



CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS NEK4 E NEK11 DE *HOMO SAPIENS*

Autores/as: IAGO BRETAS RIGHI (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS) Orientador:
Prof. Dr. Jorg Köbarg (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS) Co-orientador: FERNANDA
LUIZA BASEI (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Palavras-Chave: Câncer, Sinalização, Mitose

1. INTRODUÇÃO

As proteínas da família NIMA (never-in-mitosis gene A) foram descritas inicialmente em *Aspergillus* com função na regulação do ciclo celular e na entrada da célula em mitose (MORRIS, 1976, BERGEN; UPSHALL e MORRIS, 1984). A partir desta descoberta, uma família de serina-treonina cinases similares à NIMA, as NEKs (NIMA-related kinase), passaram a ser identificadas em diversos organismos, sendo em humanos, categorizadas de NEK1 a NEK11, o que iniciou uma série de estudos acerca da função dessas proteínas. As NEKs tornaram-se um alvo interessante de estudo para o entendimento da progressão normal do ciclo celular e resposta ao estresse genotóxico, ou seja, decorrente de agentes químicos ou físicos capazes de provocar dano em dupla fita de DNA ou DNA mitocondrial (MONIZ, et al, 2011). A semelhança interessante entre as NEKs humanas é uma sequência His-Arg-Asp (HRD) no domínio catalítico, que caracteriza cinases reguladas positivamente por fosforilação, tornando-as um alvo interessante para estudo de mutações que levam a doenças do ciclo celular (MONIZ, et al, 2011).

Como as NEKs estão associadas a etapas importantes do ciclo celular e em funções celulares essenciais, erros no processo ou mutações nessas proteínas podem acarretar diversas doenças no organismo, como visto na **Figura 2**.

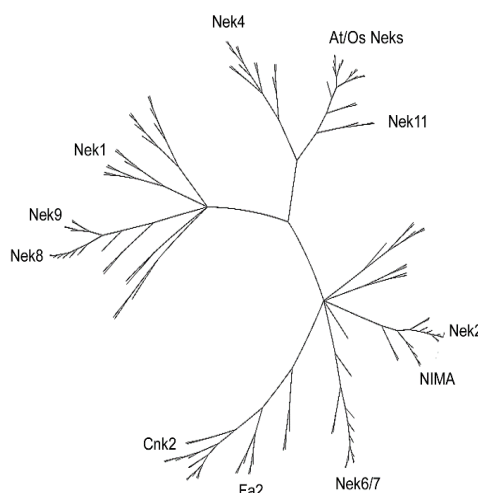


Figura 1 - Árvore filogenética de NEKs de diferentes espécies. (extraída de Parker et al, 2007)

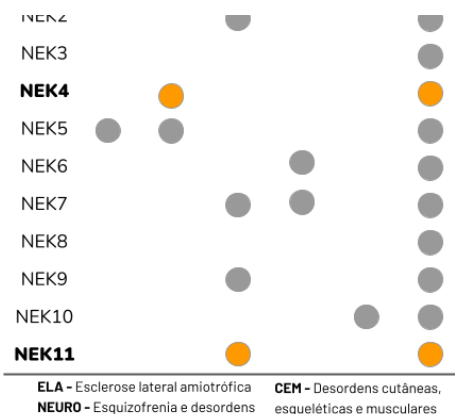


Figura 2- Relação das NEKs com doenças.

Ainda que haja associação às doenças na figura, ainda são necessários mais estudos com essas proteínas a fim de entender quais mecanismos de regulação do ciclo celular e cilogênese, de reparo ao dano no DNA, função mitocondrial, entre outros, são associadas a patologias como câncer e demais doenças.

As família de NEKs é composta por muitas proteínas diferentes, com diversas isoformas multifuncionais para cada uma delas, estudos descritivos de sua função, estrutura, parceiros de interação e suas implicações em condições patológicas, quando expressas em células, por isso, se fazem necessários para que as NEKs sejam consideradas como alvos terapêuticos promissores. Quando focamos nas NEKs 4 e 11, surge a hipótese de ambas interagirem entre si, baseada no fato de que ambas as proteínas se localizam no núcleo celular em possíveis focos de reparo a dano em DNA na presença de agente estressor genotóxico.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral é avaliar se ocorre e como se dá a interação das proteínas humanas NEK4.1 e NEK11.1 em resposta ao dano em DNA na presença de radiação UV, bem como sua possível função no reparo do dano.

