rU) > poly(rA) > poly(A) DNA, indicating that dSH3thKIN shows a higher affinity for guanine and cytosine bases and yeast RNA. Analysis of the thermodynamic parameters of dSH3thKIN/RNA binding suggests that the major contribution to complex formation is electrostatic interaction. Structural details about the nucleic acid binding site on dSH3thKIN revealed that although the association is contributed due to electrostatic interactions, there is a stabilization character by short distance interactions, H bonds and Van der Waals interactions. Being A72 and E96, which are in the KOW *motif*, and lysines (K31, K34, K35, K36, K75 and K125) are important for the formation and stabilization of the complex. In conclusion, the present work presents a set of structural and nucleic acid interaction results for dSH3thKIN that may contribute to a better understanding of the role of the KIN protein in DNA replication, transcription, and translation processes.

Keywords: SH3 domain. Tandem. Human KIN. NMR. Protein-nucleic acid interaction. DNA repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação de alguns tipos de lesões no DNA. São mostrados agentes físicos e químicos causadores de danos ao DNA e suas respectivas ações na sequência de DNA, incluindo mal pareamento de bases nitrogenadas, quebra de simples e dupla fita, dano a uma única base nitrogenada e ligações cruzadas inter e intracadeias de DNA. Para cada dano, o sistema de reparo corrige-o com determinada ação de reparo. 16
- Figura 2:** Domínios e estrutura da proteína KIN. Os domínios presentes na proteína KIN são ZF (dedo de zinco – “zinc finger”), WH (hélice alada – “winged helix”), RH (domínio homólogo à proteína RecA de *Escherichia coli*); NLS (sinal de localização nuclear – “nuclear location signal”) e dois subdomínios SH3-like em tandem com o motivo KOW. A estrutura da proteína inteira, predita pelo AlphaFold (JUMPER et al., 2021), é mostrada em cartoon, assim como os domínios que possuem estrutura resolvida experimentalmente. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002). 21
- Figura 3:** Estrutura em solução da região 51-160 da proteína KIN humana. Representação em cartoon da conformação de menor energia..... 23
- Figura 4:** Imunofluorescência indireta em células HeLa em proliferação e células confluentes. A proteína KIN está localizada em foco intranuclear em células em proliferação. Células HeLa em crescimento exponencial (a) ou células confluentes privadas de soro por 3 dias (b) foram fixadas, permeabilizadas e processadas por Imunofluorescência Indireta usando o anticorpo. Todas as imagens foram capturadas nas mesmas condições. As células HeLa em proliferação apresentaram um padrão pontilhado (a). As células quiescentes mostraram coloração muito fraca (b). Barra 10 μm 26
- Figura 5:** Sequência domínio C-terminal da proteína KIN humana. Alinhamento de múltiplas sequências da região C-terminal de 23 proteínas KIN eucarióticas. O esquema de numeração refere-se à sequência do KIN humano. Os resíduos carregados positivamente estão em azul, os resíduos carregados negativamente estão em vermelho e os resíduos hidrofóbicos estão em verde. Os elementos de estrutura secundária correspondentes à estrutura cristalográfica do domínio C-terminal da KIN humana estão indicados acima do alinhamento. O comprimento do

domínio é bem conservado, exceto na sequência de chimpanzé (*Pan troglodytes*), que abriga uma inserção de 42 resíduos entre os dois subdomínios. O motivo KOW (335-373) no domínio da proteína KIN está destacado em um quadrado vermelho.....34

Figura 6: Estrutura do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana. A estrutura cristalográfica do domínio (PDB_id: 2CKK) está representada em cartoon com a coloração de acordo com sua estrutura secundária, sendo a α -hélice em ciano, fita- β em magenta e estruturas aleatórias e voltas em salmão. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).35

Figura 7: Localização do sítio de ligação do tungstato no domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana. (A) Estrutura espacial das moléculas de fosfato e tungstato mostrando a semelhança estruturais entre as moléculas. (B) Sobreposição nos subdomínios A do domínio SH3-like em tandem da KIN humana da estrutura cristalográfica nativa (laranja), com tungstato em solução (amarelo) e da co-cristalização com tungstato (azul). Os resíduos de lisina envolvidos na ligação do tungstato são mostrados na cor do esqueleto correspondente. Os ânions de tungstato do cristal formado com a molécula em solução são mostrados em magenta. A quantificação das mudanças de conformação dentro dos subdomínios (em particular, nas alças $\beta 2$ - $\beta 3$ e $\beta 3$ - $\beta 4$ do subdomínio B, conforme indicado pelas setas) e do posicionamento diferente do subdomínio B é apontado pelas setas pretas. (C) Representação em cartoon e de superfície do domínio.37

Figura 8: Gel de agarose 1% do miniprep do plasmídeo pGEX-4T-1-dSH3thKIN. A Seta vermelha indica a altura da banda do plasmídeo.....55

Figura 9: SDS-PAGE 15% da indução da expressão e purificação do dSH3thKIN. (A) Indução da expressão do dSH3thKIN e sua solubilidade, sendo FS a fração solúvel e F.I a fração insolúvel. (B) Cromatografia por afinidade sendo a banda na coluna 4 a eluição do dSH3thKIN fusionado com a GST. (C) Diálise, clivagem com a TEV, mostrando sua banda em torno de 30 kDa na coluna DT, e segunda afinidade para retirada da GST. (D-E) Cromatografia de exclusão molecular para separação da TEV na amostra de dSH3thKIN. (F) Cromatograma correspondente da exclusão molecular do dSH3thKIN, destacado no retângulo vermelho as frações eluídas que foram verificadas no SDS-PAGE. O dSH3thKIN está destacado com sua banda em aproximadamente 15 kDa.57

