



COMPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS FISIOLÓGICOS DA NEK6 E NEK7 USANDO A ABORDAGEM SHOKAT

Palavras-Chave: NEK6, NEK7, CÂNCER, SUBSTRATOS FISIOLÓGICOS.

Autores/as:

Caio Bossolan Correa (Aluno) (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador) (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Dra. Cíntia Júnia Monteiro (Coorientadora) (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

INTRODUÇÃO

O câncer está classificado em um dos grupos de doenças mais prevalentes atualmente, afetando grande variedade de órgãos e com altas taxas de mortalidade na população mundial (Ibarra, 2013). A doença é caracterizada pelo crescimento celular rápido e descontrolado, geralmente causado por mutações genéticas em proto-oncogenes que são inativos em células normais, mas que, se ativados, transformam-se em oncogenes. Estas mutações são normalmente induzidas por fatores ambientais e hereditários. Essas mutações, muitas vezes, estão em genes codificadores de proteínas que apresentam importante papel no ciclo celular, entre estas estão as quinases como as CDKs e as NEKs.

As Neks (NIMA-related kinases) são quinases que compõem um conjunto de 11 serina/treonina quinases e estão envolvidas com a regulação do ciclo celular, organização do centrôssoma, gametogênese, splicing de mRNA, diferenciação miogênica, reparo de danos ao DNA, entre outras funções. Além disto, apresentam um importante papel no início e progressão de diversos tipos de câncer (Panchal & Evan Prince, 2023). As NEKs 6 e 7 compartilham diversos mecanismos semelhantes na regulação celular, como a fosforilação da KIF11, essencial para a formação e manutenção do fuso mitótico bipolar, que garante separação correta dos cromossomos durante a mitose. Curiosamente, as duas também são ativadas pela fosforilação da NEK 9 (de Oliveira et al., 2020)

Apesar de possuírem características estruturais semelhantes, ainda não se tem conhecimento sobre os substratos fisiológicos específicos de cada uma delas. Desta forma, para melhor compreender a função das NEKs 6 e 7, o presente trabalho tem como objetivo utilizar a abordagem de Shokat para a identificar e comparar os substratos fisiológicos de cada uma delas.

METODOLOGIA

Mutagênese Sítio-Dirigida: A mutagênese sítio-dirigida foi realizada utilizando o kit comercial QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Foram sintetizados três oligonucleotídeos

complementares contendo as mutações desejadas para cada proteína, utilizando os seguintes primers: forward 5' GAGCTGAACATTGTGGCGGAGTTGGCTGACGC 3' e reverse 5' GCGTCAGCCAACTCCGCCACAATGTTTCAGCTC 3' para a L122A (NEK6), forward 5' AAGGAGATCGGCCTCGCGAAGCAACTGAACCA 3' e reverse 5' TGGTTCAGTTGCTTCGCGAGGCCGATCTCCTT 3' para L115A (NEK6) e forward 5' GAACTAAACATAGTTGCGGAACTAGCAGATGC 3' e 5' GCATCTGCTAGTTCGCAACTATGTTTAGTTC 3' para L11A (NEK7). Para a reação controle, os seguintes componentes foram adicionados: 5 µL de tampão de reação 10×, 50 ng de DNA molde de fita dupla (dsDNA), 125 ng de cada oligonucleotídeo (forward e reverse), 1 µL de mix de dNTPs e água ultrapura (ddH₂O) suficiente para um volume final de 50 µL. Em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima PfuTurbo DNA polimerase (2,5 U/µL). A mesma composição foi utilizada para a reação experimental, destinada à obtenção das mutações, alterando apenas o DNA molde de acordo com a construção experimental. As reações foram realizadas diretamente em vetores de expressão pEGFP-C2, pcDNA 3.1 Flag, contendo as sequências codificadoras das proteínas NEK 6 e 7, visando a expressão em células U2OS. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador, conforme os parâmetros recomendados pelo fabricante do kit. Após o ciclo de mutagênese, os produtos amplificados foram utilizados para transformação bacteriana. As colônias resultantes foram selecionadas e o DNA plasmidial foi extraído e purificado. A confirmação das mutações foi realizada por sequenciamento de Sanger.

