

XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp

18 a 20 Outubro Campinas | Brasil



Estudo da relação entre as proteínas Nucleofosmina1 e Nucleolina e as diferentes isoformas de S6Ks

Fernando Riback Silva* (IC), Isadora Carolina Betim Pavan (PG), Ana Paula Morelli (IC), Mariana Rosolen Tavares (PG), Fernando Moreira Simabuco (PQ).

Resumo

A via de sinalização da mTOR vem sendo relacionada a desordens metabólicas em humanos, como a obesidade, diabetes e vários tipos de câncer. As proteínas S6K1 e S6K2 têm mostrado importante papel na sinalização da mTOR, funcionando como efetoras dessa via. Em estudos anteriores de nosso grupo, foram identificadas novas proteínas de interação com as S6Ks, dentre estas a Nucleofosmina 1 (NPM1) e a Nucleolina (NCL). Tais proteínas estão envolvidas na biogênese de ribossomos, proliferação celular e regulação de supressores tumorais. Portanto, esse estudo investiga a possível relação entre as proteínas NPM1 e NCL com as diferentes isoformas de S6Ks, a fim de entender melhor o envolvimento da via mTOR/S6Ks com desordens metabólicas, com enfoque no câncer.

Palavras-chave:

S6K, Nucleofosmina, Nucleolina.

Introdução

A via da mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) está envolvida em diversas desordens metabólicas, como câncer, obesidade e diabetes. O principal papel da proteína mTOR é servir como um sensor da disponibilidade de nutrientes, já que mTOR é estimulada por altas quantidades de aminoácidos, ATP e insulina¹. A via da mTOR apresenta como sua principal efetora, as proteínas S6Ks (*S6 Kinases*)². Existem dois genes conhecidos das S6Ks que codificam duas proteínas diferentes, chamadas p70-S6K1 e p54-S6K2. Estudos realizados pelo nosso grupo revelam que, apesar da grande homologia entre essas proteínas, existem diferenças significativas nas suas funções, na participação em processos celulares, em seus parceiros de interação³, bem como diferenças na sensibilidade a quimioterápicos, como o docetaxel⁴. As proteínas Nucleofosmina 1 (NPM1) e Nucleolina (NCL) participam da biogênese de ribossomos, proliferação celular e regulação de supressores tumorais, de forma que vários estudos demonstram o envolvimento dessas proteínas em diversos tipos de câncer⁵. Um estudo proteômico de nosso grupo³ demonstrou que NPM1 e NCL apresentam um elevado score de interação com as S6Ks. Sendo assim, o objetivo desse estudo é investigar a interação das proteínas NCL e NPM1 com as diferentes isoformas de S6Ks e, dessa forma, contribuir para o melhor entendimento da via mTOR/S6K em distúrbios metabólicos, com enfoque no câncer.

Resultados e Discussão

Experimentos de imunoprecipitação endógena da NPM1 e NCL foram realizados em células HEK293 e, como resultado, obtivemos a co-imunoprecipitação de S6K1 e S6K2. Interessantemente, a interação de S6K1 foi reduzida na ausência de soro, fato este que não ocorreu para S6K2. Além disso, outros experimentos de imunoprecipitação mostraram que NCL pode ser fosforilada no sítio predito de fosforilação das S6Ks. *Knockdown* com o plasmídeo shRNA para NPM1 foi realizado em células HEK293, PC3 e DU145, sendo avaliado a fosforilação de S6K1 e S6 por

Immunoblotting. Como resultado, obtivemos que em linhagens células de câncer (PC3 e DU145), a fosforilação de S6 foi reduzida em ambas as linhagens celulares e S6K1 foi reduzida para PC3 (Figura 1). Curiosamente os resultados obtidos em HEK293 foram contrários aos obtidos em DU145 e PC3.

Para corroborar os dados desse resultado, a superexpressão de NPM1 foi realizada nessas mesmas linhagens celulares e, conforme esperado, os resultados foram contrários aos vistos com *knockdown*.

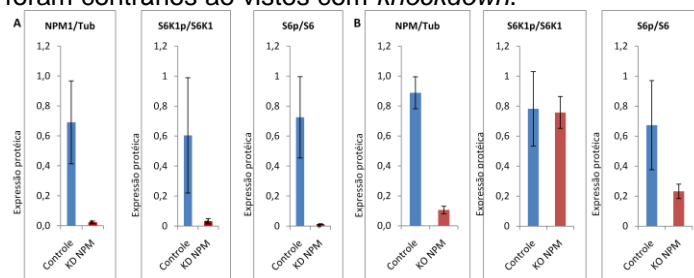


FIGURA 1. *Knockdown* de NPM1 em células PC3 e DU145. A) e B) Gráficos mostrando as diferentes expressões de NPM1 e os níveis de fosforilação de S6K1 e S6 sendo A) em PC3 e B) em DU145. As médias foram comparadas pelo teste t de Student não pareado $n = 3 * p < 0,05$.

Conclusões

Os resultados de imunoprecipitação confirmam a interação de NPM1 e NCL com as isoformas de S6Ks. Os resultados com o *knockdown* indicam que a relação de NPM1 com as S6Ks é dependente do tipo celular, evidenciando uma interação diferenciada dessa proteína em linhagens derivadas de câncer de próstata (PC3 e DU145). Além disso, demonstramos evidências de que a NCL pode ser um novo alvo de fosforilação das S6Ks. Novos experimentos serão realizados para elucidar melhor a importância da interação dessas proteínas.

Agradecimentos

PIBIC-CNPq e FAPESP

¹Magnuson B, et al. *Biochem J*;441(1):1-21. 2012
²Dann, S. G.; Selvaraj, A.; Thomas, G. *Trends Mol. Med*.2007; 13: 252–259.
³Pavan, I.C, et al. *Proteomics*. 2016 Oct;16(20):2650-2666.
⁴Amaral C.L, et AL. *BMC Cancer*. 2016 Aug 5;16:602.
⁵Nalabothula, N, et al. *Mol Cell Pharmacol*. 2010; 2: 179–189.