Figura 10: Estabilidade térmica do dSH3thKIN. Os termogramas de DSC do dSH3thKIN foram registrados em 50 mM de tampão NaPi pH 6,5 contendo 100 mM

de NaCl a uma taxa de varredura de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ nas concentrações de $1,0$ e $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de dSH3thKIN.58

Figura 11: Estabilidade térmica do dSH3thKIN. Os termogramas de DSC do dSH3thKIN foram registrados em 50 mM de tampão NaPi pH $6,5$ contendo 100 mM de NaCl a uma taxa de varredura de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ nas concentrações de $1,0$ e $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de dSH3thKIN.60

Figura 12: Desnaturação do dSH3thKIN pela variação de temperatura. (A) Espectro de emissão do Trp14 do dSH3thKIN em diferentes temperaturas. (B-C) Determinação dos parâmetros físico-químicos ΔH_M e T_M para o domínio. As curvas de desnaturação foram construídas utilizando a equação (4) (B) e a equação (3) (C).61

Figura 13: Espectro de CD do dSH3thKIN em diferentes temperaturas e concentrações. (A) Espectro de CD de $18\text{ }\mu\text{M}$ de dSH3thKIN em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo os dados experimentais representados em círculos e o ajuste pela linha contínua. (B) Espectro de CD de $19,5\text{ }\mu\text{M}$ de dSH3thKIN em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (azul), em $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cian) e novamente em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a renaturação (magenta). (C) Espectro de CD de $37\text{ }\mu\text{M}$ de dSH3thKIN em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (azul), em $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cian) e novamente em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a renaturação (magenta). (D) Espectro de CD de $37\text{ }\mu\text{M}$ de dSH3thKIN em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (azul), em $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cian) e novamente em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a renaturação (magenta).63

Figura 14: Espectro de CD em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cinco diferentes domínios SH3. Todos em concentração de $200\text{ }\mu\text{M}$ em 5 mM de NaPi pH $7,0$64

Figura 15: Estrutura do dSH3thKIN destacando os resíduos aromáticos. A estrutura do domínio (PDB_id: 2CKK) está representado em cartoon com os resíduos aromáticos representados em bastão, sendo o triptofano W14 em amarelo, fenilalanina F99 em laranja, e as tirosinas Y13, Y32, Y46, Y84 e Y120 em rosa. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).65

Figura 16: Desnaturação por CD do dSH3thKIN. (A) Desnaturação em 208 nm de $19,5\text{ }\mu\text{M}$ do dSH3thKIN de 20 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (B) Desnaturação em 228 nm de $37\text{ }\mu\text{M}$ do dSH3thKIN de 20 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (C) Desnaturação em 228 de $37\text{ }\mu\text{M}$ do dSH3thKIN de 20 a $58\text{ }^{\circ}\text{C}$66

Figura 17: Espectro de absorvância do vermelho Congo na ausência e na presença do dSH3thKIN. (A) Sobreposição dos espectros de absorvância de $5\text{ }\mu\text{M}$ de vermelho Congo na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e na presença de $20\text{ }\mu\text{M}$ de dSH3thKIN. (B-E) Desnaturação do dSH3thKIN à $20\text{ }\mu\text{M}$. Primeiro mostrando a desnaturação de 20 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com taxa de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (B), desnaturação de 20 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com taxa de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

¹ (C), desnaturação de 20 a 80 °C e resfriamento de 80 a 20 °C com taxa de 1 °C·min⁻¹ (D) e desnaturação de 20 a 58 °C com taxa de 1,0 °C·min⁻¹ (E). As setas cinzas indicam o deslocamento do comprimento de onda do valor máximo de absorbância.

.....68

Figura 18: Desnaturação do dSH3thKIN pela variação de pH. (A) Espectro de emissão do Trp do dSH3thKIN em diferentes pHs. (B) Gráfico da variação da intensidade máxima de fluorescência pela variação de pH. (C) Gráfico do deslocamento no comprimento de onda do valor máximo da intensidade de fluorescência pela variação de pH.70

Figura 19: Espectro de CD do dSH3thKIN em diferentes nos pHs. (A) Espectros de CD de 19,5 µM de dSH3thKIN em 25 °C, em tampões de pH de 2,5 até 10,5, em intervalos de 0,5. (B) Apresenta os espectros do domínio mostrando com mais detalhes nos tampões em pHs de 4,5 até 10,5.71

Figura 20: Desnaturação com agente desnaturante ureia. Curva de desnaturação (em preto) e curva de renovelamento (vermelho).....73

Figura 21: Espectro de dicroísmo circular do dSH3thKIN com influência de agente desnaturante. Espectro de CD do dSH3thKIN em tampão de 50 mM de NaPi pH 6,5 contendo 100 mM de NaCl na condição nativa sem ureia no tampão ([dSH3thKIN] = 10 µM), com 8 M de ureia ([dSH3thKIN] = 14 µM) e após a retirada da ureia por diálise ([dSH3thKIN] = 14 µM). Todos os espectros foram coletados com em 25 °C.....75

Figura 22: Espectro 2D ¹⁵N-¹H HSQC do dSH3thKIN adquirido a 298 K em um espectrômetro Bruker Avance III HD NMR na frequência ¹H de 600,133 MHz. As atribuições dos picos são indicadas pelo código de aminoácidos de uma letra e pelo número do resíduo. As cadeias laterais são indicadas por uma linha tracejada, exceto o N81Hδ.77

Figura 23: Predição de estrutura secundária utilizando o software TALOS-N (SHEN; BAX, 2013) com base no assinalamento de deslocamento químico do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana mostrando as probabilidades de estruturas secundárias α-hélice (azul) e fita-β (laranja) para cada resíduo. As estruturas secundárias ao longo da sequência estão indicadas no topo, onde os quadrados correspondem à α-hélice e as setas à fita-β.....78

