



CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE NEK8 ENCONTRADAS EM CÂNCER

Palavras-Chave: Câncer, mutação, quinases, sinalização.

Autores/as:

Kauany de Oliveira Ferreira [FCF- UNICAMP]

Prof. Dr.º Jorg Kobarg (orientador) [FCF- UNICAMP]

Doutorando Ms. Pedro Rafael Firmino Dias (co-orientador) [FCF-UNICAMP]

INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estudos apontam que o câncer consiste de uma patologia que surge a partir de mutações gênicas, que ocasionam o processo de mitose desordenada da célula¹. O a célula tumoral possui um conjunto de características, os quais denominados “Hallmarks of Cancer” dentre eles tem-se a condição de induzir a angiogênese, invasão, metástase, imortalidade replicativa, resistência à morte celular, indução e sustentação de fatores de crescimento, bem como, manutenção de sinais proliferativos³.

A fase mitótica é um processo essencial no ciclo celular, na qual ocorre a divisão celular por meio de uma reorganização na estrutura das células. Para garantir uma divisão precisa, diversas proteínas atuam regulando esse processo para evitar falhas. Entre elas, destacam-se as ciclinas, CDKs (Cyclin Dependent Kinases) e as NEKs (NIMA related kinases). Desse modo, as Neks é uma família de serina/treonina quinases responsáveis pela regulação da mitose celular, ciliogênese, manutenção do genoma e recentemente estão sendo desvendados papéis no metabolismo e homeostase mitocondrial⁴.

Até o momento foram identificadas 11 proteínas quinases pertencentes à família das NEKs em humanos. A proteína NEK8, alvo deste trabalho, é composta por 692 aminoácidos e apresenta uma estrutura com dois domínios distintos. Em sua porção N-terminal, encontra-se um domínio catalítico conhecido como domínio quinase. Já em seu extremo C-terminal, possui domínios RCC1 (Regulador da condensação cromossômica 1), que estão diretamente associados à sua localização no centróssomo⁵. Mutações missenses em NEK8 podem induzir defeitos no reparo de DNA e aumento de apoptose⁴, em especial, tem-se que o processo de mutação em NEK8 pode alterar uma das atividades principais desta kinase, que consiste no processo de ciliogênese, especificamente na regulação da formação do cílio primário². Com isso, esse trabalho consistiu em verificar através de ferramentas *in silico* quais mutações pontuais somáticas na sequência gênica do domínio quinase da NEK8 encontradas em câncer humano disponibilizadas no banco de dados COSMIC possuem predição de perda de função, patogenicidade e risco de câncer, gerar estas mutações no domínio quinase clonado em vetores de expressão em células de mamíferos e identificar quais causam alterações na sua função e localização celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise *In Silico*

Analisamos dentro da sequência de aminoácidos da NEK8 humana o nível de conservação dos resíduos (servidor ConSurf), predições de função e domínios (servidor SMART), sítios (servidor ELM), estruturas secundárias (PDBSum) e sítios de modificação pós-traducional (Phospho Site database). Posteriormente analisamos todas as mutações de nucleotídeos simples da sequência gênica da NEK8 que estão localizadas no domínio quinase encontradas na plataforma COSMIC para inferir alterações na função (servidores Provean, SIFT, SNAP 2, PolyPhen 2 e FATHMM_MKL), predição de patogenicidade (servidores MutPred 2, PMUT e SUSPECT) e predição de risco de câncer (servidor CScape). A partir das análises, foram selecionadas as seguintes mutantes: E51K; G86S; G149S; G165S; E195K; R246W, onde possuem alta predição de alteração de função, patogenicidade e de risco de câncer.

2. Mutagênese Sítio Dirigida

De acordo com todas as análises realizadas no modelo *in silico*, foi feita a mutagênese sítio dirigida. O protocolo foi realizado através de reações de PCR com os seguintes componentes: 5 µL do 10x reaction buffer, 50 ng do plasmídeo molde (FLAG-NEK8 domínio quinase) e 125 ng do primer forward e 125 ng do primer reverse (nos quais contém a sequência de mutação de interesse citadas acima), 1 µL of dNTP mix e ddH₂O livre de nucleases até o volume final de 50 µL onde por fim, foi adicionado 1 µL do Pfu Ultra HF DNA polymerase (2.5 U/µL). As reações foram realizadas no termociclador na seguinte configuração: aquecimento inicial de 5 minutos a 95°C com repetição de 18 ciclos com 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 10 minutos a 72°C, com extensão final de 60 minutos a 72°C. As reações foram digeridas com DpnI, transformadas em *E. coli* termo-competentes e as colônias formadas foram removidas para isolamento dos plasmídeos e posterior sequenciamento para confirmação da mutação.