Cultura de células: Para o cultivo das células da linhagem U2OS (células de osteosarcoma), estas foram mantidas em condições controladas de incubação, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, a uma temperatura constante de 37 °C. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de uma solução de antibiótico-antimicótico (contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B) e 4 mM de L-glutamina, a fim de garantir condições ideais para o crescimento e a viabilidade celular. O meio foi trocado a cada dois dias ou conforme necessário, e a confluência celular foi monitorada periodicamente por microscopia óptica.

Transfecção de Células: As células U2OS foram transfectadas com os plasmídeos WT e mutantes das NEKs 6 e 7. A transfecção foi realizada utilizando o reagente PEI (polietilenimina). Após 18 horas da transfecção, período estimado para expressão adequada das proteínas recombinantes. As células foram lisadas utilizando tampão de lise (20 mM Hepes pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 25 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 10% glicerol), com adição de inibidores de protease e fosfatase, por aproximadamente 30 minutos no gelo.

Reação de quinase/tiofosforilação: Após lise celular, as proteínas totais foram quantificadas e submetidas a uma reação de tiofosforilação. A reação foi conduzida na presença de 2 mM de TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine), GTP (1 mM) e utilizando análogos volumosos de ATP-γ-S (50µM) (Biolog, Hayward, CA), específico para quinases modificadas do tipo *analog-sensitive*. A incubação foi realizada por 1 hora, a 30 °C, com o objetivo de promover a transferência do grupo tiofosfato para os substratos das quinases modificadas. Para interromper a reação adicionou-se EDTA (50 mM) com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, e em seguida as amostras foram incubadas por 2 horas a 30°C, na presença de PNBM (50 mM), promovendo a alquilação dos resíduos tiofosforilados que possibilitaram a visualização dos substratos por Western blot ao utilizar anticorpo anti-tiofosfato éster.

Western blot: Para analisar se a reação de quinase foi bem-sucedida, uma alíquota da reação contendo aproximadamente 60 µL de proteína foi utilizada para análise por Western blot. Inicialmente, foi realizada a eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) utilizando-se um sistema de tampão descontínuo. Foram utilizados mini-géis de poliacrilamida, com gel de empilhamento de 4% e géis de separação de 12%. As amostras para eletroforese foram preparadas com tampão de amostra concentrado 4x (240 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% SDS; 40% glicerol contendo azul de bromofenol). As amostras foram

aquecidas por 5 minutos a 95°C a seco. Após a corrida em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas a 100V por 90 minutos para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se tampão de transferência (25mM TrisHCl, 190 mM glicina, 20% metanol e 0,1% SDS). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos para checar se a transferência foi bem-sucedida. Em seguida, a membrana foi lavada com água deionizada e bloqueada por uma hora em leite desnatado a 5% preparado em TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário e mantido overnight a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: ANTI-FLAG (F1804 Sigma-Aldrich) (1:3000), NEK 7 (ab68060) (1:500), NEK 6 (sc-50752) (1:1000), Vinculina (ab18058) (1:5000), β-actina (ab8226) (1:1000) e tiosfato-éter (ab133273) (1:5000). Em seguida, foi realizadas lavagens com TBS-T por cinco vezes de 5 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 50 minutos. Para a pesquisa foram utilizados os seguintes secundários: ANTI-Flag (Anti-mouse - 401253 Merck) (1:5000), Anti-NEK7 (Goat Anti-Mouse – 401253 Merck) (1:2500), Anti-NEK6 (Anti-Goat) (1:5000), Anti-Vinculina (Anti-mouse – 401253 Merck) (1:1000), Anti-β-actina (Anti-Mouse – 401253 Merck) (1:5000) e Anti-Tiosfato éter (Anti-Rabbit - #7074 Cell signaling) (1:3000). Após a incubação, foram feitas lavagens da membrana em TBS-T por 3 vezes de 5 minutos. Finalmente, foi feita a revelação para detecção das bandas correspondente para cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para início do projeto, foi necessário realizar a identificação dos resíduos “gatekeeper” das NEKs 6 e 7, com intuito de gerar a mutação sítio-dirigida no local identificado. Para isso, utilizou-se como base a sequência da quinase Aurora B, em específico seu resíduo L154 já caracterizado e identificado na literatura (Hengeveld et al., 2012). Alinhando as sequências das NEKs 6 e 7 com a quinase Aurora B foi possível identificar os resíduos a serem mutados. Como pode ser visto na Figura 1, as mutações realizadas foram: L122A (NEK6-GFP); L111A (NEK7). Foi realizado também a mutação da NEK 6 em uma outra região para ser usado como controle (L97A).