Figura 24: Estrutura em solução de dSH3thKIN. (A) Sobreposição dos átomos da cadeia principal dos 10 modelos de estrutura por RMN de menor energia de dSH3thKIN. (B) Representação em cartoon da estrutura de menor energia

determinado por espectroscopia de RMN em 50 mM de NaPi pH 6,5 contendo 100 mM de NaCl, 3,0 mM de EDTA, 0,5 mM de PMSF e 0,02% (v/v) de NaN₃ a 25 °C. O domínio contém dois subdomínios com seus núcleos em barril-β contendo cinco fitas-β cada. (C) Comparação da estrutura cristalográfica (PDB ID: 2CKK (LE MAIRE et al., 2006a)) com a estrutura de menor energia determinada por RMN. (D) Representação das cadeias laterais aromáticas da estrutura cristalográfica e por RMN (Y13, W14, Y32, Y46, Y84, F99 e Y120). A estrutura de menor energia resolvida por RMN está em branco, a estrutura cristalográfica está representada na cor de amora, o N-terminal está representado em azul e o C-terminal em vermelho. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).81

Figura 25: Dinâmica de cadeia principal de dSH3thKIN. (A) ¹H-¹⁵N NOE registrado a 25 °C e intensidade de campo magnético de 600 MHz (frequência de ¹H). Acima consta a representação da estrutura secundária do domínio de acordo com a estrutura de menor energia determinada por RMN. (B) Representação em cartoon da estrutura de dSH3thKIN obtida por RMN mostrando a localização dos resíduos K97 e G117, em bastão. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).82

Figura 26: Cálculo das perturbações nos deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos dSH3thKIN. Os resíduos com perturbações significativas são aqueles que se encontram envolvidos na interação com ácido nucleico. A linha representa a média de todos os valores de CSP para os resíduos em cada interação e a linha em pontos é o valor da média somado ao desvio padrão. A perturbações nos deslocamentos químicos na interação com o RNA de levedura está representado em verde (A), poli (rU) em roxo (B), poli (A) DNA em cian (C), poli (rA) em azul (D), poli (rG) em magenta (E) e poli(rC) em laranja (F). Os asteriscos indicam os resíduos de prolina (P17, P71, P73 e P109) e E30 que não foi possível identificar e atribuir o assinalamento.84

Figura 27: Resíduos de dSH3thKIN que estão envolvidos na interação com ácido nucleico. A estrutura representativa determinada por RMN do domínio está mostrada em cartoon. Os resíduos acima do valor médio de CSP estão coloridos em azul e os resíduos acima da média somada ao desvio padrão está colorido em vermelho na interação com RNA de levedura (A), poli(rU) (B), poli(A) DNA (C), poli(rA) (D), poli(rG) (E) e poli(rC) (F). As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).86

Figura 28: Mudança da supressão de fluorescência intrínseca de dSH3thKIN em função da concentração de homopolímeros de RNA, DNA e RNA de levedura. Alteração de extinção de fluorescência do W14 do dSH3thKIN ($\lambda_{ex}=295$ nm, $\lambda_{em}=330$ nm) em função da concentração de RNA de levedura (A), poli (rU) (roxo), poli (A) DNA (cian), poli (rA) (azul), poli (rG) (magenta) e poli (rC) (laranja) em tampão de 20 mM Bis-Tris pH 6,5 na temperatura de 25 °C. Cada ponto na isotérmica de ligação representa a média e desvio padrão a partir de medidas em triplicado. As linhas contínuas denotam as curvas teóricas ajustadas globalmente aos dados experimentais.	87
Figura 29: Análise dos dados de fluorescência da interação de dSH3thKIN com RNA de levedura. Alteração de extinção de fluorescência do W14 do dSH3thKIN ($\lambda_{ex}=295$ nm, $\lambda_{em}=330$ nm) em função de concentrações de RNA de levedura em tampão de 20 mM Bis-Tris pH 6,5 nas temperaturas de 15, 25 e 35°C. A inserção corresponde ao gráfico de van't Hoff para o complexo dSH3thKIN-RNA de levedura.	89
Figura 30: Representação dos resíduos envolvidos na estabilização da interação do dSH3thKIN com ácido nucleico. As estruturas foram geradas utilizando o Pymol (DELANO, 2002).	90
Figura 31: Mapa de construção do plasmídeo com a inserção do gene do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana.	100

