

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estudo do envolvimento da
cinase humana Nek1 na
sinalização de reparo de DNA.**

Alessandra Luíza Pelegrini

Orientador: Guido Lenz

Porto Alegre

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Estudo do envolvimento da cinase humana Nek1 na
sinalização de reparo de DNA.**

Alessandra Luíza Pelegrini

**Dissertação submetida ao programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre.**

**Orientador: Guido Lenz
Co-orientador: Jenifer Saffi**

**Porto Alegre
Outubro, 2007**

Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular e do Laboratório de Radiobiologia Molecular do departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os experimentos de espectrometria de massas foram desenvolvidos nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, SP. O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Aos meus pais, Olga e Tarcísio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao meu orientador Guido Lenz por permitir a realização desse trabalho em seu laboratório. Também agradeço por toda a atenção dispensada a mim, pelos seus conselhos, pela motivação, pelo companheirismo e claro, pela orientação.

À professora Dra. Jenifer Saffi, pela co-orientação e apoio na realização desse trabalho e ao professor Dr. João Antonio Pêgas Henriques por disponibilizar a infraestrutura necessária ao desenvolvimento do mesmo.

Aos professores membros da comissão de acompanhamento Dra. Célia carlini e Fabiana Horn, pela atenção e colaboração.

À banca, pela disponibilidade e paciência.

À Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo pelos incontáveis auxílios ao longo desses meses.

À Dinara Jaqueline Moura, pelo auxílio na realização desse trabalho, pelas conversas e discussões, pelo apoio e amizade.

À Bethânia Luise Brenner pelo envolvimento no projeto, pela amizade e companheirismo desde o início desse projeto.

À Pítia Flores Ledur pela ajuda especial na elaboração da tese e pela amizade.

Às colegas pós-graduandas do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular: Alessandra, Lauren e Patrícia pela troca de experiências e desabafos, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos demais colegas do laboratório: Andrew, Carolina, Eduardo, Emilly, Giovanna e Rômela que fazem do nosso laboratório um ambiente agradável para se trabalhar.

Aos colegas do Laboratório Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica da UFRGS, principalmente ao Renato e a Ana Catarina que participaram diretamente do projeto.

Aos colegas usuários da sala de cultura, Letícia, Nicole, Fabrício, Renata e Lavinia pela simpatia e convivência agradável nesse ambiente.

Agradeço ao Laboratório de Imunogenética da UFRGS pela disponibilização dos equipamentos e ao Andrés Delgado Cañedo pelo auxílio na utilização dos mesmos.

Ao LNLS pela oportunidade de trabalho em suas instalações.

Agradeço a FAPERGS, a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ainda aos meus amigos que me acompanharam por todos esses anos me apoiando e me incentivando.

E por fim agradeço e dedico esse trabalho aos meus pais, Olga e Tarcísio Pelegrini, por todos os ensinamentos e valores que me passaram, e ao meu irmão pelo apoio e compreensão durante a realização desse trabalho, e em todos os momentos difíceis que passamos.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVEATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
I. INTRODUÇÃO	18
<i>Neks - Nima Related Kinases</i>	18
1. NIMA – <i>Never In Mitosis A</i>	18
2. Neks – As cinases relacionadas à NIMA em mamíferos	
21	
2.1 Nek2 e Nek11	25
2.2 Nek6 e Nek7	27
2.3 Nek9/Nercc1	28
2.4 Nek8	29
3. Nek1	
31	
3.1 Nek1 e a Gametogênese	33
3.2 A Doença Policística do Rim (PKD)	34
3.3 Interação com outras proteínas	37
3.4 Nek1 e função ciliar	38
3.5 Envolvimento de Nek1 em vias de percepção de danos de DNA	40
4. Estresse Genotóxico	41
4.1 Danos ao DNA	42
4.2 Tipos de reparo ao DNA	45
II. OBJETIVOS	51
Objetivo Geral	51

Objetivos Específicos	51
III. MATERIAIS E MÉTODOS	52
1. Anticorpos	52
2. RNAi	52
3. Agentes genotóxicos	52
4. Cultura de Células	53
5. Contagem de células em Câmara de Neubauer	53
6. Tratamentos	53
7. Ensaio Cometa	54
8. Ensaio de proliferação celular (MTT)	56
9. Citometria de Fluxo	57
10. Preparo das células e Eletroforese	57
11. Imunodeteção	58
12. Estatística	58
13. Imunoprecipitação	59
14. Espectrometria de Massas	59
IV. RESULTADOS	60
1. Obtenção de linhagens Nek1 negativas e GFP positivas:	
2. Ensaio cometa para verificar a existência de danos DNA	62
3. E. cometa para verificar a capacidade de reparo ao DNA	66
4. Ensaio de sobrevivência e proliferação celular	72
V. RESULTADOS PRELIMINARES	
1. Estudo do papel da Nek1 na progressão do ciclo celular	76
2. Estudo da interação da Nek1 com outras proteínas	79
IV. DISCUSSÃO	82
V. PERSPECTIVAS	92

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Árvore filogenética de organismos modelos indicando o número de Neks descritas. **24**
- Figura 2.** Árvore filogenética mostrando a relação entre as seqüências das onze Neks conhecidas em humanos. **25**
- Figura 3.** Comparação estrutural entre as cinases Nek1 de mamíferos e a NIMA do fungo *Aspergillus nidulans*. **32**
- Figura 4.** Comparação esquemática da estrutura da NIMA com a Nek1 de camundongo. **32**
- Figura 5.** Comparação entre um rim normal e um rim afetado pela Doença Policística do Rim (PKD). **35**
- Figura 6.** Respostas celulares aos danos ao DNA. **42**
- Figura 7.** Agentes genotóxicos utilizados nesse trabalho. **44**
- Figura 8.** Visão geral do reparo de DSBs por HR em eucariotos superiores. **48**
- Figura 9.** Representação esquemática da rota de reparo NHEJ em eucariotos superiores. **50**

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Metodologia do Ensaio Cometa em pH alcalino segundo **55**
- Figura 2.** Células do Ensaio Cometa coradas com prata **56**

RESULTADOS

- Figura 1.** Obtenção das linhagens Nek1 negativas. **61**
- Figura 2.** Comparação do índice de dano ao DNA de células Hek293t. **62**
- Figura 3.** Comparação do aspecto dos núcleos corados com prata de células tratadas com Cisplatina. **64**

Figura 4. Efeito do tratamento com cisplatina na migração do DNA de células Hek293t.	65
Figura 5 Capacidade de reparação de danos ao DNA após o tratamento com MMS e H ₂ O ₂	67
Figura 6. Curva de dose do ensaio cometa feito com Hek293t com MMS e H ₂ O ₂ .	68
Figura 7. Capacidade de reparo de danos ao DNA de células Hek293t expostas à cisplatina.	70
Figura 8. Efeito do tratamento com cisplatina na migração do DNA de células Hek293t.	71
Figura 9. Ensaio MTT para ver proliferação e sobrevivência celular.	72
Figura 10. Curva de crescimento de linhagens expostas a agente genotóxicos.	74
Figura 11. Curva de dose do ensaio de proliferação celular MTT.	75
Figura 12. Histogramas de células U87 sincronizadas pela depleção de SFB no meio de cultivo por dois dias.	77

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

- Tabela 1.** Funções propostas para Neks de mamíferos. **22**
- Tabela 2.** Relação entre o número de Neks presentes em um organismo e a presença de células ciliadas. **30**

RESULTADOS

- Tabela 1.** Resultados do primeiro experimento de citometria de fluxo das células U87 sincronizadas pela depleção de SFB no meio de cultivo. **77**
- Tabela 2.** Tabela 2: Resultados do segundo experimento de citometria de fluxo. **78**
- Tabela 3.** Proteínas que foram encontradas na análise do espectrômetro de massa após a co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-Nek1. **80**
- Tabela 4.** Proteínas que foram encontradas na análise do espectrômetro de massa após a co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-pNek1. **80**

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
APC	complexo promotor de anáfase
ATP	adenosina tri-fosfato
BER	reparo por excisão de bases
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	citosina
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSB	quebras duplas do DNA
DSBR	reparação de quebras duplas do DNA
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FACT	complexo facilitador de transcrição da cromatina
g	unidade de medida: grama
ug/ml	unidade de medida: micrograma por mililitro
G	guanina
GFP	proteína fluorescente verde
h	unidade de tempo: hora
HR	recombinação homóloga
ICL	ligação cruzada intercadeia
kDA	unidade de medida: quilo-dalton
M	unidade de medida: molar
mM	unidade de medida: milimolar
uM	unidade de medida: micro molar
nM	unidade de medida: nano molar

min	unidade de tempo: minuto
MMR	Reparo de erros de emparelhamento de bases
MMS	metil-metanosulfonato
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
NES	seqüência de exportação nuclear
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	recombinação não homologa
NLS	seqüência de localização nuclear
nm	comprimento de onda: nanômetro
PEST	previsão de motivos de degradação
PI	ponto de isoelétrico
PKD	doença policística do rim
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RNAi	RNA de interferência
RI	radiação ionizante
SFB	soro fetal bovino
SDSA	síntese dependente do anelamento da fita de DNA
SDS	dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SSB	quebra de fita simples de DNA
SSBR	reparo de quebra simples de DNA
T	timina
UV	radiação ultravioleta
UVC	radiação ultravioleta curta (254 nm)

RESUMO

As Nek são proteínas cinases humanas evolutivamente conservadas e estruturalmente relacionadas à NIMA, um regulador mitótico descrito em *Aspergillus nidulans*. A Nek1, uma das onze isoformas das Neks identificadas em mamíferos, parece estar envolvida na etiologia da Doença Policística do Rim (PKD) em humanos, pois sua deleção em animais causa uma síndrome semelhante à PKD. Além disso, existem evidências sobre sua participação no reparo ao DNA em resposta à radiação ionizante e sobre sua interação com proteínas envolvidas em rotas de reparo e na regulação do ciclo celular de mamífero, mas pouco se sabe sobre seu papel na fisiologia das células de mamíferos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da Nek1 no reparo de DNA. A sensibilidade das linhagens celulares aos agentes genotóxicos foram testados pelo ensaio cometa em pH alcalino e também por meio do ensaio de proliferação celular MTT. Para isso, utilizamos a linhagem de rim Hek293t e de glioma humano U87. Essas células foram silenciadas através de um sistema lentiviral estável que usa a proteína fluorescente verde (GFP) como marcador. A seleção das linhagens Nek-negativas foi feita por isolamento de colônias GFP-positivas. As células utilizadas como controle nesse trabalho também expressavam GFP além da Nek1.