AURORA	QLRREIEIQAHLLHHPNILRLYNYFYDRRIYLLEIYAPRGELYKELQKSC----TFDEQR	176
NEK6	DCVKEIGLLKQLNHPNIIKYLDSFIEDNELNIYLELADAGDLSQMIKYFKKQKRLIPERT	148
NEK7	DCIKEIDLKQLNHPNVIKYASFIEDNELNIYLELADAGDLSRMIKHFKKQKRLIPERT	137

Figura 1. Alinhamento das sequências das quinases AuroraB, NEK6 e NEK7 e identificação de seus resíduos gatekeeper. Por meio do alinhamento das três sequências foi possível identificar o resíduo gatekeeper de cada NEK, destacado em vermelho na figura.

Logo após, foi realizado o ensaio de mutação sítio-dirigida, com a inserção das mutações específicas nos resíduos “gatekeeper” das sequências de NEK 6, nos plasmídeos pEGFP-C2 (L97A) e pcDNA3.1 (L122A), além da sequência de NEK 7 no plasmídeo pcDNA3.1 (L111A)

Para confirmação das mutações realizadas em cada plasmídeos, foi realizado sequenciamento de Sanger. Os resultados gerados, confirmaram a substituição da trinca TTG para GCG na posição 122 da sequência de Flag-NEK6, a substituição da trinca TTG para GCG na posição 97 da sequência de GFP-NEK6 e a substituição da trinca TTG para GCG na posição 111 da sequência de Flag-NEK7.

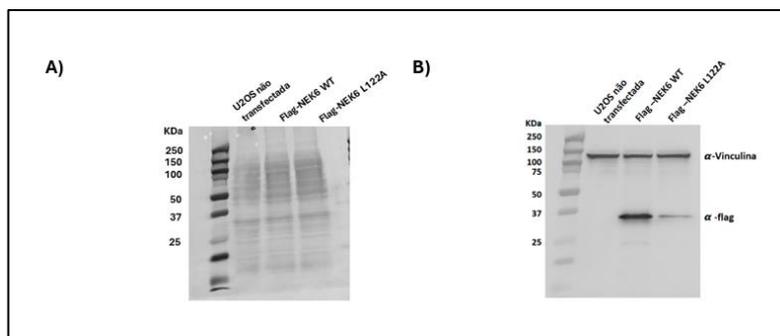


Figura 2. Resultado Western blot com Flag-NEK6. (A) A figura mostra o resultado do experimento de Western blot após transferência, indicando que houve sucesso na transferência para o papel membrana de nitrocelulose. (B) Resultado após incubação com os anticorpos anti-flag e α-vinculina. A α-vinculina possibilita visualizar que a quantidade de proteína foi normalizada entre as amostras.

Para a expressão das proteínas, foi realizada a transfecção dos plasmídeos selvagens e mutados em células U2OS. Para confirmação do sucesso da transfecção foi realizado Western blot, conforme demonstrado nas Figura 2 e 3, respectivamente. A identificação da presença de bandas com peso molecular de 35 kDa nas amostras WT e Mutante foi possível com o uso do anticorpo Flag. Como controle, as células U2OS não transfectadas não apresentaram essa banda, reforçando a eficiência da transfecção.

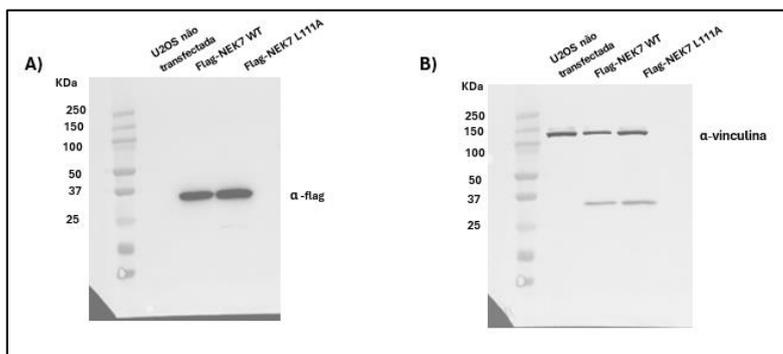


Figura 3. Resultado Western blot com Flag-NEK7. (A) Figura mostra resultado do experimento de Western blot após incubação com o anticorpo Flag. A imagem comprova que a transfecção teve sucesso devido a presença da banda em ambas as amostras transfectadas, enquanto na amostra de U2OS não transfectadas não houve presença de bandas. (B) Figura mostra resultado após incubação com α -vinculina, possibilitando enxergar a presença de uma banda em cada uma das amostras, concluindo que as amostras foram carregadas de maneira semelhante.