Quadro 1: Descrição das formas truncadas da proteína KIN.	27
Quadro 2: Tampões e suas respectivas faixas de tamponamento na utilização da preparação da amostra para os experimentos de desnaturação em diferentes pHs.	45
Quadro 3: Sequência de resíduos de aminoácido da causa GST, sequência de clivagem TEV e do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana.	101
Quadro 4: Sequência de resíduos de aminoácidos do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana. A sequência está demonstrada em blocos contendo 10 resíduos cada, com a sequência de resíduos do motivo KOW em negrito.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de experimentos para o assinalamento completo do dSH3thKIN em 50 mM tampão NaPi pH 6,5 contendo 100 mM NaCl e suplementado com 5% (v/v) de D ₂ O e 0,33 mM de sal de sódio do ácido 3-(trimetil-silil)-1-propano sulfônico deuterado (DSS-d ₆). Todos os experimentos realizados em 600 MHz, 25 °C com 540 µM de dSH3thKIN marcada isotopicamente com ¹⁵ N e ¹³ C.	49
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos do domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana com a cauda GST e sítio de clivagem para TEV antes e após a clivagem obtidos a partir da ferramenta ExPasy-ProtParam (GASTEIGER et al., 2005).....	56
Tabela 3: Resultados dos experimentos de desnaturação térmica por DSC. Média dos valores da temperatura de Melting (T _M), variação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) do processo de desnaturação e da variação de entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) do processo de desnaturação térmica da proteína dSH3thKIN.	59
Tabela 4: Estimativa das contribuições de estrutura secundária do dSH3thKIN em tampões com diferentes pHs. As frações de estruturas secundárias em diferentes pHs foi estimada pela análise de deconvolução feita no pacote de programas CDpro pelo método CONTIN/LL usando o conjunto referência de proteínas SP22X (SREERAMA; WOODY, 2000).	72
Tabela 5: Estatística estrutural para as 10 estruturas de menor energia de dSH3thKIN.	79
Tabela 6: Valores de constante de dissociação, concentração de proteína e saturação máxima da intensidade de fluorescência para cada titulação de ácido nucleico em 25 °C em solução contendo o domínio SH3-like em tandem da proteína KIN humana.	88
Tabela 7: Parâmetro termodinâmico da interação de dSH3thKIN com RNA de levedura. Constante de dissociação (K _D), ΔH , ΔG e ΔS da interação determinada usando experimentos de supressão de fluorescência a 15, 25 e 35 °C.....	89
Tabela 8: Lista de resíduos envolvidos na interação com ácidos nucleicos obtidos a partir dos resultados de CSP. A lista com os resíduos acima do valor médio, e acima do valor médio mais o desvio padrão.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bgl	-	<i>cryptic β-glucosideo</i>
BME	-	β -mercaptoetanol
CD	-	Dicroísmo circular
CPDs	-	Dímeros de pirimidina ciclobutano (<i>"Cyclobutane pyrimidine dimers"</i>)
CSP	-	Perturbação de deslocamento químico (<i>"Chemical shift perturbation"</i>)
dA	-	Desoxiadenosina
DNAc	-	DNA complementar
DSS-d₆		Sal de sódio do ácido 3-(trimetil-silil)-1-propano sulfônico
dT	-	Desoxitimidina
DTT	-	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetra-acético
FID	-	Decaimento livre de indução (<i>"Free induction decay"</i>)
FPLC	-	Cromatografia líquida de proteína rápida (<i>"Fast Protein Liquid chromatography"</i>)
GST	-	Glutathione S transferase
hetNOE	-	Efeito Heteronuclear Overhauser (<i>"Heteronuclear Overhauser effect"</i>)
HSQC	-	Correlação heteronuclear de quantum único (<i>"Heteronuclear single-quantum correlation"</i>)
IPTG	-	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	-	Luria-Bertani
NaPi	-	Tampão fosfato de sódio
NER	-	Reparo por excisão de nucleotídeos (<i>"Nucleotide excision repair"</i>)
NLS	-	Sinal de localização nuclear (<i>"Nuclear localization signals"</i>)
NOESY	-	Espectroscopia do efeito nuclear de Overhauser (<i>"Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy"</i>)
O.D	-	Densidade Ótica (<i>"Optical density"</i>)
ORF	-	Fase aberta de leitura (<i>"open reading frame"</i>)

PDB	- Banco de dados de proteína (<i>“Protein data bank”</i>)
PMSF	- Fenilmetilsulfonilflúor
Poli	- Polinucleotídica
RMSD	- Raiz quadrada do desvio quadrático médio (<i>“Root-mean-square deviation”</i>)
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
TEV	- <i>Tobacco etch virus</i>
UV	- Ultravioleta
Vis	- Visível
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

C₆H₁₂O₆	-	Glicose
CaCl₂	-	Cloreto de cálcio
cm	-	Centímetro
CuCl₂	-	Cloreto de cobre
D₂O	-	Óxido de deutério (Água deuterada)
Da	-	Dalton
H₃BO₃	-	Ácido bórico
Hz	-	Hertz
k	-	Kilo
L	-	Litro
m	-	Mili
M	-	Molar
MgSO₄	-	Sulfato de magnésio
MnCl₂	-	Cloreto de manganês
Na₂MoO₄	-	Molibdato de sódio
Na₂SeO₃	-	Selenito de sódio
NH₄Cl	-	Cloreto de amônio
NiCl₂	-	Cloreto de níquel
ns	-	Nano segundos
ps	-	Pico segundos
ZnSO₄	-	Sulfato de zinco
α	-	Alfa
β	-	Beta
γ	-	Gama
λ	-	Lambda
μ	-	Micro
ρ	-	Rô
φ	-	Fi
ψ	-	Psi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Reparo de dano em DNA	16
1.2	Recombinação ilegítima e DNA curvo	17
1.3	Proteína KIN	18
1.3.1	Identificação da proteína KIN em murinos	18
1.3.2	Investigação sobre função dos domínios da KIN	20
1.3.3	Proteína KIN humana	28
1.3.4	Proteína KIN expressa de forma ubíqua	30
1.3.5	Domínio C-terminal SH3-like ligado em tandem	32
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	Obtenção do domínio SH3-like em <i>tandem</i> da proteína humana KIN (dSH3thKIN)	40
4.1.1	DNA recombinante pGEX-4T-1- dSH3thKIN	40
4.1.2	Transformação do plasmídeo pGEX-4T-1-dSH3thKIN em linhagem TOP10	40
4.1.3	Transformação do plasmídeo pGEX-4T-1-dSH3thKIN em linhagem BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	41
4.1.4	Expressão da proteína dSH3thKIN em meio mínimo M9	41
4.1.5	Purificação do dSH3thKIN	42
4.2	Caracterização biofísico-química da proteína dSH3thKIN	43
4.2.1	Desnaturação térmica por calorimetria de varredura diferencial	43
4.2.2	Desnaturação por espectroscopia de fluorescência	44
4.2.3	Espectro característico e desnaturação térmica por dicroísmo circular (CD)	46
4.2.4	Ensaio utilizando vermelho Congo (Congo Red)	47
4.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	48
4.3.1	Assinalamento de ressonância ^1H , ^{15}N e ^{13}C do dSH3thKIN	48
4.3.2	Dinâmica estrutural do dSH3thKIN	50