Dentre as mutações pretendidas, conseguimos gerar as mutantes G149S e E195K com apenas a alteração do nucleotídeo pretendido, no qual foram confirmadas por sequenciamento de Sanger, como mostradas na tabela a seguir. Dessa forma, conclui-se que as mutações selecionadas para o seguimento da experimentação foram o clone 2 da G149S e os clones 1 e 2 da mutante E195K. Realizamos a modelagem comparativa das mutações de NEK8 selecionadas (G149S e E195K) no domínio kinase com o domínio kinase da NEK8WT, como mostradas na figura 1, e identificamos que uma das mutações está localizada no looping de ativação (G149S) e a segunda em uma alfa hélice do lobo C (E195K) da NEK8.

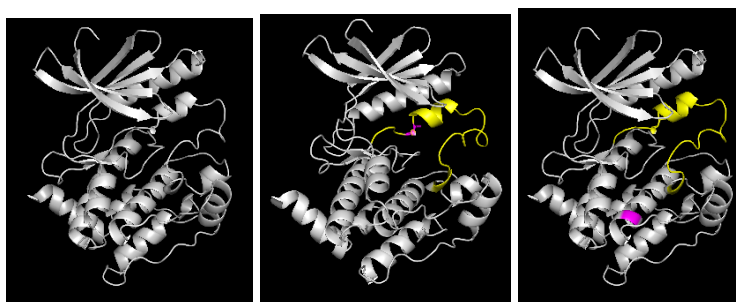


Figura 1. Estrutura tridimensional do domínio kinase da Nek8 previsto pelo AlphaFold2 (à esquerda); Estrutura tridimensional com marcações nas localização da mutação G149S e E195K (em rosa), respectivamente, com a marcação do looping de ativação (em amarelo), o qual predição feita é pelo software PyMol.

Mutação	Troca da base	Confirmação pelo Sequenciamento de Sanger
G149S	g > a	<p>NEK8 WT :AAGATCGGTGATTTGGCATCTCCAAGATCCT</p> <p>G149S (clone 1) :AAGATCGGTGAATTTCAGCATCTCCAAGATCCT</p> <p>G149S (clone 2) :AAGATCGGTGATTTGAGCATCTCCAAGATCCT</p>
G165S	g > a	<p>NEK8 WT GGTGGGTACCCCATGCTATATC</p> <p>G165S GGTGAGTACCCCAATGCTATATC</p>
E195K	g > a	<p>NEK8 WT TCCTCTACGAGCTGGCCAGCCTCA</p> <p>E195K (clone 1) TCCTCTACGAGCTGGCCAGCCTCA</p> <p>E195K (clone 2) TCCTCTACGAGCTGGCCAGCCTCA</p>
R246W	c > t	não obteve sucesso no sequenciamento

3. Transfecção, Imunoprecipitação e Western blot

Algumas quinases possuem a capacidade de auto-ativação, sendo a NEK8 capaz de se auto-ativar. A análise de ativação por fosforilação é possível através da mudança na migração da proteína no SDS-PAGE onde as proteínas fosforiladas apresentam uma migração mais lenta quando comparada com a forma desfosforilada. Sendo assim, realizamos a expressão da FLAG-vazio (controle), FLAG-NEK8 KD WT (domínio quinase wild type), FLAG-NEK8 KD G149S, FLAG-NEK8 KD E195K 1 e FLAG-NEK8 KD E195K 2, imunoprecipitação e western blot para identificar mudança na migração das construções no SDS-PAGE e identificar se as mutações causam ativação ou inibição da auto-ativação.

