

# GERAÇÃO DE FERRAMENTAS PARA ESTUDO DA NEK11 NO CONTEXTO DE RESPOSTA A DANOS DE DNA

**Palavras-Chave:** Nek11, clonagem, Bio-ID, células FlpIn, UVC

**Autores(as):**

**VICTOR DA CRUZ FERREIRA, FCF - UNICAMP**

**IAGO BRETAS RIGHI, FCF – UNICAMP**

**Orientador:** Prof. Dr. JÖRG KOBARG, FCF - UNICAMP

**Co-orientador:** Dra. FERNANDA LUISA BASEI, FCF - UNICAMP

## 1 INTRODUÇÃO

A Nek11 é uma quinase humana, descrita pela primeira vez em 2002 <sup>[1]</sup>. Ela possui um domínio N-terminal catalítico e um domínio C-terminal regulatório, e pode ser expressa como quatro possíveis isoformas descritas: Nek11C, Nek11S, Nek11L e Nek11D, que diferem pelo domínio C-terminal não catalítico <sup>[2]</sup>. A Nek11 apresenta localização difusa, mas, pode concentrar-se no nucleoplasma, frequentemente associada a centrossomos e ao fuso mitótico durante a divisão celular, com maior expressão nas fases S e G2/M <sup>[1]</sup>. Sua função principal está ligada à resposta ao reparo de danos de DNA, especialmente nos *checkpoints* G2/M do ciclo celular, regulando fatores da via ATM/ATR e mediando a degradação da proteína CDC25A após ser fosforilada por CHK1 <sup>[3]</sup>. Além dessa função, a Nek11 pode estar envolvida na regulação da divisão celular assimétrica durante a maturação de oócitos, uma função identificada apenas em camundongos <sup>[4]</sup>. Há também evidências sugerindo que a Nek11 possa ter um papel no desenvolvimento de cânceres como cólon, melanoma e ovário. Em todos esses casos, a Nek11 parece desempenhar um papel protetor contra tumores <sup>[5][6]</sup>. Dado seu envolvimento no reparo de DNA e na prevenção de câncer, a Nek11 é considerada um potencial alvo para estudos farmacológicos futuros, porém, pouco se conhece sobre os parceiros de interação ou substratos da Nek11 e entender melhor suas funções e interações com outras proteínas se mostra importante para caracterizar seu papel no desenvolvimento de doenças.

## 2 OBJETIVOS

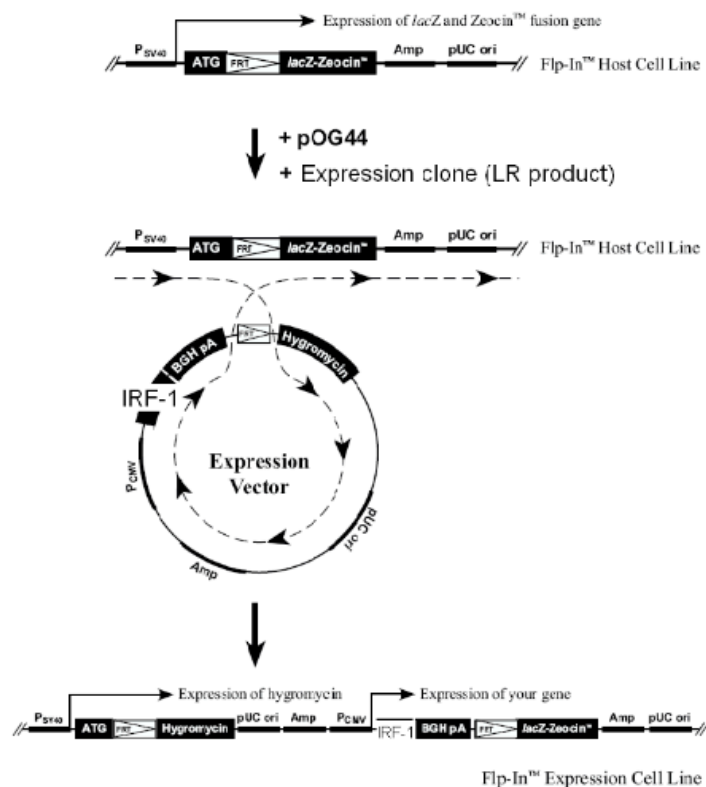
O objetivo é gerar as ferramentas fundamentais para o posterior estudo da Nek11 em relação às suas funções biológicas, como no reparo de DNA, e interações com outras proteínas em células humanas.