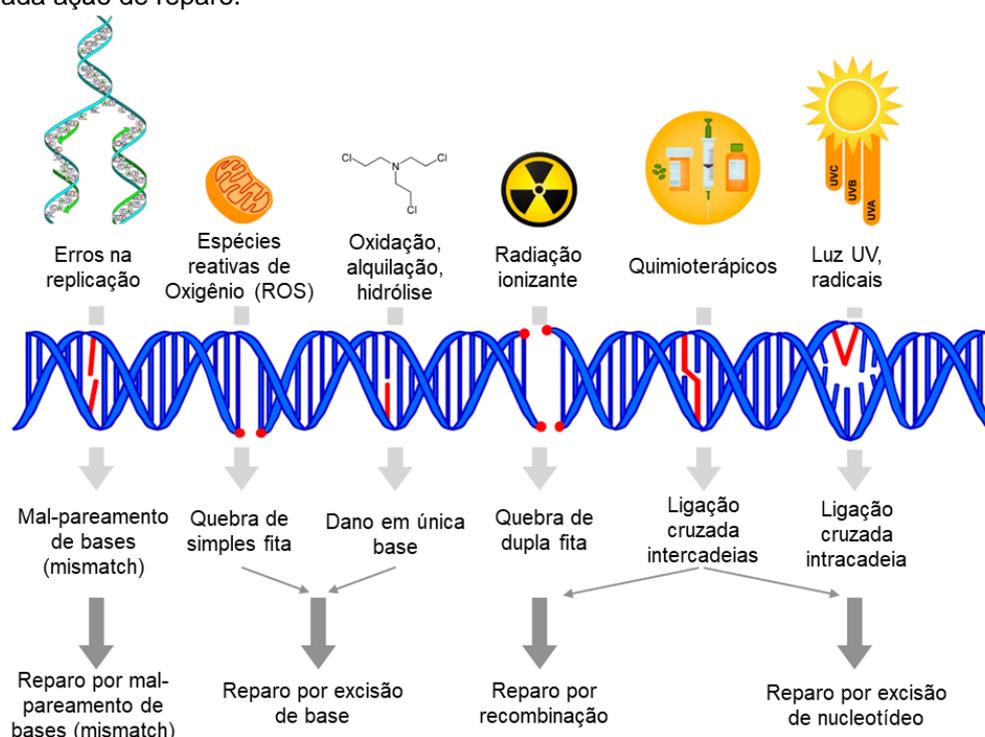
4.3.3	Cálculo da Estrutura em Solução.....	50
4.3.4	Análise pela perturbação de deslocamento químico.....	51
4.4	Medidas de supressão de fluorescência para a interação do dSH3thKIN com ácido nucleico	51
4.5	Termodinâmica da interação do dSH3thKIN com ácido nucleico	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
6.1	Parâmetros físico-químicos e obtenção da proteína dSH3thKIN	55
6.2	Caracterização biofísico-química do dSH3thKIN	58
6.2.1	Desnaturação térmica e a influência da temperatura na estabilidade do dSH3thKIN	58
6.2.2	Desnaturação química	69
6.2.3	Desnaturação por agente caotrópico	73
6.3	Assinalamento das ressonâncias e estrutura em solução	76
6.4	Interação do dsh3thkin com ácido nucleico.....	83
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE A - Construção plasmídeo	100
	Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1-dSH3thKIN	100
	Sequência de resíduos de aminoácidos GST-TEV-dSH3thKIN	101
	Sequência de resíduos de aminoácidos dSH3thKIN	101
	APÊNDICE B - Resíduos de aminoácidos envolvida da interação dSH3thKIN com ácido nucleico	102
	ANEXO- Manuscritos publicados durante o período de doutoramento	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reparo de dano em DNA

Apesar da identificação de um número crescente de proteínas que estão envolvidas na replicação, recombinação e reparo em ácido nucleico, os mecanismos desses processos e as sobreposições entre eles continuam a ser elucidadas em células de mamíferos (MICCOLI et al., 2002). Danos ao DNA podem ser causados por agentes físicos e químicos (**Figura 1**), incluindo radiação ionizante e medicamentos radiomiméticos, mas também podem surgir como lesões secundárias durante a replicação e no reparo do DNA, após a exposição a uma ampla gama de genotoxinas (ROTHKAMM et al., 2015). Caso esses danos não sejam reparados, podem provocar mutações, assim como instabilidade genômica e apoptose ou carcinogênese e para isso, as células são equipadas com uma série de mecanismos específicos para reparar e minimizar quaisquer efeitos debilitantes de dano ao DNA (PARK et al., 2021).

Figura 1: Representação de alguns tipos de lesões no DNA. São mostrados agentes físicos e químicos causadores de danos ao DNA e suas respectivas ações na sequência de DNA, incluindo mal pareamento de bases nitrogenadas, quebra de simples e dupla fita, dano a uma única base nitrogenada e ligações cruzadas inter e intracadeias de DNA. Para cada dano, o sistema de reparo corrige-o com determinada ação de reparo.



FONTE: Adaptado de *The Komor Lab* (KOMOR, 2019).