Como objetivos específicos, o escopo do projeto foi:

- Analisar a co-purificação de NEK4 e NEK11.1 na presença de estressor genotóxico de DNA (radiação UV 60 J/m²) em linhagens de HEK293 e HeLa, em expressão transiente e linhagens estáveis;
- Gerar *knockouts* de NEK11 em linhagem celular de HEK293 para avaliar o seu comportamento, incorporando ao acervo do grupo;
- Obter possíveis interatores de NEK11 em condições normais e em dano de DNA por radiação UV por espectrometria de massas;
- Analisar a presença de sinais de localização nuclear e citosólicas da NEK4 e NEK11 utilizando-se de técnicas de imunofluorescência e ensaios de PLA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Construções dos *primers* para *knockout* e clonagem

Para o desenho dos RNAs guia para geração das células knockout utilizou-se a ferramenta de análise CRISPOR, e a ferramenta BLAST para identificar os sítios *offtarget* alvos mais adequados de cada sequência alvo. Foram selecionadas sequências de 20 bases anteriores à uma sequência NGG de NEK11_human, isoforma 1 (NM_024800.5), extraídos de bases de dados de com sequências de DNA como NCBI e UniProt. Adicionou-se sítio para enzima a BbSI (NEB #R0539) para permitir a clonagem no vetor de interesse.

Seleção das colônias

Foram utilizadas para a transfecção, células HEK293T em placas com meio DMEM SFB 10%. Foi utilizado 2 µg dos plasmídeos transfectados com PEI (1 mg/mL) diluídos em NaCl. Para controle da transfecção paralelamente aos plasmídeos de interesse utilizou-se o vetor para expressão de GFP. Após uma semana de seleção com Puomicina 1 µg/mL, antibiótico de seleção do vetor px459, em placa e posterior passagem para garrafa em meio DMEM SFB 10%. As células foram para realização do single-cell em placa de 96 poços.

Cultivo de linhagens celulares

Foram utilizadas as células HEK293T, HEK293 FlpIn (linhagem com superexpressão estável, clones 5 e 7), HeLa, e U2OS, cultivadas em meio DMEM SFB 10%. As células foram aclimatadas em placas de cultura em estufa com atmosfera controlada. O meio foi trocado em média duas vezes por semana. Para as transfecções, as células foram semeadas em placa de cultura e mantidas até atingirem confluência de 60-80%.

Microscopia de imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência foram utilizadas as células HeLa que foram semeadas em lamínulas e fixadas com metanol gelado por 10 min a -20°C e depois incubadas com solução de permeabilização/bloqueio PBS-T/BSA. Passado esse período, estas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio por 1h à temperatura ambiente. Após esse período e lavagens com PBS, elas foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos em solução de bloqueio por 20 min a temperatura ambiente e protegidos da luz. O DNA foi marcado com HOECHST 3342. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e as lâminas foram montadas com o *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) protegidas da luz, e então as lâminas foram montadas com o *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen).

Ensaio Duolink PLA

Ensaio feito em placa própria para leitura com 384 poços com fundo de vidro. Ainda, para essa linhagem podemos utilizar o controle biológico com redução da expressão da NEK4 (PLKO shRNA96 para NEK4). As células foram fixadas com solução de formalina e após a fixação realizou-se bloqueio com solução glicina. Para a permeabilização foi utilizada solução de Triton 100X em PBS. O protocolo prevê 6 etapas posteriores, sendo elas: bloqueio, incubação anticorpo primário, incubação com sonda Duolink® PLA, ligação, amplificação e lavagem final. O bloqueio é feito com solução de comercial Duolink® por 30 minutos à 37°C (todas as incubações à 37° foram feitas em câmara úmida). Após incubação com anticorpo primário, foram realizadas lavagens com solução de TBS-T à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários conjugados a fita de DNA negativa e positiva foram diluídos e incubados à 37°C em câmara úmida. Após lavagem com TBS-T adicionou-se a solução de ligação e realizou-se uma nova incubação à 37°C , por fim, adicionou-se a solução contendo a polimerase, e a amplificação ocorreu por 100 minutos à 37°C . Por fim, adicionou-se HOECHST para corar núcleo.