Para a amostra GFP-NEK6, utilizou-se microscopia de fluorescência de células U2OS transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C2-NEK6, o qual apresenta uma proteína fluorescente, o GFP. Com isso, a localização intracelular da proteína NEK6 pôde ser visualizada pela presença da fluorescência, indicando que a proteína foi expressa corretamente (Figura 4).

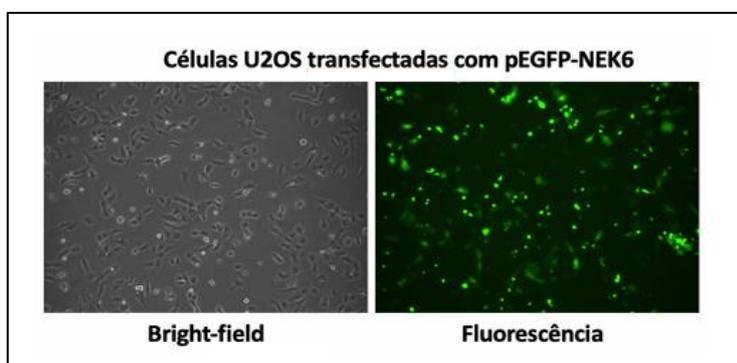


Figura 4. Microscopia de fluorescência de células U2OS transfectadas com pEGFP-NEK6. A imagem em Bright-field mostra a morfologia geral das células transfectadas, enquanto a imagem com fluorescência em GFP indica a expressão da proteína NEK6

Em seguida, foi realizado o ensaio de quinase/tiofosfato para analisar se a mutação realizada seria suficiente para a utilização dos ATP's análogos. O ensaio foi realizado com as amostras NEK6-GFP e NEK6-Flag e o análogo 6-Fu-ATP- γ -S (Furfuriladenosina-tiotrifosfato). Após realização de Western blot, utilizando o anticorpo α -tiofosfato-éter, foi possível visualizar as bandas que indicam os substratos diretos das Neks mutadas. É possível observar que a amostra contendo as células transfectadas com os plasmídeos mutantes apresentam bandas mais fortes e em maior número que as amostra transfectadas com os plasmídeos sem a mutação, indicando o sucesso do experimento (Figura 5).

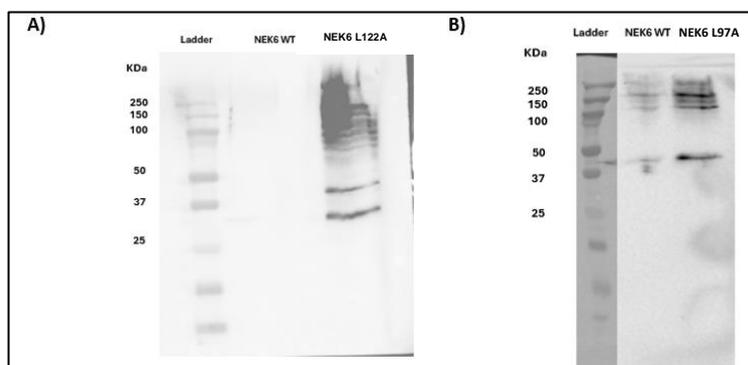


Figura 5. A) Figura mostra a membrana após realização de Western blot e incubação com anticorpo tiofosfato éter com amostras de NEK6 WT e L122A. A presença das bandas somente no poço contendo a amostra com NEK6 L122A, indica que as quinase foram capazes de utilizar o ATP análogo, o que não ocorreu com a amostra WT já que não houve presença de bandas. B) A figura mostra a membrana após realização de Western blot e incubação com anticorpo tiofosfato éter com amostras NEK6 WT e L97A. A presença das bandas somente no poço contendo a amostra L97A, indica que as quinases foram capazes de utilizar o ATP análogo, o que ocorreu na WT mas com menor eficiência, indicando que as quinases que apresentaram a mutação tiveram maior eficiência em utilizar o ATP análogo do que comparado com a amostra WT.