Sendo assim, células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino em placas de cultura de 60 mm em estufa com atmosfera controlada úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após as células atingirem uma confluência de 70-80% foi realizado o processo de transfecção dos vetores com Flag-vazio; FLAG-NEK8 WT; FLAG-NEK8 G149S; FLAG-NEK8 E195K 1 e FLAG-NEK8 E195K 2. O processo de transfecção consistiu na incubação das células em novo meio de cultura, e preparou-se o DNA a ser transfectado juntamente com o agente carreador PEI com PBS. Vale ressaltar que as transfecções são um passo anterior aos ensaios de imunoprecipitação. Após a transfecção, as células foram coletadas através de tripsinização e centrifugadas a 450 Xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Desse modo, realizou-se o processo de lise por sonicação (10x, sendo 1s ligado e 5 segundos desligados em potência de 20%) em 500 uL de tampão TRIS (Tris-Cl 50 mmol pH 7,5, NaCl 137 mmol, NP40 1%), nas células transfectadas. Após a sonicação, foi realizada a centrifugação das amostras por 10 minutos a 10.000g a 4°C. O processo de imunoprecipitação consistiu em remover aproximadamente 500 uL do sobrenadante do lisado e destinar 60 uL para lisado total (LT) e 400 uL

para imunoprecipitação onde foi adicionado 50 uL de beads conjugadas com anticorpo anti-FLAG, e incubado por aproximadamente 4h na geladeira sob agitação. Após a incubação, o volume de 400 uL foi removido (flow through - FT), as beads lavadas no tampão de TRIS com posterior incubação com 20 uL de SDS 10% (eluído - IP) e após remover o eluído foi adicionado 20µL de tampão Laemmli nas beads (BD). Adicionamos Laemmli nas amostras de LT, FT e IP, e juntamente com as BD foram fervidos (95°C) por 5 minutos. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de 15% e, em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-FLAG.

Como as construções são apenas do domínio quinase da NEK8, esperamos identificar sinal na altura entre 37 e 25 kDa, uma vez que este domínio possui aproximadamente 30 kDa. Foram observadas (Figura 2.) bandas nas frações das beads em FLAG-NEK8 WT, FLAG-NEK8 G149S, FLAG-NEK8 E195K 1 e FLAG-NEK8 E195K 2. Aparentemente, observou-se que a banda da Flag NEK8 G149S migrou mais lentamente (possui um arraste da banda para cima) quando comparada às mutações (E195K 1 e 2) e FLAG-NEK8 WT, isso nos dá um indicativo que possivelmente a mutação na glicina 149 possa levar a uma maior ativação da NEK8, devido a G149 pertencer ao looping de ativação. Já a FLAG-NEK8 E195K aparentemente apresentou uma migração mais rápida, podendo indicar que essa mutação reduz a auto-ativação da NEK8.

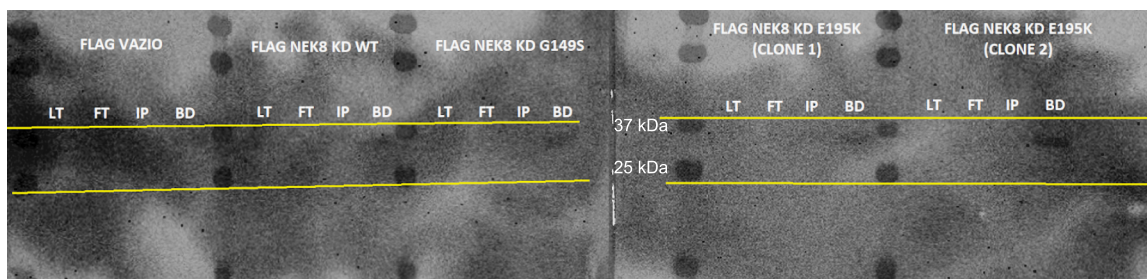


Figura 2. Western Blot identificando as bandas na fração das beads em FlagØ; FlagNek8WT; G149S; E195K1 e E195K2.

