



Avaliação da Participação da Quinase Humana Nek5 na Via Intrínseca da Apoptose após Dano de DNA

Ana Luisa Rodrigues de Oliveira^{1,2}, Camila de Castro Ferezin^{1,2}, Fernanda Luisa Basei², Jörg Kobarg²

¹ Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas

1. Introdução

As Neks (*NIMA-related kinases*) consistem em uma importante família de quinases que inicialmente foram implicadas com o controle do ciclo celular. Nos humanos foram identificadas 11 Neks (Nek1 a Nek11) [1]. Os papéis dessas quinases englobam três principais funções: centriolar e mitose, funções ciliares e dinâmica de microtúbulos e resposta ao DNA danificado. Na maioria dos casos, as Neks atuam em mais de uma função [2]. Ainda, já foi demonstrado que as Neks participam de outras funções na célula, além do ciclo celular, como formação de inflamossomo [3], *splicing* de RNA [4] e regulação da apoptose e funções mitocondriais [5].

Dentre as Neks, a Nek5 é uma das quinases menos estudadas. Ela já foi relacionada com a organização dos centrossomos durante a progressão do ciclo [6]. Outro estudo revelou que essa quinase é um substrato para a caspase-3, e contribui também para a diferenciação miogênica [7]. Já um estudo feito por nosso grupo apresentou a Nek5 como uma proteína mitocondrial com um papel na prevenção da morte celular. O silenciamento dela levou a um aumento nos níveis de ROS na célula e um aumento no nível de apoptose. Ainda, ficou demonstrado que ela interage com as proteínas mitocondriais BCLAF1 (*Bcl-2-associated transcription factor 1*) e Cox11 (integrante do complexo citocromo c oxidase) [5]. Além disso, outro estudo do grupo demonstrou a interação de Nek5 com Topoisomerase II β após tratamento com etoposídeo, e demonstrou uma possível relação dessa quinase com a resposta ao dano de DNA (DDR), já que o silenciamento da Nek5 aumenta os níveis de dano e prejudica a maquinaria de resposta ao DNA [8].

A proteína BCLAF1, um dos interactores da Nek5 [5], foi identificada, primeiramente, como um repressor transcricional que interage com proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 [9]. Além disso, já foi demonstrado papel importante da BCLAF1 na DDR. Um estudo indicou a co-localização de BCLAF1 nos focos de γ H2Ax, o que facilita o reparo do DNA por *non homologous end joining* (NHEJ) [10]. Ainda, BCLAF1 forma um complexo de *splicing* de mRNA com BRCA1, e isso promove a estabilidade de genes relacionados à DDR [11].

2. Objetivo

Levando em conta que a quinase Nek5 apresenta resultados interessantes com relação à regulação da apoptose, das funções mitocondriais e da DDR, o objetivo é avaliar

a expressão de proteínas da via Intrínseca da Apoptose após dano ao DNA, em células expressando diferentemente a Nek5. Ainda, avaliar se a interação entre Nek5 e BCLAF1 influencia no processo de morte celular mediante o dano.

3. Materiais e Métodos

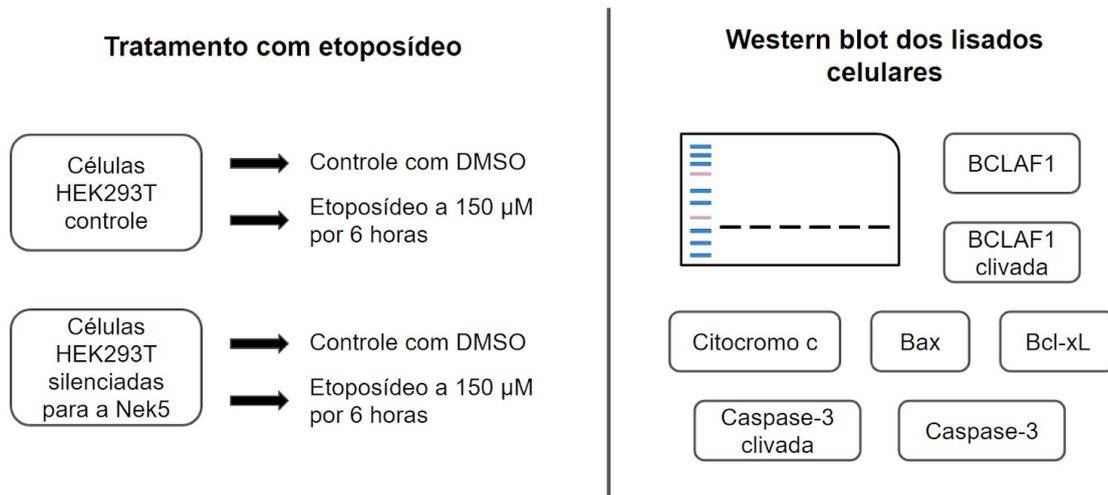


Figura 1: Esquema mostrando os experimentos realizados.