Um dos processos de reparo é por excisão de nucleotídeos (NER – “*nucleotide excision repair*”) e tem sido intensamente estudado devido a sua versatilidade em operar, principalmente, em danos provocados por agentes externos, como por exemplo a radiação ultravioleta (UV), presente na luz solar e iluminação artificial (**Figura 1**). Como neste processo há uma expressão constante de genes envolvidos neste sistema de reparo, é possível uma remoção eficiente da grande maioria das lesões causadas por radiação UV (KANNOUCHE et al., 1998). A exposição de células mamárias a esta radiação leva à formação de lesões que provocam distorção da dupla-hélice, induzindo dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs), fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PPs) e ligações cruzadas intra e intercadeias nas fitas de DNA (PARK et al., 2021) que perturbam os processos de replicação, transcrição e tradução do DNA (COIN; OKSENYCH; EGLY, 2007).

O mecanismo geral em NER é um processo complexo que envolve a ação de aproximadamente 20-30 proteínas (DE BOER; HOEIJMAKERS, 2000) em sucessivas etapas que podem ser divididas entre detecção inicial, verificação do dano, remoção e ressíntese (KUPER; KISKER, 2012). Após várias proteínas de vigilância detectarem e confirmarem o dano, o fator de transcrição IIH (TFIIH) é recrutado para o DNA danificado e, após a confirmação de uma lesão, o TFIIH cria uma “bolha” ao redor da lesão utilizando suas atividades de ATPase/DNA helicase (PARK et al., 2021) evitando que a lesão se propague e possa acarretar em doenças genéticas devido um rearranjo genômico, como a recombinação ilegítima, nos processos de replicação celular.

7 CONCLUSÃO

O dSH3thKIN teve 98,4% das ressonâncias assinaladas e a resolução de sua estrutura tridimensional em solução apresentou dois subdomínios com arranjos de barris- β formados por cinco fitas- β cada um e três regiões curtas de α -hélices.

A análise de hetNOE do dSH3thKIN mostrou que esse domínio apresenta uma flexibilidade interna reduzida, apesar de ser formado por dois subdomínios. Corroborando com o baixo RMSD obtido entre estrutura em solução resolvida por RMN e a estrutura resolvida por cristalografia.

A estabilidade térmica e de pH do domínio revelou uma temperatura de desenovelamento de aproximadamente 59 °C e uma estabilidade das estruturas secundárias entre pH 5,5 e 9,5, com uma tendência de agregação que leva à formação de estruturas agregadas, como amiloides. Além disso, a marcação do domínio com vermelho Congo indicou a formação de estruturas como amiloide na desnaturação térmica deste domínio. O processo de desenovelamento com agente caotrópico do dSH3thKIN ocorreu de modo reversível e com o ponto médio de desenovelamento de aproximadamente 3,8 M de ureia, sugerindo que esse domínio apresenta um enovelamento independente no contexto da proteína KIN.

A caracterização biofísico-química do domínio evidencia uma tendência de agregação na organização de estruturas- β . Já que o domínio SH3-*like* em *tandem* foi determinado a ser essencial para a formação de estruturas agregadas no núcleo celular, atribuímos a este domínio a função de formar estruturas agregadas, sendo que os resultados presentes neste trabalho demonstram condições em que o domínio forma um estado agregado, possivelmente amiloide.

As medidas de interação do domínio com ácidos nucleicos mostraram a seguinte ordem de afinidade: poli(rG) > poli(rC) > RNA de levedura > poli(rU) > poli(rA) > poli(A) DNA, indicando que o dSH3thKIN apresenta uma maior afinidade por RNA e bases de guaninas e citosinas, na ordem de 10^7 M. A análise dos parâmetros termodinâmicos da ligação dSH3thKIN/RNA sugere que embora a associação tenha uma contribuição devido a interações eletrostáticas, há um caráter de estabilização por interações de curta distância, ligações de H e interações de *Van der Waals*.

Detalhes estruturais sobre o sítio de ligação de ácido nucleico no dSH3thKIN revelaram que a interação ocorre entre os dois subdomínios, sendo A72 e E96, que

estão localizados no motivo KOW, e lisinas (K31, K34, K35, K36, K75 e K125) importantes para a estabilização do complexo. Sugerindo que o domínio poderia realizar reconhecimento de regiões específicas no material genético para início do reparo a dano na sequência de ácido nucleico durante a replicação, e não necessariamente tendo a interação dependente de uma região inteira, como o motivo KOW.

REFERÊNCIAS

- ANGULO, J. F. et al. KIN, a mammalian nuclear protein immunologically related to E. coli RecA protein. **Mutation Research**, v. 217, n. 2, p. 123–134, mar. 1989.
- ANGULO, J. F. et al. Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-recA antibodies. **Biochimie**, v. 73, n. 2, p. 251–256, 1 fev. 1991a.
- ANGULO, J. F. et al. Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5117–5123, 11 out. 1991b.
- ARANEDA, S. et al. Preferential expression of kin, a nuclear protein binding to curved DNA, in the neurons of the adult rat. **Brain Research**, v. 762, n. 1, p. 103–113, 11 jul. 1997.
- AYUSO, J. M. et al. Tumor-on-a-chip: a microfluidic model to study cell response to environmental gradients. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 20, p. 3461–3471, 9 out. 2019.
- BADER, R. et al. Probing the Mechanism of Amyloidogenesis through a Tandem Repeat of the PI3-SH3 Domain Suggests a Generic Model for Protein Aggregation and Fibril Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 1, p. 189–208, 10 fev. 2006.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, BRIDGE OVER BROKEN ENDS - The Cellular Response to DNA Breaks in Health and Disease. v. 3, n. 8, p. 1109–1115, 1 ago. 2004.
- BECKETT, D. Chapter one - Measurement and Analysis of Equilibrium Binding Titrations: A Beginner's Guide. Em: JOHNSON, M. L.; HOLT, J. M.; ACKERS, G. K. (Eds.). **Methods in Enzymology**. Biothermodynamics, Part C. [s.l.] Academic Press, 2011. v. 488p. 1–16.
- BERNARD, A. et al. Bayesian estimation of NMR restraint potential and weight: a validation on a representative set of protein structures. **Proteins**, v. 79, n. 5, p. 1525–1537, maio 2011.
- BHATTACHARYA, A.; TEJERO, R.; MONTELIONE, G. T. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 66, n. 4, p. 778–795, 2007.
- BIARD, D. S. F. et al. Enhanced Expression of the Kin17 Protein Immediately after Low Doses of Ionizing Radiation. **Radiation Research**, v. 147, n. 4, p. 442–450, 1997a.
- BIARD, D. S. F. et al. Differential expression of the Hs Kin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin. **Archives of Dermatological Research**, v. 289, n. 8, p. 448–456, 1 jul. 1997b.