Próximos experimentos:

Já foi descrita a importância da função da NEK8 em diversos processos como integridade do genoma, ciclo celular e progressão do câncer de mama, ciliogênese e sua relação com ciliopatias. Uma das formas de analisar o processo de ciliogênese é através da remoção do soro fetal bovino (FBS) do meio de cultivo celular. Dessa forma, realizamos a transfecção em FLAG-vazio, FLAG-NEK8 WT, FLAG-NEK8 G149S, FLAG-NEK8 E195K 1 e FLAG-NEK8 E195K 2 por 24h na presença de FBS e posteriormente removemos o FBS do meio e mantivemos as células transfectadas em cultivo por 24, 48 e 72hs (Figura 4.) com as coletas das células e imagens de campo claro realizadas em cada ponto, como indicados na figura a seguir:

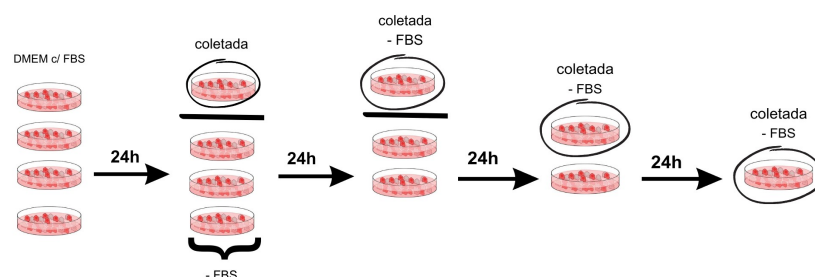


Figura 3. Foram feitas essa esquematização para cada condição, sendo elas FlagØ; FlagNek8WT; G149S; E195K1 e E195K2, totalizando 20 placas analisadas.

Sob condição de 72h sem FBS ([ImagensTransfecção.xlsx](#)), observou-se comparativamente que Flag Vazio e Flag NEK8 E195K (clone 1 e 2) houve maior desprendimento de células HEK293T e, um maior número de células com morfologia apoptótica. Em contrapartida, as células HEK293T transfectadas com Flag NEK8 KD WT e Flag NEK8 G149S levaram a um menor desprendimento e uma menor quantidade de células com morfologia apoptótica.

A partir da experimentação, iremos analisar a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, integridade do genoma e ciliogênese através do western blot do lisado total das células transfectadas para confirmar se as mutações alteram a sinalização celular em que a NEK8 está envolvida e identificar se estas mutações são de fato de ativação e inibição da atividade do domínio quinase da NEK8. Analisaremos proteínas como a ciclina D1, ciclina B1, CDK4, CDK2, survivina e beta-catenina⁶; tubulina acetilada⁵ e γ -H2AX⁷.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos especulamos que, as mutações preditas pelo COSMIC (banco de dados de amostras tumorais sequenciadas de pacientes humanos) demonstraram que pode haver mutações que apresentem ganho e perda de função. Sob perspectivas futuras, as mutações podem ser utilizadas tanto para diagnósticos mais precisos, como para possíveis tratamentos mais seletivos.

BIBLIOGRAFIA

1. BARRETO, Eliana Maria Teixeira. Acontecimentos que fizeram a história da oncologia no Brasil: Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Revista brasileira de cancerologia*, v. 51, n. 3, p. 267-275, 2005.
2. BETTENCOURT-DIAS. M., HILDEBRANDT. F., Pellman D., Woods G., Godinho S. A. (2011). Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.* 27, 307–315.
2. BOWERS, Alex J.; BOYLAN, John F. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*, v. 328, p. 135-142, 2004.
3. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
6. HOLLAND, Pamela M. et al. Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 18, p. 16229-16240, 2002.
7. MONIZ, Larissa et al. "Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer." *Cell division* vol. 6 18. 31 Oct. 2011, doi:10.1186/1747-1028-6-18.
4. OSMANI, Stephen A.; MAY, Gregory S.; MORRIS, N. Ronald. Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of cell biology*, v. 104, n. 6, p. 1495-1504, 1987.
5. Zalli D, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis. *Hum Mol Genet.* 2012;21(5):1155-1171.
6. Kang, E., Kim, HK., Lee, HB. *et al.* Nunca na mitose a quinase-8 relacionada ao gene A promove proliferação, migração, invasão e tronco de células de câncer de mama via ativação de sinalização β -catenina. *Rep Sci* 13, 6829 (2023).
7. Abeyta, Antonio, et al. "NEK8 regulates DNA damage-induced RAD51 foci formation and replication fork protection." *Cell Cycle* 16.4 (2017): 335-347.