As células foram testadas com os agentes indutores de danos ao DNA metil-metanosulfonato, peróxido de hidrogênio e cisplatina. Os resultados mostraram o retardo no reparo de células silenciadas tratadas com peróxido de hidrogênio e metil-metanosulfonato. Após o tratamento com cisplatina, o DNA das células silenciadas apresentou um padrão de migração diferente, característico de lesões do tipo ligações cruzadas (*crosslink*). Esse aspecto permaneceu até 4 horas após a exposição à cisplatina, quando o aspecto de cauda começou a tornar-se mais predominante entre as células observadas. Nosso estudo também mostrou maior sensibilidade da linhagem silenciada em relação à selvagem quando tratadas com esses três agentes por 24, 48 e 72 h de tratamento.

Portanto, nossos resultados indicam que a ausência da Nek1 provoca alterações no reparo normal de danos ao DNA e aumento da sensibilidade ao estresse genotóxico, mas aparentemente ela não é essencial para a sinalização do reparo, uma vez que, mesmo com o retardo, as células acabam conseguindo reparar o dano causado.

Esses efeitos podem estar ocorrendo devido a uma deficiência nas vias de reparo de quebras no DNA que são realizadas por mecanismos de recombinação. Por outro lado, a Nek1 poderia estar atuando no reparo DNA lesado indiretamente através da regulação do ciclo celular, uma vez que a ocorrência de uma lesão no material genético pode alterar o ciclo celular, causando uma parada.

Ainda é cedo para afirmar se a Nek1 está atuando diretamente no controle do ciclo celular ou em rotas de reparo ou até mesmo nas duas. Entender como essa proteína funciona *in vivo* pode auxiliar no estudo da etiologia da Doença Policística do Rim bem como no entendimento de patologias associadas a lesões no material genético.

ABSTRACT

NIMA related kinases (Neks) are evolutionarily conserved proteins structurally related to the *Aspergillus nidulans* mitotic regulator NIMA. The Nek1, one of the eleven isoforms of the Neks identified in mammals, seems to be involved in the etiology of the polycystic kidney disease (PKD) in humans because the deletion of Nek1 in animals causes a disease like PKD. Moreover, there are evidences about its participation in DNA repair in response to ionizing radiation and about its interaction with proteins involved in routes of repair and the mammals cell cycle regulation, but little is known about its role in the human cells physiology.

The aim of this study was evaluating a possible role of Nek1 in the DNA repair. The sensitivity of the lines to genotoxic agents were tested by comet assay in alkaline pH and also by cell proliferation MTT assay of. For this, we used human embryonic kidney Hek293t of and human glioma U87 cell lines. These cells were silenced by a system that uses lentiviral vector with a green fluorescent protein (GFP) as a marker. The selection of the Nek negative cells lines was made by isolation of colonies GFP positive. The cells used as a control in this work also expressed GFP.

The cells were treated by hydrogen peroxide, methyl-methanesulphonate and cisplatin. The results showed a delay in the silenced cells repair when treated with hydrogen peroxide and methyl-methanesulphonate. After the treatment with cisplatin, the silenced cells DNA presented a different pattern of migration, typical of the type of crosslink damage. This aspect remained up to 4 hours after exposure to cisplatin, when the appearance of tail began to become predominant in the cells observed. Our study also showed greater silenced line sensitivity to the wild when treated with the three agents by 24, 48 and 72h of treatment.

Our results indicate that the Nek1 absence causes changes in the normal DNA damage repair and increased sensitivity to genotoxic stress, but apparently it is not essential for repair signaling because, even with delay, cells still repair the DNA damages.

These effects may be occurring due to a deficiency in the process of DNA breaks repair that are held by recombination mechanisms. Meanwhile, Nek1 could be acting in DNA damage repair indirectly through the regulation of the cell cycle, since the occurrence of an injury in the genetic material can change the cell cycle, causing a stop.

It is too early to say whether the Nek1 is working directly in the control of cell cycle or in routes for the repair or even in both. Understanding how this protein works in vivo can assist in the study of the etiology of PKD and in the understanding of diseases associated with lesions in the genetic material.

I. INTRODUÇÃO

Neks - *Nima Related Kinases*

A Nek1 é uma proteína cinase humana, pertencente a uma família de serina/treonina-cinases descrita inicialmente por Letwin e colaboradores em 1992. Essas cinases foram assim denominadas por estarem estrutural e bioquimicamente relacionadas à proteína NIMA (never in mitosis A), um importante regulador do ciclo celular presente no fungo *Aspergillus nidulans*, codificada pelo gene *nimA*. (LETWIN *et al.*, 1992).

1. NIMA – *Never In Mitosis A*

Por volta de 1970, LEE HARTWELL & PAUL NURSE (apud O'Connell *et al.*, 2003) começaram uma análise genética do ciclo celular utilizando os organismos modelos *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente. Na mesma época, RON MORRIS (MORRIS, 1996) estudava diferentes mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* de ciclo celular sensíveis a temperaturas. Morris identificou dois grupos: os mutantes *bim* (blocked in mitosis), que paravam o ciclo na transição entre a fase G2 e a mitose mantendo a condensação dos cromossomos e formação do fuso mitótico; e os mutantes *nim* (never in mitosis), que nunca entravam em mitose, permanecendo sempre na interfase (O'CONNELL *et al.*, 2003). Entre os genes considerados *bim*, estavam aqueles que promoviam a formação do complexo promotor da anáfase (APC), e, no grupo *nim*, foram encontrados genes que codificavam reguladores do ciclo celular já conhecidos, como a ciclina do tipo B, a fosfatase CDC25 e a DNA-polimerase. Nesse grupo também estavam incluídos quatro alelos do gene *nimA*.

Ensaio de clonagem e expressão do gene *nimA*, por volta dos anos 80, demonstraram que ele codifica uma serina/treonina-cinase envolvida na regulação do ciclo celular, denominada NIMA (OSMANI *et al.*, 1988a). A superexpressão dessa proteína induz um estado pseudo-mitótico, com a condensação da cromatina e aberrações na formação do fuso mitótico. Além disso, a condensação dos cromossomos também é observada em células cuja fase S fora previamente bloqueada antes da indução da superexpressão do gene *nimA* (OSMANI *et al.*, 1988b). Outro estudo mostrou que mutações nesse gene, que resultam na perda de função, causam a parada do ciclo celular sem a interferência na ativação da p34-Cdc2, uma importante ciclina reguladora do ciclo celular, indicando que NIMA possui papel fundamental na transição G2/mitose (OSMANI *et al.*, 1991). A iniciação da mitose em *A. nidulans* requer, portanto, a ativação tanto da p34-Cdc2 quanto da NIMA. Células com mutações no gene *nimX3*, que codifica a Cdc2, apresentaram parada do ciclo em G2 e ausência de ativação da NIMA, sugerindo que ativação da NIMA poderia se dar por meio de sua fosforilação direta pela Cdc2 (YE *et al.*, 1995). Em *A. nidulans*, mutantes *nimA* sensíveis a temperaturas acumulam-se na fase G2 tardia sem apresentar condensação da cromatina, rearranjo dos microtúbulos e formação do fuso mitótico quando expostos a temperaturas extremas (OSMANI *et al.*, 1988a).

Sabendo-se que a maioria dos reguladores do ciclo são conservados por todo o reino eucariótico, surgiram expectativas em torno da NIMA e de proteínas homólogas a ela em outros organismos. Entretanto, existem diferenças significativas nos eventos mitóticos do fungo filamentosso *A. nidulans* e dos outros eucariotos. Em primeiro lugar, a mitose no conídio germinativo envolve apenas a divisão nuclear e não a divisão total da célula, gerando células multinucleares, contrastando com os demais eucariotos, cuja citocinese ocorre paralelamente à cariocinese. Outro aspecto visto também em leveduras, mas não em eucariotos superiores, é a persistência do envelope nuclear durante a divisão. Baseado nesses fatos, pode-se especular o papel especializado da NIMA apenas em fungos. Além disso, em outro representante desse grupo, *Neurospora crassa*, um gene homólogo ao *nimA* foi identificado (PU *et*

al., 1995) e sua função *in vivo* é semelhante à encontrada em *A. nidulans* (KRIEN *et al.*, 1998).

Estudos com mutantes de diferentes organismos foram feitos com a finalidade de encontrar cinases homólogas à NIMA e vias de sinalização do controle do ciclo celular similares em outros eucariotos, visto que essas rotas e proteínas costumam ser evolutivamente conservadas. Em um deles, por exemplo, removeu-se o domínio catalítico da NIMA do *A. nidulans*, resultando uma proteína estável que, expressa em leveduras e células humanas, acumula-se, provocando a condensação prematura da cromatina sem outros sinais característicos de mitose (O'CONNELL *et al.*, 1994). Estudo semelhante utilizando dominantes negativos expressos em oócitos de *Xenopus laevis* demonstrou que NIMA induz a quebra de vesículas germinais sem a ativação de proteínas importantes como a Mos, CDC2 e MAPK. Nas células de mamíferos HeLa, a NIMA antecipa eventos mitóticos sem a ativação da CDC2, enquanto que mutantes com perda de função causam a parada do ciclo em G2 (LU & HUNTER, 1995). Esses estudos evidenciaram a presença de rotas de regulação conservadas ao longo da evolução, entretanto ainda se discute se existem homólogas da NIMA presentes em outros organismos e se a função dessas proteínas também seria conservada como é sua estrutura.