4. Resultados e Discussão

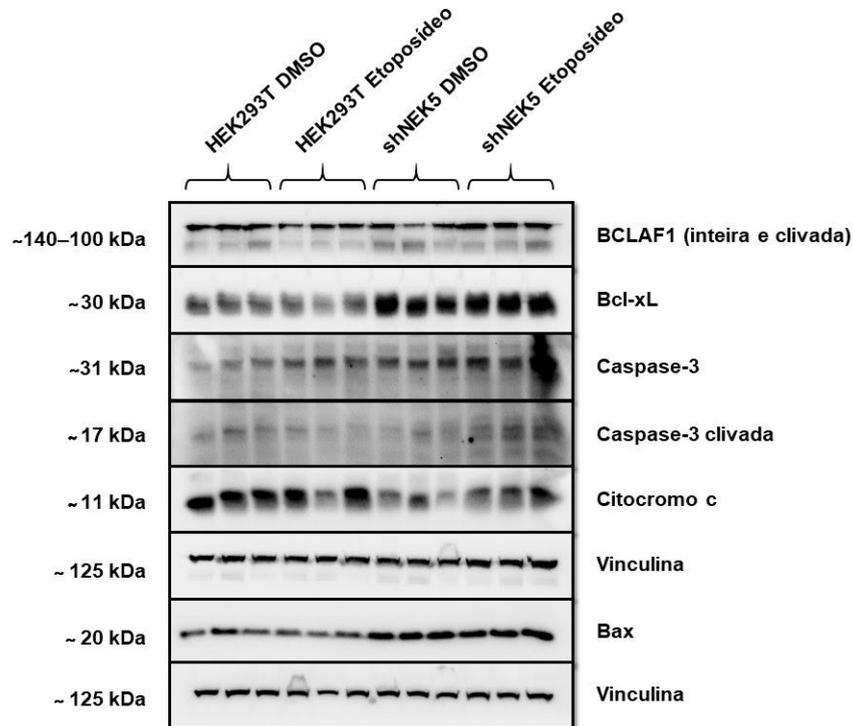


Figura 2: Western blot das proteínas em células HEK293T controle e silenciadas para a Nek5 (shNEK5) tratadas com etoposídeo.