## 3 METODOLOGIA

**Clonagem de TurboID em pcDNA5 FRT/TO:** A sequência codificante (CDS) de TurboID (Addgene #124646), uma biotinilase que é utilizada como indicador de proximidade

entre proteínas (Branon et al. (2018) nos estudos de interação BioID, será amplificada e clonada em pcDNA5 FRT/TO que já contém a sequência codificante da Nek11 (isoforma longa, Nek11L). Após confirmação da clonagem por sequenciamento, os vetores pcDNA5 TurboID-Flag e pcDNA5 TurboID-Nek11 serão utilizados para geração de linhagens celulares estáveis e posterior teste de interação entre proteínas com o BioID.

**Geração das linhagens estáveis (sistema FlpIn):** Após confirmar a clonagem por sequenciamento, os vetores pcDNA5 TurboID-Flag e pcDNA5 TurboID-Nek11 serão utilizados para gerar linhagens estáveis para expressão induzível de TurboID fusionado a Flag ou TurboID-Nek11 fusionada a Flag. Usando o sistema Flp-In (Invitrogen™) e a linhagem celular Flp-In™ T-REx™ 293, as células serão co-transfectadas com PEI para inserir os vetores de interesse em combinação com o vetor pOG44, possibilitando a recombinação homóloga. Isso criará um cassete com genes de resistência à higromicina e a proteína de interesse, regulado pelo promotor CMV e operadores Tet2. Na ausência de tetraciclina, o repressor Tet bloqueia a expressão da proteína, enquanto a tetraciclina (0.5 µg/mL por 24h) desativa o repressor, permitindo a expressão controlada da proteína. Abaixo um esquema demonstrando a técnica:



**Figura 1.** diagrama ilustrativo mostrando a clonagem recombinada de um gene de interesse a partir de um vetor de expressão em uma linha celular hospedeira com um sítio de ligação FRT (adaptado de Flp-In System, Invitrogen).

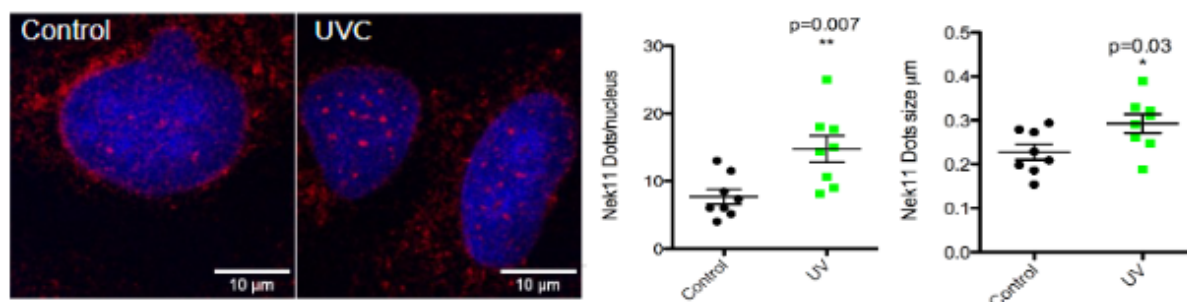
**Teste de imunofluorescência pós UVC para avaliação da Nek11:** Para avaliar o papel da Nek11 em resposta ao dano ao DNA, será utilizada radiação UVC para causar o dano. Para determinar o tempo ótimo de resposta após a irradiação para coleta e análise das células, serão realizados testes para observar a localização celular da Nek11 após o dano. Para este experimento, o meio de cultura será removido e as células serão irradiadas com 60 J/m<sup>2</sup> de UVC. Em seguida, o meio será replicado e as células serão coletadas

0,5h, 1h, 2h e 4h após a irradiação. O tempo com a maior concentração nuclear de Nek11 será determinado por meio de ensaios de imunofluorescência.