BIARD, D. S. F. et al. Ionizing Radiation Triggers Chromatin-bound kin17 Complex Formation in Human Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 19156–19165, 24 maio 2002.

BRUNGER, A. T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2728–2733, 2007.

CARRIER, L. et al. Solution structure of the region 51–160 of human KIN17 reveals an atypical winged helix domain. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 16, n. 12, p. 2750–2755, dez. 2007.

COIN, F.; OKSENYCH, V.; EGLY, J.-M. Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair. **Molecular Cell**, v. 26, n. 2, p. 245–256, 27 abr. 2007.

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 453–460, 1 mar. 2000.

DE LOURENÇO, I. O. et al. ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments of the SH3-like tandem domain of human KIN protein. **Biomolecular NMR Assignments**, v. 15, n. 2, p. 449–453, 1 out. 2021.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277–293, 1 nov. 1995.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **CCP4 Newsletter on protein crystallography**, v. 40, n. 1, p. 82–92, 2002.

DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 884–890, dez. 2003.

FASMAN, G. D. (ED.). **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Plenum Press, 1996.

GAJIWALA, K. S.; BURLEY, S. K. Winged helix proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 1, p. 110–116, fev. 2000.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Em: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, dez. 2006.

GRISHINA, I. B.; WOODY, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. **Faraday Discussions**, v. 99, n. 0, p. 245–262, 1 jan. 1994.

GRZESIEK, S.; ANGLISTER, J.; BAX, A. Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in ¹³C/¹⁵N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ¹³C Magnetization. **Journal of Magnetic Resonance, Series B**, v. 101, n. 1, p. 114–119, 1 fev. 1993.

GRZESIEK, S.; BAX, A. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 16, p. 6291–6293, jul. 1992.

GUIJARRO, J. I. et al. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4224–4228, 14 abr. 1998.

HÉLÈNE, C.; LANCELOT, G. Interactions between functional groups in protein-nucleic acid associations. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 39, p. 1–68, 1982.

HOU, J.-H.; WEI, Y.-H. The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. **Biochemical Journal**, v. 318, n. 3, p. 1065–1070, 15 set. 1996.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.

HUNT, A. H.; JIRGENSONS, B. Effect of Sodium Dodecyl Sulfate and Its Homologs on Circular Dichroism of α -Chymotrypsin. v. 12, n. 22, p. 7, 1973.

HYBERTS, S. G. et al. Application of iterative soft thresholding for fast reconstruction of NMR data non-uniformly sampled with multidimensional Poisson Gap scheduling. **Journal of biomolecular NMR**, v. 52, n. 4, p. 315–327, abr. 2012.

JACKSON, S. E.; FERSHT, A. R. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10428–10435, 29 out. 1991.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, ago. 2021.

KANNOUCHE, P. et al. Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. **Biochimie**, v. 79, n. 9, p. 599–606, 1 out. 1997.

KANNOUCHE, P. et al. The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 781–789, 1 maio 1998.

KANNOUCHE, P. et al. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1701–1710, 1 set. 2000a.

KANNOUCHE, P. et al. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1701–1710, 1 set. 2000b.

KANNOUCHE, P.; ANGULO, J. F. Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 19, p. 3215–3224, 1 out. 1999.

KAY, L. E. et al. Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 89, n. 3, p. 496–514, 1 out. 1990.

KAY, L. E. et al. A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins. **Journal of Magnetic Resonance, Series B**, v. 101, n. 3, p. 333–337, 1 jun. 1993.

KEELER, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. [s.l.] Wiley, 2010.

KLUNK, W. E.; PETTEGREW, J. W.; ABRAHAM, D. J. Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 37, n. 8, p. 1293–1297, 1 ago. 1989.

KOMOR, A. **Komor Lab Research**. Disponível em: <<http://komorlab.ucsd.edu/research.html>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

KUPER, J.; KISKER, C. Damage recognition in nucleotide excision DNA repair. **Current Opinion in Structural Biology**, Folding and binding/Protein-nucleic acid interactions. v. 22, n. 1, p. 88–93, 1 fev. 2012.

KYRPIDES, N. C.; WOESE, C. R.; OUZOUNIS, C. A. KOW: a novel motif linking a bacterial transcription factor with ribosomal proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 11, p. 425–426, 1 nov. 1996.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Third edition, corrected at 4. printing ed. New York, NY: Springer, 2010.

LE MAIRE, A. et al. Crystallization and halide phasing of the C-terminal domain of human KIN17. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. Pt 3, p. 245–248, 10 fev. 2006a.

LE MAIRE, A. et al. A Tandem of SH3-like Domains Participates in RNA Binding in KIN17, a Human Protein Activated in Response to Genotoxics. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, n. 4, p. 764–776, 8 dez. 2006b.

