

Membro da família das Nek cinases e sua relação com o câncer

Pesquisador responsável: Jörg Kobarg

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial e suas causas dependem de fatores genéticos e ambientais. Foi proposto por Hanahan e Weinberg (2011) seis marcadores para o câncer que juntos constituem um design lógico para o entendimento da diversidade de neoplasias. São eles, a capacidade de induzir angiogênese, invasão e metástase, imortalidade replicativa, resistência a morte celular, indução e sustentação de fatores de crescimento, bem como, manutenção de sinais proliferativos. A mitose é uma etapa crucial do ciclo celular onde uma célula se divide em duas através de uma reorganização massiva da arquitetura celular. As proteínas da família das Nek cinases (*NIMA related kinases*) constituem uma família altamente conservada de proteínas relacionadas a diferentes marcadores do câncer. Em humanos foram identificados 11 membros desta família (Nek1 a 11), vários dos quais são codificados por genes relacionados à patologias, como o câncer, o que as torna potenciais alvos quimioterápicos. Nassirpour e colaboradores (2010) demonstraram que os níveis do transcrito, da proteína e da atividade de cinase da hNek6 mostraram-se altamente elevados em tumores malignos e linhagens celulares humanas em comparação com os tecidos normais. Em um *screening* em larga escala de expressão de serina/treonina cinases hNek6 e 7 estavam superexpressas em tumores de mama, laringe e colorretal (Capra et al, 2006). As Neks 2, 3 e 8 também encontraram-se superexpressas em tumores de mama (Tsunoda et al., 2009; McHale et al., 2008; Bowers & Boylan, 2004). O conhecimento sobre os membros da família das Nek cinases ainda é limitado, e alguns membros, como a hNek5, não possuem informações sobre sua função ou onde são expressas. O gene da Nek5 foi identificado, de acordo análises genômicas em organismos como *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, dentre outros. Entretanto, características inerentes a proteína permanecem pouco elucidadas, como por exemplo, sua função, estrutura e interações com outras proteínas. Estudos recentes sugerem que a expressão de hNek5 é regulada durante as diferentes fases do ciclo celular e busca por proteínas que interagem com hNek5 resultou em 10 proteínas com funções relacionadas ao reparo de dano de DNA, morte celular, dentre outros mecanismos.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral:*

Análise da funcional e estrutural da proteína reguladora humana Nek5.

2.2. *Objetivos específicos*

- Clonagem, expressão e purificação do domínio cinase da proteína Nek5 humana.
- Confirmação das proteínas que interagem com Nek5 *in vivo* e *in vitro* através de ensaio de imunoprecipitação, “pull down” e microscopia de fluorescência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Clonagem e manipulação de ácidos nucleicos

Procedimentos básicos de biologia molecular serão utilizados na manipulação, purificação, análise e preparação do DNA. Estas técnicas são descritas com detalhes em manuais de laboratório (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995).

Em síntese serão desenhados oligonucleotídeos para amplificação da sequência completa do gene codificador da proteína Nek5 a partir do vetor pCMV5-FLAG, destinada à clonagem no vetor do sistema de duplo-híbrido, pBTM116. Outros oligonucleotídeos serão desenhados para a amplificação e clonagem da região equivalente ao domínio quinase de Nek5 em vetor de expressão do sistema de baculovírus, pFastBacHT (Invitrogen), e/ou vetores de expressão em *E. coli* derivados do pET28a (Novagen).

3.2. Expressão da proteína Nek5 em *E.coli* e purificação das proteínas recombinantes

Para o sistema em *E.coli*, as bactérias competentes serão transformadas com os plasmídeos de expressão e submetidas a testes de otimização de expressão, variando-se o tempo de indução (de 1 a 16 horas), a temperatura de indução (18, 25 e 37 °C) e a concentração do indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM).

Para a purificação será utilizada a resina de Ni-Sepharose para capturar as proteínas de interesse. A coluna será equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (TL), as proteínas aplicadas e a coluna lavada com TL acrescido de 40 mM de Imidazol e um volume de TL acrescido de 60mM de imidazol. As proteínas serão eluídas em TL + 250 mM imidazol. Caso seja necessário as proteínas serão submetidas a uma nova etapa de purificação por gel filtração em coluna de gel filtração S200 16/60 previamente equilibrada com 2 volume de tampão de gel filtração.

3.3. *Microscopia de fluorescência*

Células U2OS serão utilizadas para confirmação da colocalização com diferentes proteínas. As células serão fixadas em metanol gelado e bloqueadas com 0,5% Triton X-100 em PBS. As proteínas serão detectadas incubando-se as células com anticorpos primários e em

seguida com anticorpos secundários Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 546 (Molecular Probes Inc.). A análise será feita em microscópio **Confocal Invertido LSM780 NLO** (Carl Zeiss AG, Germany) e as imagens processadas no **Software ZEN2011-blue edition** (Carl Zeiss AG, Germany).

4. INFORMAÇÕES RELEVANTES:

Este projeto proporcionará ao aluno de graduação um contato direto com a atividade de pesquisa e métodos científicos. O aluno de iniciação científica estará em contato direto com uma estudante de doutorado que auxiliará na execução deste projeto de pesquisa e gerará um artigo científico do qual o aluno será co-autor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingstone, R. E.; Moore, D. D.; Seidmen, J. G.; Smith, J. A. e Struhl, K. (eds) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.

Barbagallo, F.; Paronetto, M. P.; Franco, R.; Chieffi, P.; Dolci, S.; Fry, A. M.; Geremia, R.; Sette, C. (2009). Increased expression and nuclear localization of the centrosomal kinase Nek2 in human testicular seminomas. *J Pathol*; 217: 431–441

Bowers, A. J. e Boylan, J. F. (2004). Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*, 328:135-142.

Hanahan, D & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674

Capra, M.; Nuciforo, P. G.; Confalonieri, S.; Quarto, M.; Bianchi, M.; Nebuloni, M.; Boldorini, R.; Pallotti, F.; Viale, G.; Gishizky, M. L.; Draetta, G. F.; Di Fiore, P. P. (2006). Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers. *Cancer Res.*, 66:8147–8154.

Nassirpour, R; Shao, L; Flanagan, P; et al. (2010). Nek6 Mediates Human Cancer Cell Transformation and Is a Potential Cancer Therapeutic Target. *Mol Cancer Res.*;8:717-728
McHale, K.; Tomaszewski, J.E.; Puthiyaveetil, R.; LiVolsi, V.A.; Clevenger, C.V. (2008). Altered expression of prolactin receptor-associated signaling proteins in human breast carcinoma. *Modern Pathology* 21, 565–571

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.