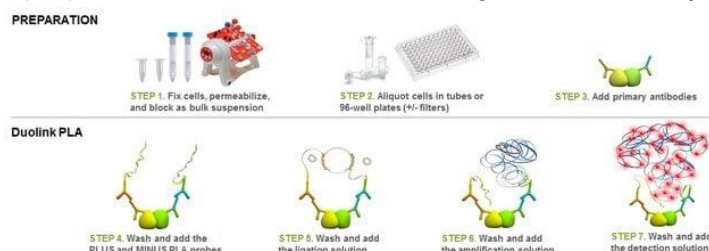


Figura 3 - Esquema ensaio Duo-link PLA (obtida do Catálogo Sigma – disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/duo940N4>>)

Co-imunoprecipitação

Para o ensaio de co-imunoprecipitação (IP) de NEK4 e NEK11, foram utilizadas culturas de HEK293 após 24h de transfecção com plasmídeos de *Flag-NEK11* e *NEK4-GFP*.

As células foram coletadas com PBS e centrifugadas à temperatura ambiente. A lise por sonicação foi realizada em tampão de lise (0,1% NP-40 em 1x PBS e 1X inibidor de protease cOmplete, Roche). O lisado foi centrifugado e o sobrenadante incubado com *beads* conjugadas com anticorpo anti-*Flag* (M2) (Sigma-Aldrich) por 1 hora sob rotação em câmara fria. Previamente à incubação as *beads* foram lavadas 3x com PBS-NP 40 gelado e centrifugadas a 4°C . Após 3 lavagens com mesmo volume de tampão de lise, as amostras foram eluídas em 20 μL de SDS 10% à temperatura ambiente. Ao final, também foi adicionado tampão Laemmli a de lisado e ao eluído, que foram fervidos por 5 minutos. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% e, em seguida, a *Western blot* usando anticorpos anti-*Flag* e anti-NEK4.

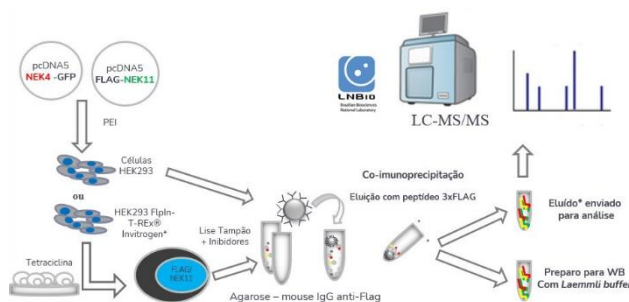


Figura 4- Esquema da Co-Imunoprecipitação

Separação eletroforética e Western blotting

Nos experimentos de eletroforese pelo método SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foram utilizados gel de entrada de 4% e gel de separação 10%

de poliacrilamida. Para a corrida, foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%) e tensão de 100V por 90 minutos. As proteínas separadas por *SDS-PAGE* foram transferidas para uma membrana de polivinildifluoridina (PVDF).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realização do desenho de *primers*, seleção dos guides para *knockout* e transfecção, não obtivemos células viáveis nas placas, mesmo com a transfecção tendo apresentado eficácia. A provável causa foi na questão do *single-cell*.

As primeiras tentativas de imunoprecipitação com superexpressão em células transiente das proteínas NEK4.1 e NEK11.1 esperava-se isolar NEK11 e observar a interação com NEK4, porém o controle de Flag-NEK11 não apresentou marcação na IP. Com a falta de sucesso na primeira tentativa, surgiu a possibilidade de realizar testes com linhagens estáveis com expressão da NEK11 induzida por tetraciclina. Essa tentativa já se mostrou mais eficaz, que apresentou resultados mais consistentes entre os blots com anti-Flag e anti-NEK4 e percebeu-se que com 24h a expressão já seria suficiente para os experimentos de imunoprecipitação e fluorescência. Nos experimentos de superexpressão em linhagens estáveis, percebeu-se que a maior expressão de

NEK4 encontra-se nas amostras induzidas com tetraciclina após 24h e 48h, indicando que a elevação de NEK11 também causa uma elevação em NEK4 nas primeiras 48h. Das linhagens disponíveis, o clone 5 com 24h de expressão induzida por tetraciclina foi escolhido para seguimento com os demais experimentos.