Atualmente, existem algumas cinases relacionadas à NIMA descritas em plantas: a AmnimA, de *Antirrhinum majus* (ZHANG *et al.*, 1996), a SPAK, de *Lycopersicon esculentum* Mill (tomate) (PNUELI *et al.*, 2001) e a PNek1, de *Arabidopsis thaliana* (CLOUTIER *et al.*, 2005; VIGNEAULT *et al.*, 2007). A PNek1 parece estar envolvida no controle do ciclo celular, assim como as outras cinases relacionadas à NIMA de plantas. Observou-se que transcritos do gene que codifica essa proteína acumulam-se nas células durante a transição G1/S e G2/M. Além disso, a expressão ectópica da PNek1 em *A. thaliana* resulta em anormalidades no desenvolvimento floral (CLOUTIER *et al.*, 2005). Essas cinases relacionadas à NIMA (AmnimA, SPAK e PNek1) são expressas em tecidos em proliferação, como em meristemas diferenciando-se em folhas e tecido vascular como o câmbio que dá origem ao xilema e ao floema (VIGNEAULT *et al.*, 2007). Além disso, o padrão de

expressão da PNek1 é similar ao observado em genes descritos como reguladores do ciclo celular, como o CycB1 (CLOUTIER *et al.*, 2005). A AmnimA e a SPAK também são expressas em regiões de meristema apical e floral em proliferação (ZHANG *et al.*, 1996; PNUELI *et al.*, 2001).

2. Neks – As cinases relacionadas à NIMA em mamíferos

Em 1991 foi descrita em mamíferos a primeira proteína cinase relacionada à NIMA. A partir de uma biblioteca de cDNA de células sangüíneas de camundongo, os pesquisadores conseguiram isolar as seqüências de genes que codificam proteínas homologas à NIMA (BEN-DAVID *et al.*, 1991).

Em 1992, Letwin e colaboradores descreveram a primeira proteína cinase relacionada à NIMA em humanos, a Nek1. Posteriormente mais trabalhos descrevendo membros dessa família foram publicados e, atualmente, existem 11 membros descritos em humanos, mas nem todos possuem sua função caracterizada (Tabela 1).

Tabela 1*: Funções propostas para Neks de mamíferos.

Proteína	Função proposta	Referência
Nek1	Alterações no gene <i>nek1</i> em animais modelos para a doença policística de rins em humanos. Interage com proteínas envolvidas no ciclo celular e no reparo do DNA. Papel na resposta a dano ao DNA induzido por radiação ionizante.	UPADHYA <i>et al.</i> , 2000 SURPILI <i>et al.</i> , 2003 POLCI <i>et al.</i> , 2004
Nek2	Localizada em centrossomos e cinetócoros. Fosforila a C-Napland Nlp no centrossomo. Regula a separação do centrossomo na transição G2/mitose. Possível papel na regulação do fuso mitótico.	FRY <i>et al.</i> , 1998b FRY <i>et al.</i> , 1998a RAPLEY <i>et al.</i> , 2005 CHEN <i>et al.</i> , 2002
Nek3	Modula a sinalização dos receptores de prolactina.	MILLER <i>et al.</i> , 2005
Nek6 e 7	Participam de cascata de sinalização na mitose, possivelmente regulando outras cinases.	BELHAM <i>et al.</i> , 2003
Nek8	Aumento da expressão em câncer de mama.	BOWERS & BOYLAN, 2004
Nek9	Associação ao Bicd2 in vivo, fosforilação de Bicd2. Regula o alinhamento e a segregação dos cromossomos na mitose. Mediador da organização dos cromossomos e do centrossomo. Ativa a Nek6 durante a mitose. Regula a progressão de G1 e S através da interação com o complexo facilitador da transcrição da cromatina (FACT).	HOLLAND <i>et al.</i> , 2002 ROIG <i>et al.</i> , 2002 ROIG <i>et al.</i> , 2005 BELHAM <i>et al.</i> , 2003 TAN & LEE, 2004
Nek11	Cinase responsiva a estresse replicativo e a danos ao DNA. É ativada pela Nek2a em células com defeito da progressão do ciclo celular em G1/S	NOGUCHI <i>et al.</i> , 2002 NOGUCHI <i>et al.</i> , 2004

* dados da tabela retirados de QUARMBY & MAHJOUR, 2005.

As Neks são conhecidas cinases mitóticas e, juntamente com a Aurora e Pólo, participam de eventos de regulação do ciclo celular (O'CONNELL *et al.*, 2003). Proteínas homólogas da NIMA em mamíferos têm em torno de 40% de identidade entre as extremidades amino-terminal, que correspondem ao domínio catalítico. A

extremidade C-terminal apresenta maior variabilidade, sendo responsável pela regulação da atividade cinásica dessa proteína e também pela especificidade ao substrato e/ou interação com outras proteínas (SURPILI *et al.*, 2003).

Uma análise filogenética de 81 seqüências de Neks de diferentes eucariotos e 4 seqüências de outra família de cinases relacionadas produziram uma árvore filogenética com muitas ramificações (QUARMBY & MAHJOUB, 2005). A expansão da família Nek em diferentes isoformas pode estar relacionada à presença de cílios especializados e numerosos em sofisticados organismos unicelulares, visto que alguns membros dessa família parecem regular o crescimento dessas estruturas e sua manutenção e montagem ao longo do ciclo celular (QUARMBY & MAHJOUB, 2005). Na figura 1 está representado um esquema de relação filogenética entre Neks de diferentes grupos taxonômicos. Esse esquema, feito por QUARMBY E MAHJOUB (2005), utiliza a classificação filogenética baseada nas seqüências dessas cinases e quanto à presença de cílios. Na figura 2 está representada a árvore filogenética das Neks descritas em humanos que foi feita por RELLOS e colaboradores (2007) com base na seqüência dessas proteínas. Estudos filogenéticos utilizando clados permitem estabelecer relações evolutivas entre diferentes membros de uma mesma família de proteínas, determinando a forma ancestral, da qual diferentes formas derivaram e assim pode-se estimar função e interação proteína-proteína a partir da análise das seqüências e estruturas dessas proteínas.

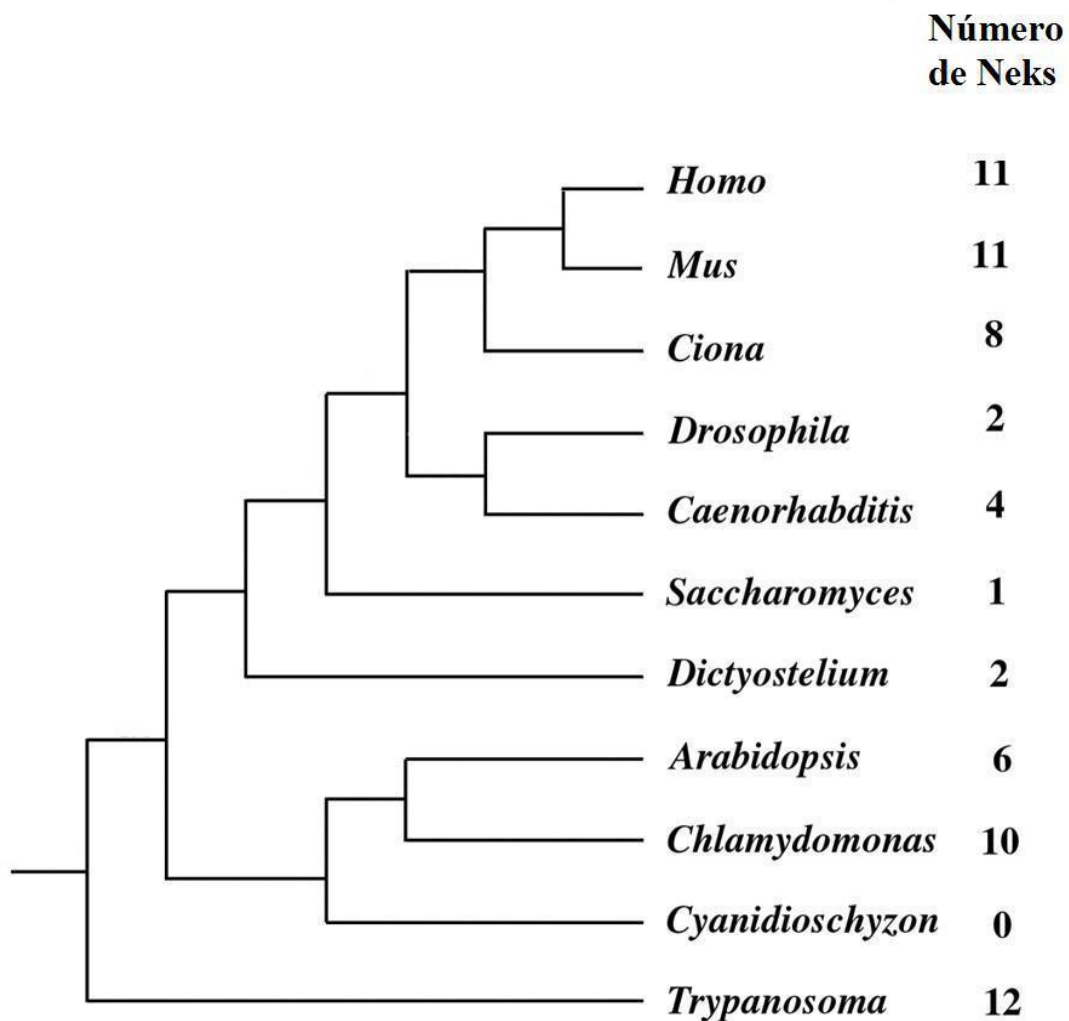


Figura 1: Árvore filogenética de organismos modelos indicando o número de Neks descritas. Homólogos da cinase NIMA foram identificados usando ferramentas de alinhamento do BLAST. Figura adaptada de QUARMBY & MAHJOUR, 2005.