**Mutagênese sítio dirigida:** Os experimentos de mutação sítio-dirigida serão realizados utilizando-se o kit QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, a sequência codificadora do DNA para a isoforma longa da Nek11 (Nek11L) será utilizada como molde para gerar mutações frequentemente encontradas em câncer e que determinam trocas importantes de aminoácidos. Essas mutações foram obtidas previamente a partir de análises no banco de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/about>) [7]. Os seguintes mutantes serão gerados: Nek11G184E e Nek11D175G (no domínio quinase), Nek11V364E e Nek11E488V (no domínio regulatório), no vetor pCDNA5/FRT/TO-FLAG. Serão desenhados os oligonucleotídeos iniciadores conforme recomendação do fabricante e, a sequência será amplificada utilizando-se uma enzima DNA polimerase de alta processividade e fidelidade. Após os ciclos de amplificação, o DNA original (não mutado) será removido por tratamento com a enzima DpnI. O DNA amplificado então será utilizado para transformação em bactérias DH5 alfa e após extração será sequenciado para confirmação das mutações.

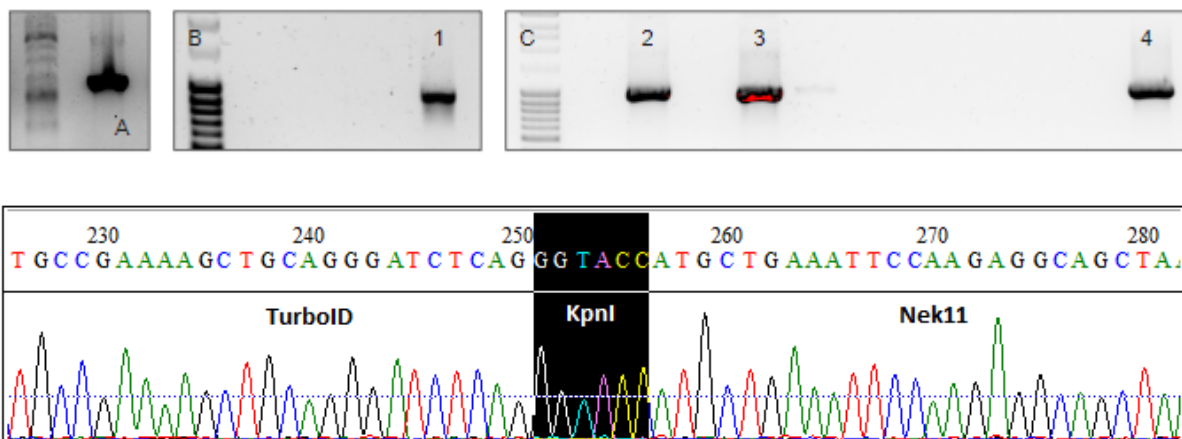
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da imunofluorescência pós UVC indicam que a presença de Nek11 no núcleo aumenta significativamente 2h após a exposição à radiação UV. Essa observação está ilustrada na figura 2 abaixo:



**Figura 2.** Localização celular da Nek11 após radiação UVC. Células U2OS foram irradiadas com 60J/m<sup>2</sup> de UVC e após 2h foram fixadas para realização de imunofluorescência utilizando-se anticorpo rabbit anti Nek11 (HPA016908 1:25) são apresentados em vermelho e o núcleo está representado em azul. UVC: irradiadas, Control: não irradiadas. Os gráficos representam o número e tamanho dos pontos de marcação da Nek11 sem UVC (apresentados em preto) e após irradiação com UV (apresentados em verde). Os pontos de marcação foram contados utilizando-se o software ImageJ. A significância estatística foi obtida através do teste “t” não pareado no programa Prisma 5.