Escolhido o clone 5, foram realizados experimentos de superexpressão das proteínas em cultura tratada com tetraciclina e irradiada com UV. Os resultados foram positivos para NEK11 na amostra da IP eluída no *Western-Blot*. O gel de prata, com as mesmas amostras, confirmou a presença de NEK11 na amostra de IP para NEK11 e NEK11 UV, comprovando a eficácia da IP e da presença dela na amostra com UV. O que se observou foi o aumento de NEK11 após UV e redução em NEK4, (não consistente em todas as amostras) e levantou-se a hipótese de mecanismos regulatórios entre NEK4 e NEK11 (feedback negativo).

Para os ensaios de co-localização de imunofluorescência, as células HeLa marcadas com anti-NEK4 e anti-NEK11 apresentaram resultado positivo, com pontos de co-localização que se mostram sobrepostos na **Figura 7**. Os pontos foram obtidos por uma linha traçada no citosol e conseguiu-se o histograma com picos de sinal com *software* ImageJ). Ambas se encontram no núcleo, porém não foi perceptível sua co-localização nele.

Por fim, pode-se afirmar que o protocolo do PLA funcionou de maneira satisfatória. Os controles técnicos (only Mfn1 e only sec) e os controles biológicos (siRNA NEK11 e shRNA NEK4) apresentaram resultado esperado siCTR e PLKO mais pontos que silenciamentos para NEK4 e NEK11. A maior concentração de pontos vermelhos encontra-se no núcleo, evidenciado por DAPI (azul) na **figura 8**. Por se tratar de um experimento com maior precisão pela pequena distância, esperava-se encontrar menos pontos nos controles biológicos, indicando prováveis interações mais específicas, o que se confirmou pelo gráfico.

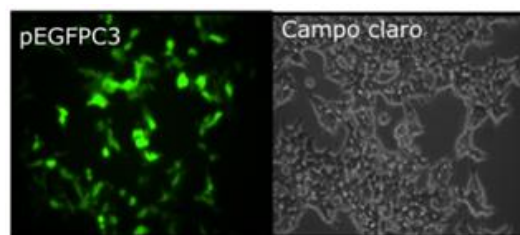


Figura 6 - Eficiência da transfecção para geração das células NEK11 knockout indiretamente indicada pela expressão do GFP.

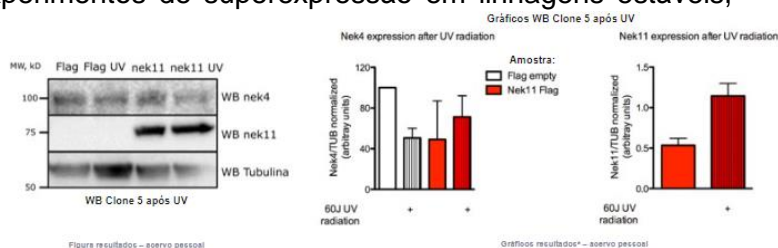


Figura 5 - Western Blot e Gráficos referentes à células com expressão da NEK4 e NEK11 em linhagem com UV

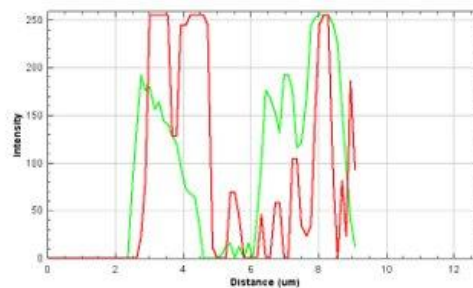


Figura 7- Gráfico de sinal de co-localização em HeLa para NEK4 e NEK11

Os sinais positivos de PLA indicam que NEK4 e NEK11 se localizam a menos de 40 nm de distância em diversas regiões na célula. Através do ensaio de co-localização de NEK4 e NEK11 em HeLa, foi percebido diversos pontos no citosol, porém com este experimento é possível perceber mais pontos em que elas se encontram próximas também no núcleo. A diferença entre a localização da interação pode ser relacionada a linhagem celular. Estudos de localização com U2OS ou PLA com HeLa devem ser realizados para determinar se esse comportamento é célula-dependente. A distribuição estatística dos dados também indica que há suficiência estatística para afirmar a hipótese.