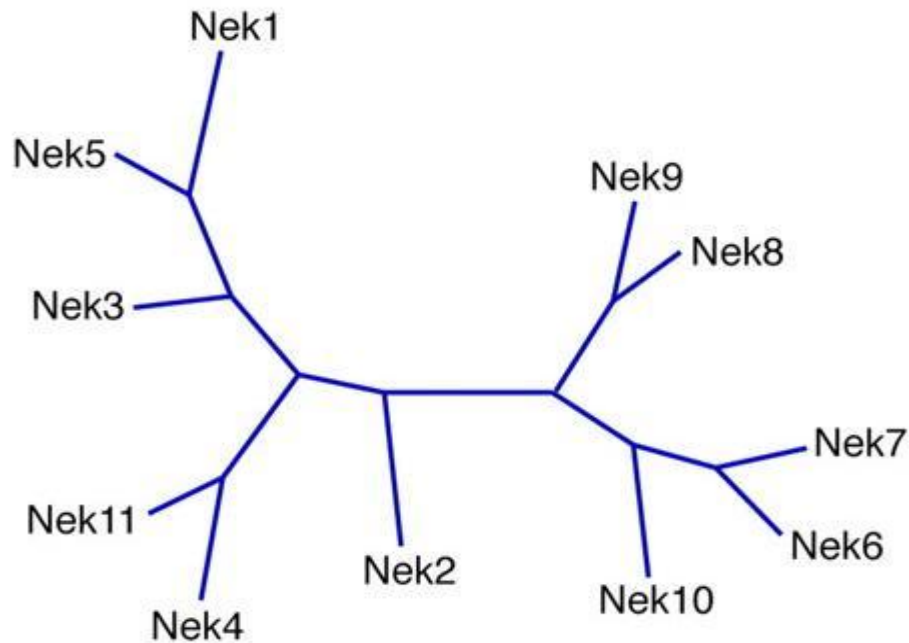


Figura 2: Árvore filogenética que mostra a relação entre as seqüências das onze Neks conhecidas em humanos. Figura adaptada de RELLOS *et al.*, 2007.

2.1 Nek2 e Nek11

Proteínas pertencentes ao clado Nek2/NIMA são os membros mais bem caracterizados da família Nek e incluem representantes em diferentes organismos, como fungos, insetos, mamíferos e nematódeos. As Nek2 de vertebrados desempenham papel importante na coordenação da estrutura do centrossomo durante o desenvolvimento do ciclo celular, permanecendo próxima a essa estrutura durante as fases do ciclo (FRY *et al.*, 1998b, O'REGAN *et al.*, 2007). A Nek2 é dimérica e ativa-se por autofosforilação (FRY *et al.*, 1999; FRY *et al.*, 1995).

Existem duas variantes da Nek2 por processamento (*splicing*) alternativo: a Nek2A, que é necessária para a separação do centrossomo na transição da fase G2 para a mitose (FRY, 2002); e a Nek2B, que é recrutada no centrossomo zigótico, sendo essencial para a manutenção dessa estrutura em estágios embrionários iniciais do desenvolvimento (FRY *et al.*, 2000; TWOMEY *et al.*, 2004; UTO & SAGATA, 2000). Recentemente descobriu-se uma terceira isoforma da Nek2 que ocorre por processamento alternativo (WU *et al.*, 2007).

A Nek2 também pode desempenhar um papel adicional nos pontos de controle (*checkpoints*), que são momentos do ciclo celular nos quais um grupo de proteínas confere se o ciclo está desenvolvendo-se corretamente e, a partir dessa verificação, a célula recebe sinais de que deve continuar o processo ou de que deve parar e ativar a cascata sinalizadora de apoptose (HAYWARD & FRY, 2006). Defeitos nos componentes dessa maquinaria de sinalização podem acarretar o desenvolvimento de doenças, como os cânceres, a partir do acúmulo de erros e mutações (HAYWARD & FRY, 2006). Danos ao DNA foram induzidos por radiação e agentes químicos e observou-se o decaimento da atividade da Nek2 e inibição da separação do centrossomo, acarretando na parada do ciclo antes da divisão, em G2. (FLETCHER *et al.*, 2004). Além disso, a PP1, uma fosfatase ativada pela ATM em situações de lesão ao DNA, mostrou interagir com a Nek2 inibindo-a e impedindo a formação do centrossomo (MI *et al.*, 2007).

Paralelamente aos estudos da Nek2, um grupo de pesquisadores encontrou a interação dessa proteína com a Nek11 (NOGUCHI *et al.*, 2004). A isoforma Nek2A é transladada para o núcleo e ativa a Nek11 durante a parada do ciclo entre G1 e S. Ainda não se sabe o papel da Nek11, mas acredita-se que atue no núcleo da célula, em pontos de controle entre a fase G1 e S. Além disso, observou-se a ativação dessa proteína sob situações de estresse de replicação e genotóxico (NOGUCHI *et al.*, 2002).

Recentemente a Nek2 teve seu domínio catalítico resolvido por cristalografia (RELLOS *et al.*, 2007). A estrutura apresentada nesse trabalho apresenta forma bilobar, característica de outras cinases, contendo um domínio rico em folhas beta e

um domínio rico em alfas-hélices. O ATP se liga entre os dois domínios e essa ligação é dependente da fosforilação da alça de ativação conhecida como *T Loop* (HUSE & KURIYA, 2002).

2.2 Nek6 e Nek7

As Nek6 e Nek7 são altamente similares, chegando a 87% de identidade no domínio catalítico entre as cinases murinas (KANDLI *et al.*, 2000). Ambas possuem a extremidade carbóxi-terminal curta e não possuem domínios ou motivos envolvidos em interação proteína-proteína, como a Nek2. Além disso, não há indícios de que elas se ativem por trans e/ou autofosforilação (BELHAM *et al.*, 2003). Entretanto, parecem ser ativadas por interação com outra cinase, possivelmente a Nek9 (ROIG *et al.*, 2002; BELHAM *et al.*, 2003). Embora originalmente tenham sido descritas como reguladoras da cinase p70 ribossômica S6 (BELHAM, 2001), existem evidências indicando que elas não possuem função independente uma da outra *in vivo* (LIZCANO *et al.*, 2002; BELHAM *et al.*, 2003) e que possivelmente elas fazem parte de uma cascata mitótica, combinando importantes funções para a progressão da mitose (BELHAM *et al.*, 2003). As Neks 6 e 7 não estão presentes em fungos e plantas superiores, dois grupos que “perderam” os centríolos/corpo basal e cílios ao longo da evolução. Esse fato leva à especulação sobre os efeitos regulatórios dessas cinases na formação do fuso mitótico, que está intimamente ligado aos centríolos e aos cílios (QUARMBY & MAHJOUR, 2005). Corroborando essa idéia, uma ortóloga da Nek6 em *Chlamydomonas*, CnK6p, foi encontrada no estudo do proteoma ciliar (PAZOUR *et al.*, 2005).

Mais recentemente, um estudo sobre a função da Nek7 encontrou sua participação na formação do fuso mitótico e na progressão da mitose de células de mamíferos (YIASSACHAR *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007). Nesse trabalho a Nek7 é encontrada no centrossomo e células silenciadas apresentam a parada do ciclo na prometáfase com a desorganização do fuso mitótico (KIM *et al.*, 2007).

2.3 Nek9/Nercc1

A Nek9, também conhecida como Nercc1, interage com a Nek6 e ambas provavelmente estão envolvidas na mesma cascata de sinalização (ROIG *et al.*, 2002). Ela existe como um oligômero e pode ativar-se, *in vitro*, por meio de autofosforilação no resíduo treonina 210 da alça de ativação. A microinjeção de anticorpos contra a Nek9 em células de cultura resultou em anormalidade no fuso mitótico e desalinhamento cromossômico (ROIG *et al.*, 2002). Estudos com a proteína ortóloga em *Xenopus leavis* revelaram que ela interage com o complexo de tubulina e parece ter papel importante na organização dos microtúbulos. A Nek6 e possivelmente a Nek7 parecem ser substratos da Nek9, que fosforila a Nek6 no resíduo Serina 206, ativando-a, entretanto, ainda não está claro se a Nek90 participa da rota cromossômica ou centrossômica de organização de microtúbulos (BELHAM *et al.*, 2003). Além de estar relacionada com a organização do citoesqueleto durante a mitose, TAN & LEE (2004) encontraram a Nek9 no núcleo associada com o complexo FACT, que facilita a transcrição de regiões da cromatina, e a formação desse complexo é importante para a progressão do ciclo celular através de G1 e S (TAN & LEE, 2004).

Em recente trabalho encontrou-se associação entre proteínas E1A de adenovírus com a Nek9 (PELKA *et al.*, 2007). Estudos de fracionamento subcelular e imunofluorescência mostraram que, primeiramente, a Nek9 se encontra no citoplasma com uma pequena porção dessa cinase no núcleo enquanto que as proteínas E1A localizam-se completamente no núcleo. Ocorre então a interação entre essas proteínas e a Nek9 passa a existir apenas no citoplasma. Mutantes para a Nek9 sem o domínio RCC1 central são capazes de interagir com as E1A, mas se acumulam no núcleo (PELKA *et al.*, 2007.).