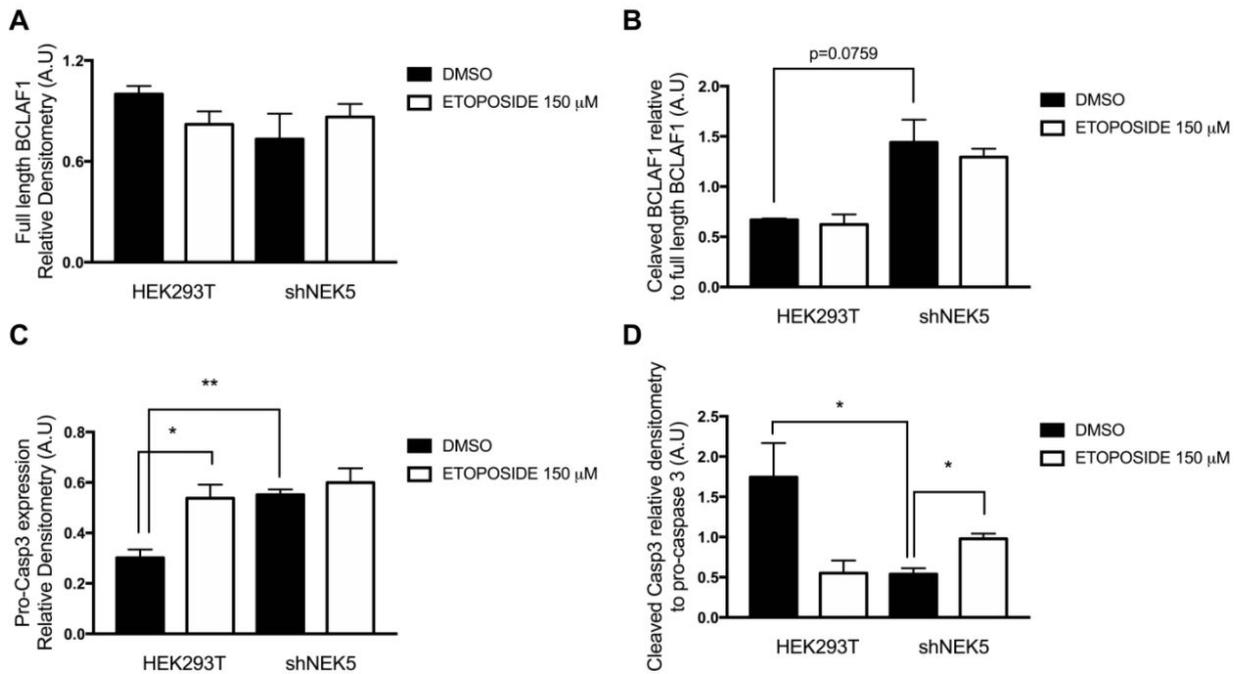


Figura 3: Densitometria das bandas obtidas por Western blot para as células HEK293T controle e silenciadas para a Nek5 (shNEK5). A significância estatística foi obtida com o teste t de Student, com $p < 0,05$, representado por *, e $p < 0,01$, representado por **. (A) BCLAF1. (B) BCLAF1 clivada. (C) Procaspase-3. (D) Caspase-3 clivada.

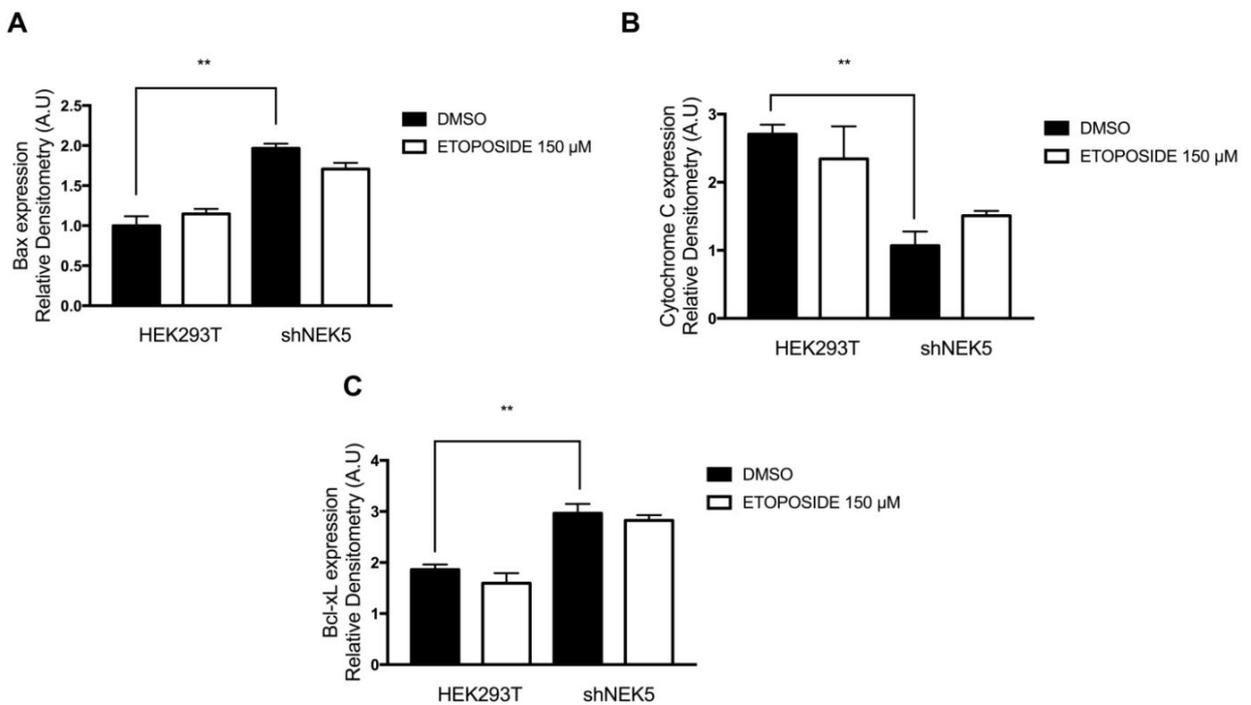


Figura 4: Densitometria das bandas obtidas por Western blot para as células HEK293T controle e silenciadas para a Nek5 (shNEK5). A significância estatística foi obtida com o teste t de Student, com $p < 0,01$, representado por **. (A) Bax. (B) Citocromo c. (C) Bcl-xL.