5. CONCLUSÃO

Conseguiu-se gerar vetores de *knockout*, porém ainda sem clones viáveis. Com as quantidades utilizadas e pelos controles não é possível afirmar que NEK4 e NEK11 não interajam pela IP, como pensado anteriormente. Porém, em condições endógenas pelo PLA as proteínas interagem (NEK4 e NEK11) no núcleo. Deve haver um mecanismo de feedback entre NEK4 e NEK11 regulada negativamente por NEK11, e NEK4 e NEK11 estão no núcleo em situações de dano em DNA e muito provavelmente interagem nessa condição.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda para futuros experimentos de interação entre NEK4 e NEK11, se faz necessário explorar os vetores gerados de knockout de NEK11 e obter linhagens celulares de clones viáveis para essa supressão, confrontando com os resultados expressando NEK4. Ademais, experimentos explorando respiração mitocondrial e fisiologia celular também se mostram interessantes, para avaliação da interação de NEK4 e NEK11 nessa organela. Além disso, a realização de repetições dos experimentos de Co-imunoprecipitação com outros controles biológicos para avaliação da interação via tags. Também, há de se realizar outro ensaio PLA com radiação UV em outras culturas celulares para observações do padrão, pois os resultados se mostram interessantes para pesquisas futuras. Por fim, a obtenção do interactoma de NEK11 pelo experimento de espectrometria de massas seria a chave final para a compreensão da interação entre as proteínas alvo NEK4 e NEK11, através da rede de proteínas que interagem com a NEK11.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGEN, L. G.; UPSHALL, A.; MORRIS, N. R. S-phase, G2, and nuclear division mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, v. 159, n. 1, p. 114-119, 1984. Morris, N. R. A temperature-sensitive mutant of *Aspergillus nidulans* reversibly blocked in nuclear division. *Exp Cell Res*, v. 98, n. 1, p. 204-10, 1976.
2. MONIZ, Larissa et al. NEK family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. *Cell division*, v. 6, p. 1-10, 2011.
3. PARKER, Jeremy DK et al. Phylogenetic analysis of the NEKs reveals early diversification of ciliary-cell cycle kinases. *PloS one*, v. 2, n. 10, p. e1076, 2007.
4. BASEI, Fernanda Luisa et al. NEK4 regulates mitochondrial respiration and morphology. *The FEBS Journal*, v. 289, n. 11, p. 3262-3279, 2022.
5. BASEI, Fernanda Luisa 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.
6. PAVAN, Isadora Carolina Betim et al. On broken Ne (c) ks and broken DNA: the role of human NEKs in the DNA damage response. *Cells*, v. 10, n. 3, p. 507, 2021.

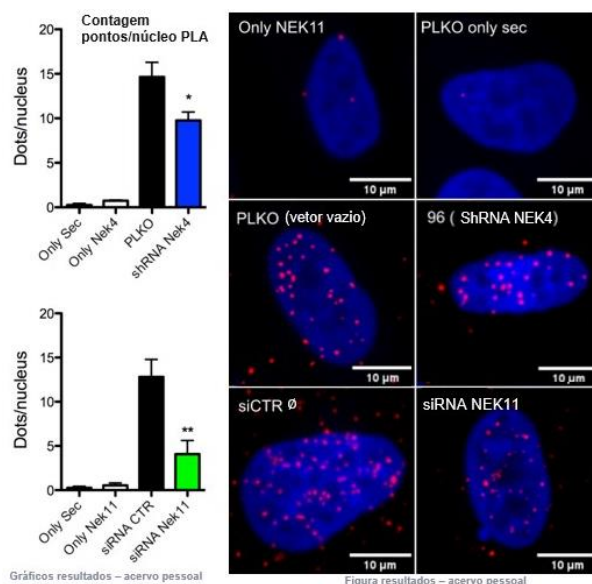


Figura 8 - Gráfico de sinal de co-localização em HeLa para NEK4 e NEK11