2.4 Nek8

Outras duas Neks descritas permanecem sem função conhecida: a Nek1 e a Nek8. Estudos indicam a participação dessas cinases na etiologia de patologias humanas (UPADHYA *et al.*, 2000; BOWERS & BOYLAN, 2004). A Nek8 contém um domínio amino-terminal semelhante às outras Neks e um domínio em sua região central homólogo à RCC1, um fator de troca de nucleotídeos de guanina da GTPase Ran. Ainda não se conhece a função desse domínio central, mas sabe-se que essa cinase se ativa por multimerização e autofosforilação e, assim como a Nek3, sua expressão e atividade variam ao longo da progressão do ciclo celular (HOLLAND *et al.*, 2002). A Bicc2, uma homóloga humana da proteína Bicaudal D de *Drosophila* (BicD), parece ser substrato da Nek8. Em moscas, a Bicc2 está associada com microtúbulos e atua no desenvolvimento do animal. Em mamíferos, liga-se à dinamitina, uma subunidade da dinactina, e células na interfase apresentam essa proteína localizada principalmente no complexo de Golgi, possuindo propriedades de proteínas periféricas de vesículas (HOOGENRAAD *et al.*, 2001). Esses resultados sugerem a participação da Bicc2 nos mecanismos de transporte celular, uma vez que está presente na superfície da membrana de organelas. E a Nek8, ao fosforilar a Bicc2, poderia estar regulando esses eventos de transporte relacionados ao ciclo celular, uma vez que a Nek8 possui um domínio homólogo àqueles encontrados em proteínas que controlam o transporte celular. Entretanto, a Nek8 é expressa em poucos tecidos humanos e é superexpressa em câncer de mama (BOWERS & BOYLAN, 2004), mas o seu envolvimento na etiologia dessa doença ainda não está clara.

Um recente estudo, resumido na Tabela 2, relaciona a presença de células ciliadas e o número de proteínas Neks (QUARMBY & MAHJOUR, 2005).

Tabela 2*: Relação entre o número de Neks presentes em um organismo e a presença de células ciliadas.

Organismo	Num. de Neks	Células ciliadas	Divisão de cels. ciliadas
<i>Homo sapiens</i>	11	sim	sim
<i>Mus musculus</i>	11	sim	sim
<i>Ciona savignyi</i>	8	sim	sim
<i>Drosophila melanogaster</i>	2	sim	não
<i>Caenorhabditis elegans</i>	4	sim	não
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	não	não
<i>Dictyostellium discoideum</i>	2	não	não
<i>Arabydopsis thaliana</i>	6	não	não
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10	não	sim
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	0	não	não
<i>Trypanosoma brucei</i>	12	sim	sim

* dados da tabela retirados de QUARMBY & MAHJOUR, 2005.

Drosophila melanogaster e *Caenorhabditis elegans* apresentam células ciliadas e possuem menos Neks do que plantas superiores, como a *Arabidopsis thaliana*, que não possuem esse tipo celular (Tabela 2). Entretanto, as células ciliadas de *D. melanogaster* e *C. elegans* são altamente diferenciadas e não se dividem, não havendo assim uma coordenação entre o ciclo celular e os cílios. Os pesquisadores propõem que a família Nek expandiu-se concomitantemente à evolução de um sistema complexo de coordenação entre a progressão do ciclo celular e o aparecimento de estruturas como cílio, corpo basal e centríolos.

Neks são, portanto, uma família de cinases estruturalmente conservadas que estão presentes em diversos organismos. A função de alguns de seus membros é

conhecida, mas permanecem muitas questões relacionadas às interações e mecanismos dos quais participam. Em especial, a Nek1, por participar da etiologia da doença renal hereditária que mais acomete humanos (TORRES *et al.*, 2007; PEI, 2006), a doença policística do rim, merece maior atenção acerca de sua participação nos processos celulares.

3. Nek1

A Nek1 foi descrita inicialmente em 1992 (LETWIN *et al.*, 1992) como uma proteína serina/treonina-cinase relacionada à NIMA, com 42% de identidade entre suas extremidades catalíticas. Elas também possuem um arranjo estrutural semelhante, com o domínio cinásico na extremidade amino-terminal seguido por um longo domínio carbóxi-terminal (Figura 3). Mais tarde descobriu-se que a seqüência apresentada por LETWIN e colaboradores estava equivocada e a verdadeira Nek1 de mamíferos apresenta mais de 1200 aminoácidos e cerca de 175 kDa (FEIGE *et al.*, 2006). Em seu estudo, LETWIN e colaboradores também se equivocaram quanto ao ponto isoelétrico dessa proteína. Pensava-se que era básico, mas posteriormente foi observado que os aminoácidos da região C-terminal apresentavam caráter ácido, conferindo um ponto isoelétrico calculado de 5,34, e não 10 como estimado anteriormente. Além disso, a Nek1 apresenta seqüências de localização nuclear (NLS) e de exportação nuclear (NES) que podem estar relacionadas com sua função dentro da célula (SURPILI *et al.*, 2003). Na figura 4 está representado um esquema da estrutura da Nek1 inteira adaptado de FEIGE *et al.*, 2006.



Figura 3: Comparação estrutural entre as cinases Nek1 de mamíferos e a NIMA do fungo *Aspergillus nidulans*. A massa molecular e o ponto isoelétrico calculado de ambas as proteínas estão apresentados na figura. Figura adaptada de LETWIN et al., 1992.

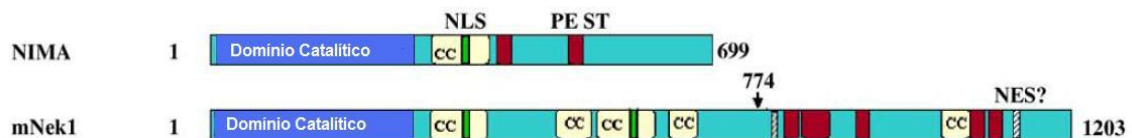


Figura 4: Comparação esquemática da estrutura da NIMA com a Nek1 de camundongo. cc, domínios super-hélice (*coiled-coiled regions*); NLS, sinal de localização nuclear; NES, sinal de exportação nuclear; PEST, previsão de motivos de degradação. Figura adaptada de FEIGE et al., 2006.

Muitos estudos foram feitos tentando caracterizar o papel dessa proteína nas células de mamíferos (LETWIN et al., 1992; ARAMA et al., 1998; UPADHYA et al., 2000; SURPILI et al., 2003; POLCI et al., 2004; MAHJOURB et al., 2005; FEIGE et al.,

2006; LENZ *et al*, manuscrito em preparação), mas ainda não se achou evidências diretas de sua função na fisiologia das células.

3.1 Nek1 e a Gametogênese

Transcritos de *nek1* foram encontrados em diferentes tecidos, mas abundantemente em gônadas de camundongos machos e fêmeas a partir da análise por hibridização de RNA *in situ* (LETWIN *et al.*, 1992; ARAMA *et al.*, 1998). Em alguns casos houve correlação entre a proliferação celular e os níveis de expressão da Nek1, como na camada granulosa (folicular) do ovário. Nesse caso, a atividade mitótica acompanha o aumento na expressão de Nek1, enquanto que o declínio na proliferação celular coincide com a queda nos níveis de mRNA de Nek1. No entanto, os mesmos autores não encontraram essa correlação nos demais tecidos estudados, como, por exemplo, no baço, onde baixos níveis de transcritos da *nek1* foram observados durante a indução de mitose com lipopolissacarídeos (LETWIN *et al.*, 1992). Os autores também sugerem que sua expressão poderia ser constitutivamente baixa em células proliferativas e sua atividade seria controlada a partir de modificações pós-transcricionais e/ou pós-transducionais. Os autores especulam, ainda, sobre o papel da Nek1 na meiose, visto que seu padrão de expressão parece ter correlação com a atividade meiótica das células germinativas estudadas.

Posteriormente, objetivando encontrar substratos e proteínas que interagem com a Nek1 durante a espermatogênese e a via sinalização da qual ela participa, um ensaio de duplo híbrido foi realizado utilizando uma biblioteca de cDNA de testículo de rato (FEIGE *et al.*, 2002). Nesse ensaio, observou-se a interação da Nek1 com o cDNA de uma nova proteína, a Nurit. A expressão desta última proteína ocorre em fases tardias da espermatogênese e especula-se sobre seu papel na eliminação de componentes citoplasmáticos. A Nurit apresenta em sua estrutura um motivo zíper de leucina, que pode estar envolvido em homodimerização e oligomerização ou na

interação com outras proteínas; e dois domínios super-hélice (*coiled-coil*). A interação dessa proteína com a Nek1 parece ser mediada pelo domínio super-hélice C-terminal. Entretanto, não se observou associação entre a atividade da Nek1 e a fosforilação e ativação da Nurit, permanecendo dúvidas sobre o papel dessas proteínas na espermatogênese.

3.2 A Doença Policística do Rim (PKD)

Um grupo de pesquisadores encontrou uma relação entre a Nek1 e a Doença Policística do Rim, a PKD (UPADHYA *et al.*, 2000). A PKD é uma nefropatia hereditária que acomete crianças em sua forma autossômica recessiva na proporção de um para 20.000, e adultos em sua forma autossômica dominante na proporção de um para 500, o que a torna a principal anomalia renal genética observada em humanos (IGARASHI & SOMLO, 2002). A doença recessiva ou infantil aparece, na maior parte das vezes, no primeiro ano de vida da criança e, geralmente, é detectada quando já se instalou um grave comprometimento da função renal. Durante o desenvolvimento dessa patologia, ocorre a formação de muitos cistos em ambos os rins (Figura 5). Os rins aumentam de volume e os tecidos perdem a sua funcionalidade gradativamente.