- Com os dados obtidos até o momento, foi possível observar, com a redução na expressão da Nek5, um aumento na expressão de Bax, Bcl-xL e procaspase-3 (Figuras 4A, 4C e 3C, respectivamente), e também foi possível observar uma redução nos níveis de citocromo c, em condições basais (Figura 4B).
- Não houve diferença de expressão nos níveis da proteína BCLAF1 (Figura 3A), tanto para o tratamento quanto para o silenciamento. Contudo, nas células silenciadas para a Nek5 observou-se o aparecimento de uma banda (Figura 2), o que poderia indicar clivagem dessa proteína nessas condições.
- Os resultados preliminares apontam para uma diferença na expressão das proteínas entre as células HEK293T controle e as células silenciadas, mas não houve diferença significativa em relação ao tratamento com etoposídeo (Figuras 3B e 4).
- O silenciamento da Nek5 levou a um aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Procaspase-3 (Figuras 4A e 3C, respectivamente), o que indica que essa quinase pode exercer um papel anti-apoptótico na célula. Também foi observado um aumento de Bcl-xL com o silenciamento (Figura 4C), mas esse aumento pode ser uma forma de compensar o aumento da expressão de Bax.
- De acordo com a Figura 3D, houve um aumento na expressão da caspase-3 clivada após tratamento com etoposídeo, nas células silenciadas. Esse aumento, porém, não foi observado nas células HEK293T controle. Como as caspases se tornam ativas com a clivagem proteolítica [12], culminando na morte celular, isso pode indicar que as células silenciadas são mais sensíveis ao tratamento com a droga em questão.

5. Próximos Passos

- Como não houve uma variação significativa na expressão das proteínas entre as amostras tratadas e não tratadas com etoposídeo, faremos a otimização da concentração e do tempo de tratamento das células com etoposídeo.
- Fazer fracionamento e imunofluorescência para averiguar a translocação entre compartimentos celulares das seguintes proteínas: BCLAF1 (entre citosol e núcleo) e citocromo c (entre mitocôndria e citosol).

6. Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Dra. Fernanda Luisa Basei e à aluna de doutorado Camila de Castro Ferezin, por me ajudarem na realização do projeto, e à meu orientador Jörg Kobarg. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2019/25188-9 e projeto temático 2017/03489-1.

7. Referências

[1] FRY, A. M. et al. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 19, p. 4423–4433, 2012.

- [2] MEIRELLES, G. V. et al. "Stop Ne(c)king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. **World journal of biological chemistry**, v. 5, n. 2, p. 141–60, 2014.
- [3] GROSS, O. et al. The inflammasome: An integrated view. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 136–151, 2011..
- [4] BASEI, F. L. et al. New interaction partners for Nek4.1 and Nek4.2 isoforms: From the DNA damage response to RNA splicing. **Proteome Science**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015.
- [5] MELO HANCHUK, T. D. et al. Nek5 interacts with mitochondrial proteins and interferes negatively in mitochondrial mediated cell death and respiration. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 6, p. 1168–1177, 2015.
- [6] PROSSER, S. L. et al. Nek5 promotes centrosome integrity in interphase and loss of centrosome cohesion in mitosis. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 3, p. 339–348, 2015.
- [7] SHIMIZU, K.; SAWASAKI, T. Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. **FEBS Letters**, v. 587, n. 14, p. 2219–2225, 2013
- [8] MELO-HANCHUK, T. D. et al. NEK5 interacts with topoisomerase II β and is involved in the DNA damage response induced by etoposide. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 16853–16866, 2019.
- [9] KASOF, G. M.; GOYAL, L.; WHITE, E. Btf, a Novel Death-Promoting Transcriptional Repressor That Interacts with Bcl-2-Related Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 6, p. 4390–4404, 1999.
- [10] LEE, Y. Y. et al. BCLAF1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in γ H2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2012.
- [11] SAVAGE, K. I. et al. Identification of a BRCA1-mRNA Splicing Complex Required for Efficient DNA Repair and Maintenance of Genomic Stability. **Molecular Cell**, v. 54, n. 3, p. 445–459, 2014.
- [12] STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Caspases - Controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 299–306, 2000.