A sequência codificante para a biotilase TurboID foi amplificada com sucesso (Figura 3A) e posteriormente clonada no vetor pcDNA5/FRT/TO FLAG e pcDNA5/FRT/TO Flag-Nek11 utilizando-se os sítios para as enzimas de restrição HindIII e KpnI. A confirmação da clonagem foi realizada com a amplificação de TurboID a partir de PCR de colônia (Figura 3 B e C). Posteriormente, foi realizado o sequenciamento dos vetores para confirmar a inserção correta de TurboID no plasmídeo pcDNA5/FRT/TO FLAG - Nek11 e pcDNA5/FRT/TO FLAG.



**Figura 3. Etapas de clonagem de TurboID no vetor pcDNA5 Flag e pcDNA5 Flag Nek11.** (A) eletroforese da amplificação do TurboID em TAQ polimerase, com o marcador à esquerda, na faixa de 1Kb. (B) eletroforese da PCR de colônia para confirmação da inserção da TurboID no vetor pcDNA5 Nek11 (1) e (C) pcDNA5 vazio (4), acompanhado dos controles positivos (2) e (3) de Flag-TurboID (Addgene #124646). Análise do sequenciamento do pcDNA TurboID-Nek11 gerado, feito pelo programa Bioedit Sequence Alignment Editor, indicando sucesso na clonagem, com a presença de ambos TurboID e Nek11 no plasmídeo.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Observamos que a Nek11 apresenta-se enriquecida no núcleo 2h após dano no DNA como pontos bem distribuídos e delimitados. Os plasmídeos necessários para identificação dos parceiros protéicos de interação da Nek11 foram gerados com sucesso e a geração das linhagens celulares para expressão estável induzida por tetraciclina está em andamento. Os primers necessários para realização da mutagênese sítio dirigida da Nek11 já foram desenhados e sua síntese solicitada.

### BIBLIOGRAFIA:

- [1] Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39655-39665. doi:10.1074/jbc.M204599200
- [2] Sabir, Sarah Ruby (2015). Characterization and function of the nek11 kinase in cancer cells. University of Leicester. Thesis. <https://hdl.handle.net/2381/32226>
- [3] Sørensen CS, Melixetian M, Klein DK, Helin K. NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling. *Cell Cycle.* 2010;9(3):450-455. doi:10.4161/cc.9.3.10513
- [4] Guo L, Wang ZB, Wang HH, et al. Nek11 regulates asymmetric cell division during mouse oocyte meiotic maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;474(4):667-672. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.002
- [5] Christodoulou E, van Doorn R, Visser M, et al. NEK11 as a candidate high-penetrance melanoma susceptibility gene. *Journal of Medical Genetics* 2020;57:203-210.
- [6] Liu X, Gao Y, Lu Y, et al. Downregulation of NEK11 is associated with drug resistance in ovarian cancer. *International Journal of Oncology.* 2014 Sep;45(3):1266-1274. DOI: 10.3892/ijo.2014.2503. PMID: 24969318

[7] Zbyslaw Sondka, Nidhi Bindal Dhir, Denise Carvalho-Silva, Steven Jupe, Madhumita, Karen McLaren, Mike Starkey, Sari Ward, Jennifer Wilding, Madiha Ahmed, Joanna Argasinska, David Beare, Manpreet Singh Chawla, Stephen Duke, Ilaria Fasanella, Avirup Guha Neogi, Susan Haller, Balazs Hetenyi, Leonie Hodges, Alex Holmes, Rachel Lyne, Thomas Maurel, Sumodh Nair, Helder Pedro, Amaia Sangrador-Vegas, Helen Schuilenburg, Zoe Sheard, Siew Yit Yong, Jon Teague, COSMIC: a curated database of somatic variants and clinical data for cancer, *Nucleic Acids Research*, Volume 52, Issue D1, 5 January 2024, Pages D1210–D1217, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad986>