Nas crianças, a PKD provoca o aumento dos rins, acarretando protrusão do abdômen. Recém-nascidos gravemente afetados pela doença podem morrer logo após o nascimento, pois a insuficiência renal do feto provoca mal desenvolvimento pulmonar. O fígado também é afetado e, em torno dos 5 a 10 anos de idade, uma criança com esse distúrbio tende a apresentar hipertensão no vaso sanguíneo que conecta o intestino e o fígado (sistema porta). Finalmente, ela pode apresentar insuficiência hepática e insuficiência renal. Nos adultos, a doença policística do rim evolui lentamente, ao longo de muitos anos. Tipicamente, os sintomas começam no início ou no meio da vida adulta, embora, ocasionalmente, a doença seja descoberta apenas após a morte, na autópsia. Normalmente, os sintomas incluem desconforto

ou dor nas costas, sangue na urina, infecção e cólica de forte intensidade devida à presença de cálculos renais. Em outros casos, podem ocorrer fadiga, náusea, produção inadequada de urina e outras conseqüências da insuficiência renal, pois o indivíduo apresenta uma menor quantidade de tecido renal funcional. Mais de 50% dos indivíduos com essa doença acabam apresentando insuficiência renal em alguma época da vida. O tratamento das infecções urinárias e da hipertensão arterial pode prolongar a vida. Sem a diálise ou um transplante renal, a insuficiência renal pode ser fatal (STEINMAN, 2005).

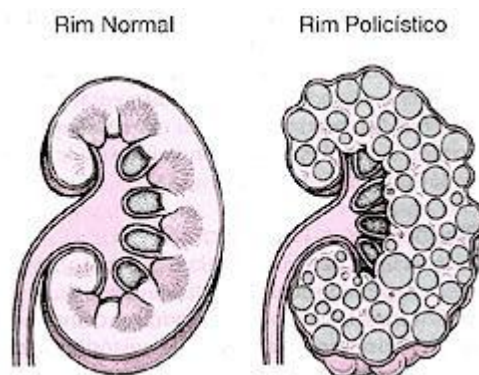


Figura 5: Comparação entre um rim normal e um rim afetado pela Doença Policística do Rim (PKD). Figura adaptada de www.msd-brazil.com.

Duas proteínas de membrana estão diretamente envolvidas na etiologia da PKD, a policistina-1 e a policistina-2 e mutações que alterem sua função fisiológica são responsáveis para o desenvolvimento dessa síndrome. A policistina-1 (PKD1), de aproximadamente 460 kDa e codificada pelo gene *pkd1*, apresenta onze hélices que atravessam a membrana citoplasmática e sua porção N-terminal voltada ao exterior celular (WILSON *et al.*, 2004). Sua porção C-terminal encontra-se no citosol e possui diversos sítios de reconhecimento por outras proteínas, incluindo os domínios SH2, SH3, super-hélices, domínios WW e uma seqüência de ativação por proteínas G heterotriméricas. A PKD1 atua como um mecanossensor de membrana

celular do epitélio renal, na membrana basal através de complexos de adesão focal, na membrana lateral via complexos juncionais célula-célula e na membrana apical via *cillium* central. A detecção de estímulos extracelulares leva à modulação de um complexo multiproteína-policistina por meio de cascatas intracelulares de sinalização e transcrição gênica que regulam a morfogênese epitelial (WILSON, 2004). Embora as policistinas sejam encontradas em diversos tecidos, vários estudos demonstraram seu papel-chave no desenvolvimento e diferenciação normais dos rins (VAN ADELSBERG *et al.*, 1997). Além de mutações das proteínas PKD1 e 2, alterações em outros genes podem estar envolvidas na etiologia da doença policística do rim e alguns trabalhos têm sido feitos visando encontrar associação de diferentes proteínas a essa doença (WITZGALL, 2005).

Em 2000, Upadhyia e colaboradores publicaram um trabalho relacionando a Nek1 à PKD e, a partir desse estudo, outros pesquisadores começaram a investigar a função da Nek1 em cílios e centrossomos (MAHJOURB *et al.*, 2005; FEIGE *et al.*, 2006; LENZ *et al.*, manuscrito em preparação) buscando uma explicação sobre o papel da Nek1 nessa patologia. Inicialmente Upadhyia e colaboradores caracterizaram dois alelos mutantes independentes, *kat* e *kat^{2j}*, que causam efeitos pleiotrópicos, incluindo dismorfismo facial, nanismo, esterilidade nos machos, anemia, anormalidade do plexo coróide e a progressão da PKD (VOGLER *et al.*, 1999), e, a partir disso, começaram a utilizar animais com essas mutações como modelos. Foi feito um mapa físico das mutações no cromossomo 8 de camundongos. Durante esse estudo de mapeamento com mutantes, observou-se um aumento da severidade da doença em alguns animais estudados, sugerindo que a modificação de alguns genes pode alterar as manifestações clínicas e a progressão da PKD. Ao estudar esses genes, encontraram o gene que codifica a Nek1 alterado nos mutantes *kat* e *kat^{2j}*. A análise por *Northern blot* encontrou uma redução no tamanho dos transcritos da *nek1* em testículos e rins de animais *kat* e *kat^{2j}* mutantes, indicando uma possível deleção no gene que codifica a Nek1 (UPADHYIA *et al.*, 2000). Considerando-se a presença da Nek1 em testículos e a esterilidade em machos *kat* mutantes, pode-se inferir um papel da Nek1 na espermatogênese. No entanto, uma

vez que fêmeas mutantes e homozigotas continuam férteis, essa cinase desempenharia funções diferentes nas células germinativas de machos e fêmeas (UPADHYA *et al.*, 2000).

3.3 Interação com outras proteínas

Um estudo seguinte, também utilizando ensaio de duplo híbrido a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, mostrou algumas proteínas que interagem com diferentes regiões da Nek1 (SURPILI *et al.*, 2003). Apenas a ZBRK1, um corressor que interage com a BRCA1 e inibe a transcrição do gene supressor de tumor *gadd45*, mostrou interação com o domínio cinase da Nek1. Entretanto, encontrou-se 10 proteínas que interagem com o domínio regulatório dessa cinase e pode-se dividi-las em três grupos: proteínas associadas à Doença Policística do Rim; proteínas que atuam no reparo do DNA na transição G2/M durante o ciclo celular e proteínas envolvidas na regulação do desenvolvimento e na função dos neurônios (SURPILI *et al.*, 2003).

No primeiro grupo, encontra-se a proteína de transporte motor KIF3A; a proteína sinalizadora tuberina e uma homóloga a α -catulina. O segundo grupo inclui uma homóloga da RAD54, a ATRX, a 53BP1, a MRE11A, a subunidade regulatória B56 da PP2A e a YWHAH. No terceiro grupo aparecem a Fez-1 e a Fez-2, que atuam no desenvolvimento de prolongamentos neuronais (BLOOM & HORVITZ, 1997), e novamente a KIF3A. Em trabalho anterior, foi encontrada a expressão da Nek1 em regiões do sistema nervoso central, principalmente em neurônios periféricos e motores, sugerindo o papel dessa cinase no crescimento e na manutenção dos prolongamentos neuronais (ARAMA *et al.*, 1998) e a interação com as proteínas Fez-1 e 2 poderia esclarecer a função da Nek1 nesses tipos celulares. Além disso, a maioria dessas proteínas tem propensão a formar regiões super-hélices, que estão frequentemente envolvidas na interação com outras proteínas, inclusive a própria Nek1.

Além disso, os resultados desse trabalho (SURPILI *et al.*, 2003) são interessantes para explicar a relação da Nek1 com a Doença Policística do Rim. Duas proteínas encontradas no ensaio de duplo híbrido, a KIF3A e a tuberina, estão associadas ao desenvolvimento da PKD quando seus genes se encontram alterados por mutações. A KIF3A pertence à família de cinesinas, que atuam no transporte celular na organização do citoesqueleto e no controle de transdução de sinais. Essa proteína é expressa em todas as células, mas é encontrada predominantemente no cérebro, no testículo e na medula adrenal (KONDO *et al.*, 1994; SURPILI *et al.*, 2003), e é importante para o desenvolvimento embrionário. Uma possível causa do dismorfismo facial e da esterilidade encontrada em machos de camundongos mutantes *Kat* (modelo animal para a Doença Policística do Rim) poderia ser a perda da fosforilação da KIF3A pela Nek1, que se encontra alterada nesses mutantes (UPADHYA *et al.*, 2000). A outra proteína encontrada, a tuberina, atua na determinação da localização correta da policístina-1 na membrana. Essa proteína interage com o complexo E-caderina/catenina na membrana e, no ensaio de duplo-híbrido, também se observou a interação da Nek1 com a α -catulina, uma proteína relacionada com a α -catenina. A função dessas proteínas se encontra alterada em modelos animais para a Doença Policística do Rim, e a possível interação da Nek1 com essas proteínas poderia auxiliar no desenvolvimento de uma explicação sobre o papel da Nek1 na etiologia dessa doença (SURPILI *et al.*, 2003).

3.4 Nek1 e função ciliar

Uma variedade de síndromes humanas está relacionada com defeitos na montagem, manutenção ou função de cílios (ONG & WHEATLEY, 2003; LI *et al.*, 2004). Ciliopatias, incluindo a doença policística renal, envolvem a desregulação da proliferação celular em conjunção com defeitos ciliares. Entretanto, a relação entre cílios e ciclo celular é pouco entendida. Na maioria das células ciliadas, a entrada no ciclo celular é precedida pela desmontagem dos cílios, e a saída da mitose é

acompanhada pela montagem ciliar, uma relação que pode refletir o uso dos corpos basais/centríolos como pólos do fuso mitótico (WHEATLEY *et al.*, 1996). Consistente com essa idéia, vias de sinalização importantes para o crescimento e diferenciação celular têm sido localizadas nos cílios (HUANGFU *et al.*, 2003) e algumas linhagens mutantes de *Chlamydomonas* defectivas em montagem ciliar apresentam problemas na progressão do ciclo celular, tal como atraso na transição G2/M (MAHJOUB *et al.*, 2002). Além disso, a membros de famílias de proteínas conhecidas por sua função mitótica têm sido atribuídos papéis na montagem ciliar, incluindo CALK, um parálogo distante da cinase aurora (PAN *et al.*, 2004), uma proteína cinase ativada por mitógeno (BERMAN *et al.*, 2003), e, interessante, Fa2p, uma proteína da família Nek identificada a partir de uma triagem por mutantes de *Chlamydomonas* defectivos em desflagelação (FINST *et al.*, 1998).