MACIEJEWSKI, M. W. et al. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 8, p. 1529–1534, 25 abr. 2017.

MARTINEZ, J. C. et al. The DSC data analysis for small, single-domain proteins. Application to the SH3 domain. **Reactive and Functional Polymers**, 7th Spanish-Italian and Mediterranean Congress on Thermodynamics of Metal Complexes. v. 36, n. 3, p. 221–225, 1 maio 1998.

MAZIN, A. et al. Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 20, p. 4335–4341, 1994a.

MAZIN, A. et al. KIN17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 244, n. 4, p. 435–438, 1 jul. 1994b.

MICCOLI, L. et al. Human Kin17 Protein Directly Interacts with the Simian Virus 40 Large T Antigen and Inhibits DNA Replication. **Cancer Research**, v. 62, n. 19, p. 5425–5435, 1 out. 2002.

MICCOLI, L. et al. Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 4162–4175, 15 jul. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7th. ed. New York, NY: W.H. Freeman, 2017.

NGUYEN, B. D. et al. NMR structure of a complex containing the TFIIF subunit RAP74 and the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain phosphatase FCP1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5688–5693, 13 maio 2003.

NICHOLSON, L. K. et al. Dynamics of methyl groups in proteins as studied by proton-detected carbon-13 NMR spectroscopy. Application to the leucine residues of staphylococcal nuclease. **Biochemistry**, v. 31, n. 23, p. 5253–5263, 16 jul. 1992.

NILGES, M. et al. Accurate NMR structures through minimization of an extended hybrid energy. **Structure**, v. 16, n. 9, p. 1305–12, set. 2008.

OLSSON, U.; WOLF-WATZ, M. Overlap between folding and functional energy landscapes for adenylate kinase conformational change. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, p. 111, 16 nov. 2010.

PACE, C. N.; LAURENTS, D. V.; THOMSON, J. A. pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. **Biochemistry**, v. 29, n. 10, p. 2564–2572, 13 mar. 1990.

PARK, Y. J. et al. Ribosomal protein S3 associates with the TFIIF complex and positively regulates nucleotide excision repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 19 jan. 2021.

PATTARO JÚNIOR, J. R. et al. Biophysical characterization and molecular phylogeny of human KIN protein. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 7, p. 645–657, out. 2019.

PINON-LATAILLADE, G. et al. KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 16, p. 3691–3702, 15 jul. 2004.

PONTING, C. P. Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 17, p. 3643–3652, 1 set. 2002.

RIEPING, W. et al. ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 3, p. 381–382, 1 fev. 2007.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1 maio 1981.

ROTHKAMM, K. et al. DNA damage foci: Meaning and significance. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, n. 6, p. 491–504, 2015.

ROZEK, A. et al. Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability. **Biochemistry**, v. 42, n. 48, p. 14130–14138, 1 dez. 2003.

SARMA, I. D.; PARWATE, D. V. Plausible Applicability of Aqueous Congo Red Dye System as Secondary Gamma-ray Dosimeter. **E-Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 572–576, 2008.

SATTLER, M. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 34, n. 2, p. 93–158, 19 mar. 1999.

SCHLEUCHER, J. et al. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 4, n. 2, p. 301–306, 1 mar. 1994.

SCHREIBER, V.; DE MURCIA, G.; DE MURCIA, J. M. A eukaryotic expression vector for the study of nuclear localization signals. **Gene**, v. 150, n. 2, p. 411–412, 1 jan. 1994.

SELKOE, D. J. Folding proteins in fatal ways. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 900–904, dez. 2003.

SHEN, Y.; BAX, A. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 56, n. 3, p. 227–241, 1 jul. 2013.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, dez. 2000.

STUMPE, M. C.; GRUBMÜLLER, H. Interaction of Urea with Amino Acids: Implications for Urea-Induced Protein Denaturation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 51, p. 16126–16131, 1 dez. 2007.

TENG, Y.; ZHANG, H.; LIU, R. Molecular interaction between 4-aminoantipyrine and catalase reveals a potentially toxic mechanism of the drug. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 11, p. 3157, 2011.

TIMCHENKO, T.; BAILONE, A.; DEVORET, R. Btcd, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in Escherichia coli for H-NS, a bacterial nucleoid protein. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 15, p. 3986–3992, 1 ago. 1996.

TISSIER, A. et al. The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. **Biochimie**, v. 77, n. 11, p. 854–860, 1 jan. 1995.

TISSIER, A. et al. Molecular Cloning and Characterization of the MouseKin17Gene Coding for a Zn-Finger Protein That Preferentially Recognizes Bent DNA. **Genomics**, v. 38, n. 2, p. 238–242, 1 dez. 1996.

VIGUERA, A. R. et al. Characterization of the Interaction of Natural Proline-Rich Peptides with Five Different SH3 Domains. **Biochemistry**, v. 33, n. 36, p. 10925–10933, 13 set. 1994.

VRANKEN, W. F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 687–696, 1 jun. 2005.

WILLIAMSON, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 73, p. 1–16, ago. 2013.

WISHART, D. S. et al. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 2, p. 135–140, 1 set. 1995.

WITTEKIND, M.; MUELLER, L. HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. **Journal of Magnetic Resonance, Series B**, v. 101, n. 2, p. 201–205, 1 abr. 1993.

WOODY, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. **European biophysics journal: EBJ**, v. 23, n. 4, p. 253–262, 1994.

YAMAZAKI, T.; FORMAN-KAY, J. D.; KAY, L. E. Two-dimensional NMR experiments for correlating carbon-13.beta. and proton.delta./epsilon. chemical shifts of aromatic residues in ^{13}C -labeled proteins via scalar couplings. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 11054–11055, nov. 1993.