O mesmo experimento foi realizado para a NEK7. Por meio da técnica de Western blot, foi possível observar que as bandas de ambas as amostras (WT e Mutante) apresentavam-se semelhantes (Figura 6), indicando que provavelmente a mutação não foi suficiente para permitir a utilização do ATP análogo para tiosfosforilação dos substratos.

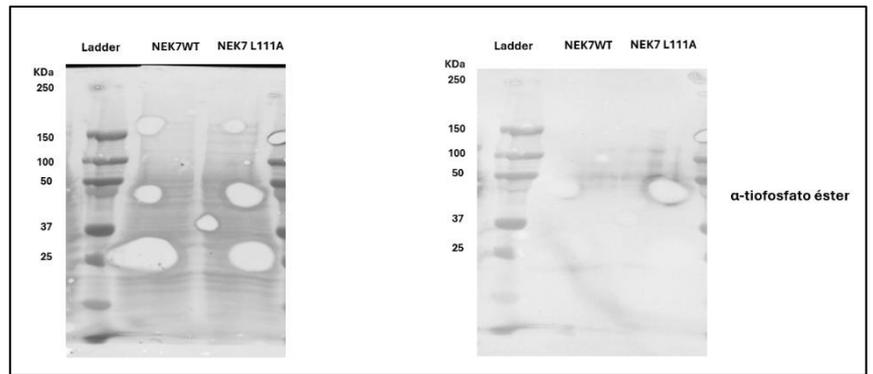


Figura 6. A) A figura mostra o resultado do experimento de Western blot após transferência, indicando que houve sucesso na transferência para o papel membrana de nitrocelulose. B) A figura mostra a membrana após realização de Western blot e incubação com anticorpo tiosfosfato éster com amostra NEK7. A presença das bandas semelhantes em ambos os poços (WT e L111A), indica que as quinases mutadas não foram capazes de utilizar o ATP análogo 6-Fu-ATP- γ -S (Furfuriladenosina-tiotrifosfato).

CONCLUSÕES

Em suma, os resultados obtidos indicam que a mutação introduzida no “gatekeeper” da Nek6 foi eficaz para que ela fosse capaz de utilizar o análogo de ATP 6-Fu-ATP- γ -S para tiosfosforilar os seus substratos nas células U2OS. Isto permitirá que possamos prosseguir com os experimentos e identificar seus substratos diretos por espectrometria de massas. Por outro lado, o teste de tiosfosforilação utilizando o 6-Fu-ATP- γ -S nas células transfectadas contendo a sequência de NEK7 L111A não foi bem-sucedido, possivelmente indicando que a mutação no “gatekeeper” da Nek7 não foi suficiente.

BIBLIOGRAFIA

- Carlson, S. M., & White, F. M. (2012). **Labeling and identification of direct kinase substrates.** In *Science Signaling* (Vol. 5, Issue 227). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002568>
- de Oliveira, A. P., Issayama, L. K., Pavan, I. C. B., Silva, F. R., Melo-Hanchuk, T. D., Simabuco, F. M., & Kobarg, J. (2020). **Checking neks: Overcoming a bottleneck in human diseases.** *Molecules*, *25*(8), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules25081778>
- Hengeveld, R. C. C., Hertz, N. T., Vromans, M. J. M., Zhang, C., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., & Lens, S. M. A. (2012). **Development of a chemical genetic approach for human aurora B kinase identifies novel substrates of the chromosomal passenger complex.** *Molecular and Cellular Proteomics*, *11*(5), 47–59. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013912>
- Panchal, N. K., & Evan Prince, S. (2023). **The NEK family of serine/threonine kinases as a biomarker for cancer.** *Clinical and Experimental Medicine*, *23*(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00782-0>
- Wang, J., Chen, S., Liu, M., Zhang, M., & Jia, X. (2022). **NEK7: a new target for the treatment of multiple tumors and chronic inflammatory diseases.** *Inflammopharmacology*, *30*(4), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01026-7>