MAHJOUB e colaboradores (2004) mostraram, através de experimentos de fracionamento celular e de imunofluorescência, que Fa2p está localizada na extremidade proximal do axonema, tanto em *Chlamydomonas* quanto em células renais de camundongos. Um pouco antes da entrada das células no ciclo celular, ocorre a reabsorção dos flagelos e Fa2p acumula-se na base dos corpos basais/centríolos. Ela permanece associada com o pólo do fuso mitótico durante toda a divisão celular e retorna para o flagelo quando ele começa a regenerar, após a desflagelação ou na saída da mitose. A localização de Fa2p no mesmo sítio subcelular, em espécies não-relacionadas, sustenta fortemente a idéia de que essa família de cinases desempenha funções conservadas na coordenação entre função ciliar e progressão do ciclo celular. É ainda interessante notar que a proteína Fa2p também foi localizada no flagelo de *Chlamydomonas* (MAHJOUB *et al.*, 2004). Tais resultados sugerem fortemente a co-localização de Fa2p com o complexo cinesina na região de cílios e flagelos, mas estudos adicionais são necessários para fornecer pistas sobre a via reguladora da atividade do complexo cinesina.

Estudo recente de localização intracelular mostrou a presença da Nek1 murina próxima a centrossomos durante a interfase e a associação dessa cinase com o centro de organização de microtúbulos do fuso mitótico durante a mitose (MAHJOUB

et al., 2005). Em contraste, a Nek8 foi encontrada a regiões próximas a cílios primários, mas não nas células em divisão. Esses resultados sugerem que tanto a Nek1 quanto a Nek8 podem relacionar a organização da estrutura ciliar com a regulação dos centrossomos e do ciclo celular.

3.5 Envolvimento de Nek1 em vias de percepção de danos de DNA

A proteína NIMA em *Aspergillus nidulans* tem funções estabelecidas nos pontos de checagem durante a transição G₂/M, assim como pelo menos um de seus ortólogos em mamíferos, Nek2. Essa cinase fosforila a proteína reguladora da mitose Hec1, que está associada com os cinetócoros e é crucial para a segregação correta dos cromossomos entre as células filhas (CHEN *et al.*, 2002). A triagem de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano empregando-se o domínio regulatório de Nek1 (SURPILI *et al.*, 2003) resultou na identificação de várias proteínas envolvidas no reparo de quebras de fita dupla de DNA durante a fase G₂/S do ciclo celular. Dentre estas, foram encontradas MRE11, que participa da recombinação homóloga em *Saccharomyces cerevisiae* (BRESSAN *et al.*, 1999) e na ligação da dupla fita de DNA não-homólogos em mamíferos (HUANG *et al.*, 2002); ATRX, homóloga a RAD54 de *S. cerevisiae*, uma proteína importante para reparo de dsDNA via recombinação homóloga (DRONKERT *et al.*, 2000) e 53BP1, um mediador da checagem de danos de DNA (WANG *et al.*, 2002), que em *Xenopus laevis* está associada com a cromatina (ANDERSON *et al.*, 2001) e colocaliza-se com MRE11 após radiação (SCHULTZ *et al.*, 2000).

Em um estudo recente conduzido em células do epitélio tubular de rim humano (HK2), verificou-se que Nek1 está diretamente envolvida na resposta a danos de DNA induzidos por radiação ionizante (RI), sendo importante inclusive para a recuperação das células após o dano no DNA (POLCI *et al.*, 2004). Esses autores demonstraram que células expostas a doses subletais de RI têm a atividade cinásica da Nek1 aumentada minutos após a radiação, indicando sua atuação no início da resposta ao dano de DNA e independentemente do aumento do seu nível de

expressão. Apenas trinta minutos após RI há um aumento na expressão da Nek1, sendo mantida em altos níveis por algumas horas. Experimentos de imunofluorescência demonstraram que, concomitantemente com o aumento da atividade cinásica, uma porção da Nek1 redistribuiu-se progressivamente do citoplasma para núcleo, sendo detectada como focos nucleares discretos em sítios de quebra de DNA dupla fita, juntamente com outras proteínas conhecidas por atuarem no reparo de DNA. Nas mesmas células após a radiação, Nek1 foi colocalizada juntamente com γ -H2AX e NFB1/MDC1. γ -H2AX é uma forma ativada de histona fosforilada especificamente no resíduo serina 139 pela cinase ATM (SHILOH, 2003), e que interage diretamente com quebras de DNA dupla fita (PAULL *et al.*, 2000). NFB1 é uma proteína associada à cromatina e que provavelmente atua como sensor de danos de DNA (SHANG *et al.*, 2003). POLCI *et al.* (2004) sugerem a atuação de Nek1 como uma cinase proximal ou iniciadora de uma cascata de sinalização, similar à ATM, mas que atuaria em alguns tipos celulares específicos, tais como células do epitélio renal tubular, espermatogônias e certos neurônios. Esses tecidos foram descritos como locais de abundante expressão de Nek1 (LETWIN *et al.*, 1992; ARAMA *et al.*, 1998) ou por apresentarem conseqüências patológicas específicas quando Nek1 é inativada (VOGLER *et al.*, 1999; UPADHYA *et al.*, 2000).

4. Estresse Genotóxico

O estresse genotóxico é caracterizado como uma situação na qual o material genético de um organismo está sendo atacado por fatores ambientais, sejam de origem biótica ou abiótica, que podem causar modificações na molécula de DNA. Essas modificações trazem conseqüências bastante desastrosas para a célula e por isso mecanismos de reposta a essa situação de estresse genotóxico acabam por se desenvolverem. A célula pode “optar” por seguir diferentes vias, dependendo da dimensão do dano causado (esquematizado na figura 6). Após o dano, a célula pode

parar seu ciclo para que a maquinaria de reparo atue. Dependendo do tipo e do grau da lesão, a célula pode reparar o dano e seguir o ciclo ou pode iniciar a via de morte programada. Ela pode ainda tolerar a lesão e continuar viva. Células deficientes em alguma via de reparo podem ser incapazes de reparar o dano e conseqüentemente iniciar a via de morte celular ou acumular danos que podem levar ao desenvolvimento do câncer ou de doenças degenerativas (SCHARER, 2003).

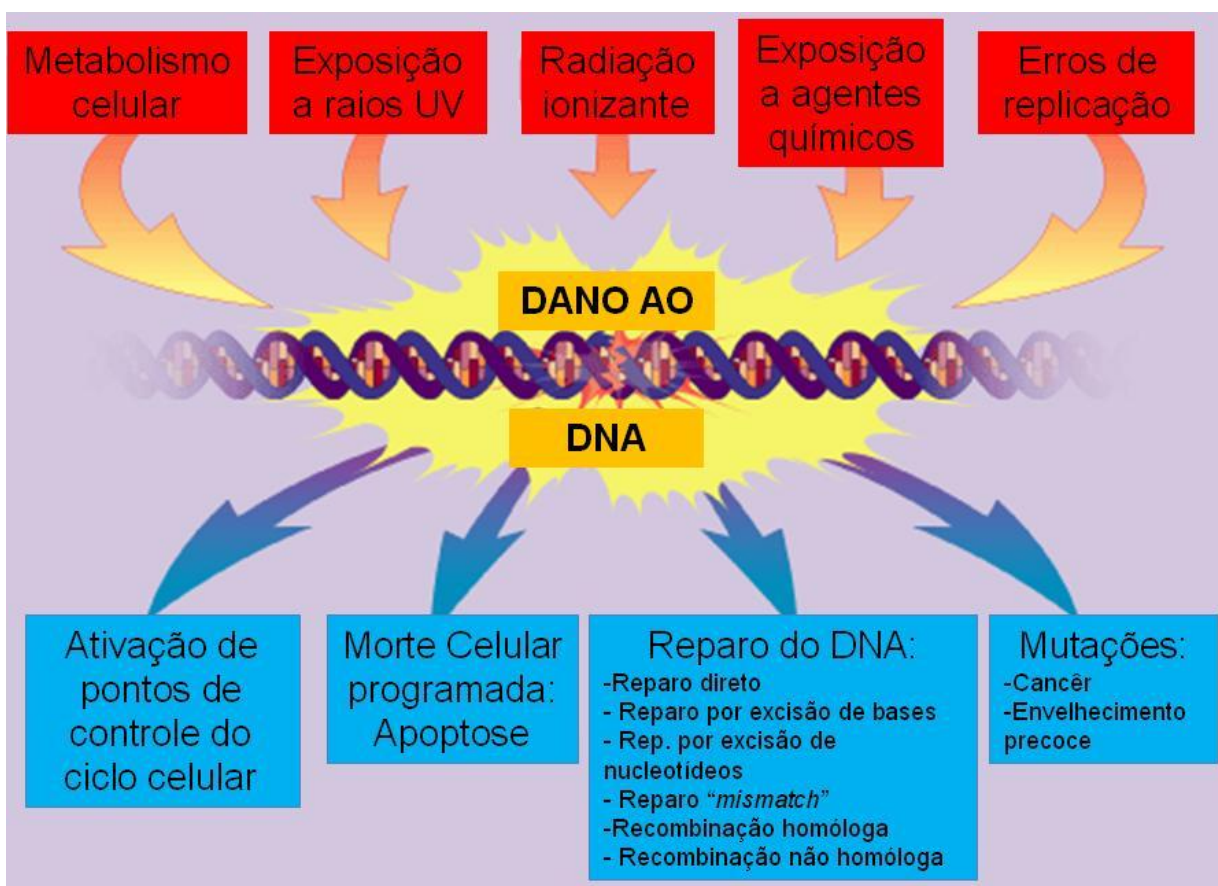


Figura 6: Respostas celulares aos danos ao DNA. As lesões ao material genético podem ser causadas por diferentes fontes abióticas ou bióticas. A resposta celular a esses danos pode envolver a ativação de pontos de checagem do ciclo (*checkpoints*), morte celular, reparo e desenvolvimento de mutações. Esquema adaptado de www.rndsystems.com.

4.1 Danos ao DNA

Os danos na molécula de DNA compreendem modificações químicas que ocorrem nas bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), na desoxirribose e na ponte fosfodiéster. Essas modificações, em geral, são provenientes da exposição solar (radiação UV), da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), através de diferentes processos metabólicos e de substâncias químicas de origem natural ou sintética.

De todas as alterações químicas que podem ocorrer no DNA, as bases modificadas são as mais comuns e também as mais danosas, quando não reparadas corretamente. Os processos químicos que originam essas modificações são bastante complexos e resultam de uma interação do agente com a molécula de DNA (EVANS *et al.*, 2004). As bases modificadas mais prevalentes são a 8-oxiguanina e a timina-glicol. A primeira geralmente resulta na substituição do tipo G para T, mas pode também produzir o emparelhamento errôneo da adenina produzindo uma substituição do tipo A para T. (CHENG *et al.*, 1992). A segunda é considerada pouco mutagênica e causa substituições do tipo T para C, entretanto pode provocar modificações na estrutura do DNA e conseqüente parada na replicação (MCNULTY *et al.*, 1998) Existem ainda os dímeros de pirimidina que podem ser causados pela radiação solar e que também podem causar a parada nos processos de replicação e transcrição (RAVANAT *et al.*, 2001).

Outro tipo de modificação são os adutos, ligações covalentes que ocorrem entre algumas moléculas químicas e o DNA. Essas modificações podem ser classificadas como adutos monofuncionais quando se ligam a apenas uma base nitrogenada e bifuncionais (ou multifuncionais) quando são capazes de se ligar a mais de uma base na mesma fita (intracadeia) ou em fitas diferentes (intercadeias) formando ligações cruzadas conhecidas como *crosslinks* (SCHARER, 2005). Como agentes monofuncionais encontramos os agentes alquilantes como o Metil-metanosulfonato (MMS) utilizado nesse presente estudo (figura 7A). Entre os agentes bifuncionais estão compostos de importância médica como a cisplatina, o psoraleno e a mitomicina C. Em nossos experimentos nós utilizamos a cisplatina

(figura 7B), um importante agente quimioterápico utilizado em tumores de testículos e ovários (BOSL & MOTZER, 1997). A ação genotóxica desse agente se deve à formação de adutos bifuncionais de DNA do tipo *crosslink* intra e intercadeias entre guaninas situadas em regiões do DNA ricas em GpC (DRONKERT & KANAAR, 2001). Ocorrem grandes distorções na molécula de DNA as quais podem resultar em quebras das fitas e bloqueios na replicação e transcrição (SCHARER, 2003).



Figura 7: Agentes genotóxicos utilizados nesse trabalho. (A) Metil-Metanosulfonato; (B) Cisplatina.

Outro tipo comum de lesão ao DNA são as quebras que podem ser simples (SSB – *single strand break*) ou duplas (DSB – *double strand break*). Essas quebras podem ocorrer como resultado do ataque de agentes químicos ou físicos à ponte fosfodiéster, do bloqueio no processo de replicação ou da ação de enzimas específicas com funções de reparação ou que atuam no metabolismo geral do DNA (SCHARER, 2003). As quebras simples são consideradas menos tóxicas para as células e milhares de SSBs são geradas por dia em células de mamíferos como resultado das atividades de reparação ou metabólicas do DNA (CALDECOTT, 2001). A baixa toxicidade das SSBs se deve à rápida reparação que ocorre pela via SSB *repair* (SSBR). A deficiência de reparo desse tipo de lesão pode levar a ocorrência de

patologias como a ataxia espinocerebelar e outros processos neurodegenerativos (CALDECOTT, 2003; CALDECOTT, 2004). As lesões do tipo DSBs são consideradas mais tóxicas para a célula e quando não reparadas corretamente podem originar mutações e rearranjos cromossômicos, características da instabilidade genética, podendo acarretar na perda de cromossomos e na morte celular (KAINA, 2003; DUDAS & CHOVANEC, 2004).

4.2 Tipos de reparo ao DNA

A reparação do DNA é um processo bioquimicamente complexo, o qual emprega inúmeras proteínas com funções distintas. Vários mecanismos de reparação celular envolvendo etapas multi-enzimáticas são capazes de remover rapidamente diferentes tipos de lesões produzidas no DNA de acordo com a natureza ou a extensão do dano. Complexos protéicos envolvidos na reparação definem as chamadas 'vias de reparação de DNA' e são responsáveis pela manutenção do genoma em quaisquer condições fisiológicas. Interessantemente, uma sobreposição funcional entre as diferentes vias de reparação de DNA é a via de regra na célula em vez da exceção (LINDAHL & WOOD, 1999; SLUPPHAUG *et al.*, 2003), de forma que vários complexos atuam ao mesmo tempo na reparação de diferentes tipos de danos. A resposta a agentes que induzem dano ao DNA é parcialmente mediada pela ativação de cascatas de sinalização celular que envolvem diversas proteínas sinalizadoras que serão vistas a seguir.

A reparação direta envolve dois mecanismos principais: a fotorreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família de fotolases/criptocromos (THOMPSON & SANCAR, 2002) e a reversão de bases alquiladas, catalisadas pelas DNA-metiltransferases (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Existe ainda a reparação por excisão, formada por três mecanismos principais: a excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER), a excisão de bases (*base excision repair* – BER) e a reparação de erros de emparelhamento de bases (*mismatch repair* – MMR)

(CHRISTMANN *et al.*, 2003; SCHARER 2003). Tanto as vias de reparação direta quanto a de excisão são essenciais para a remoção de bases modificadas e adutos, de forma que respondem por grande parte da atividade de reparação do DNA na célula (HUANG *et al.*, 1994; REARDON *et al.*, 1997; MEMISOGLU & SAMSON, 2000). Outro tipo de mecanismo de reparo está relacionado com quebras na fita do DNA, são as reparações por recombinação. A reparação recombinacional pode ser homóloga (HR) ou não homóloga (NHEJ) dependendo do tipo de lesão a ser reparada e das vias ativadas. Inicialmente pensou-se que a NHEJ era a via predominante de reparo de DSBs em eucariotos superiores, incluindo humanos, e que a HR prevalecia nos eucariotos inferiores como na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Atualmente se aceita a idéia de que ambos os mecanismos são importantes para todos os eucariotos e que a escolha de uma via está relacionada com o tipo de dano e com o progresso do ciclo celular (SCHARER, 2003). Entretanto, as vias HR e NHEJ podem ter funções sobrepostas para a manutenção da integridade cromossomal em eucariotos (TAKATA *et al.*, 1998; SCHARER, 2003).

Existem dois modelos conhecidos da via de reparo HR: a reparação de quebras duplas (*double strand break repair* – DSBR) e a síntese dependente de anelamento de fita (*synthesis-dependent strand annealing* – SDSA) sendo que o modelo DSBR é a principal via HR na célula (KROGH E SYMINGTON, 2004).

A função primária da HR em células mitóticas, independente do modelo proposto, é a reparação de DSBs ou SSBs que se formam ou em consequência do colapso da forquilha de replicação de DNA ou resultante da ação de diferentes mecanismos de reparação de bases modificadas ou adutos (KROGH & SYMINGTON, 2004). A HR também é requerida para a manutenção telomérica e para a meiose sendo essencial para estabelecer uma conexão física entre cromossomos homólogos a fim de assegurar a correta disjunção dos mesmos na primeira divisão meiótica. Adicionalmente, a alta frequência de recombinação meiótica promovida pela HR contribui para a geração de diversidade genética observada nos gametas (KROGH & SYMINGTON, 2004).

A HR é uma rota muito complexa que utiliza a molécula de DNA homóloga intacta como molde para reparar DSBs com fidelidade. O primeiro passo no reparo de quebras por HR é o processamento da extremidade 3' pela ressecção nucleolítica da fita 5' - 3' promovida pelo complexo protéico RAD50/MRE11/XRS2. Ocorre a formação de extremidade invasivas do tipo 3' (*single-stranded tails*) que serão usadas na procura de uma molécula homóloga molde. Uma vez que as extremidades 3' fita simples estejam disponíveis, a proteína RAD51 liga-se a estas e inicia o evento de invasão a uma fita homóloga, facilitada pela mediação das proteínas RAD54 e RPA, as quais são responsáveis pela eliminação de estruturas secundárias da região 3' terminal. Desta maneira, a região 3' terminal da fita danificada é restaurada por uma DNA-polimerase que copia as informações da fita intacta. Terminada a extensão, as extremidades livres são novamente reunidas pela DNA-ligase I. Entretanto esse processo gera junções do tipo *Holliday* que necessitam ser resolvidas a fim de gerarem duas moléculas de DNA intactas (JACKSON, 2002; SCHARER 2003; KROGH & SYMINGTON, 2004;). Na figura 8 está apresentado um esquema exemplificando o mecanismo descrito (adaptada de JACKSON, 2002). A resolução das junções *Holliday* é realizada pelas enzimas MUS81 e MMS4, as quais pertencem à família XPF de endonucleases estrutura-específicas (HEYER, 2004). O resultado final da resolução dessas junções pode ser ou não a permuta de fitas (*crossover*), especialmente durante o processo de recombinação meiótica (KROGH & SYMINGTON, 2004).

Em seres humanos existem duas patologias conhecidas associadas a deficiência na via HR, a anemia de Fanconi, cujos pacientes apresentam alta instabilidade cromossômica e propensão a leucemias de origem mielóide (FAIVRE *et al.*, 2000), e a síndrome de Bloom, na qual os pacientes apresentam a alta propensão a desenvolver diferentes tipos de tumores, além de apresentarem instabilidade cromossômica associada (ELLIS & GERMAN, 1996).

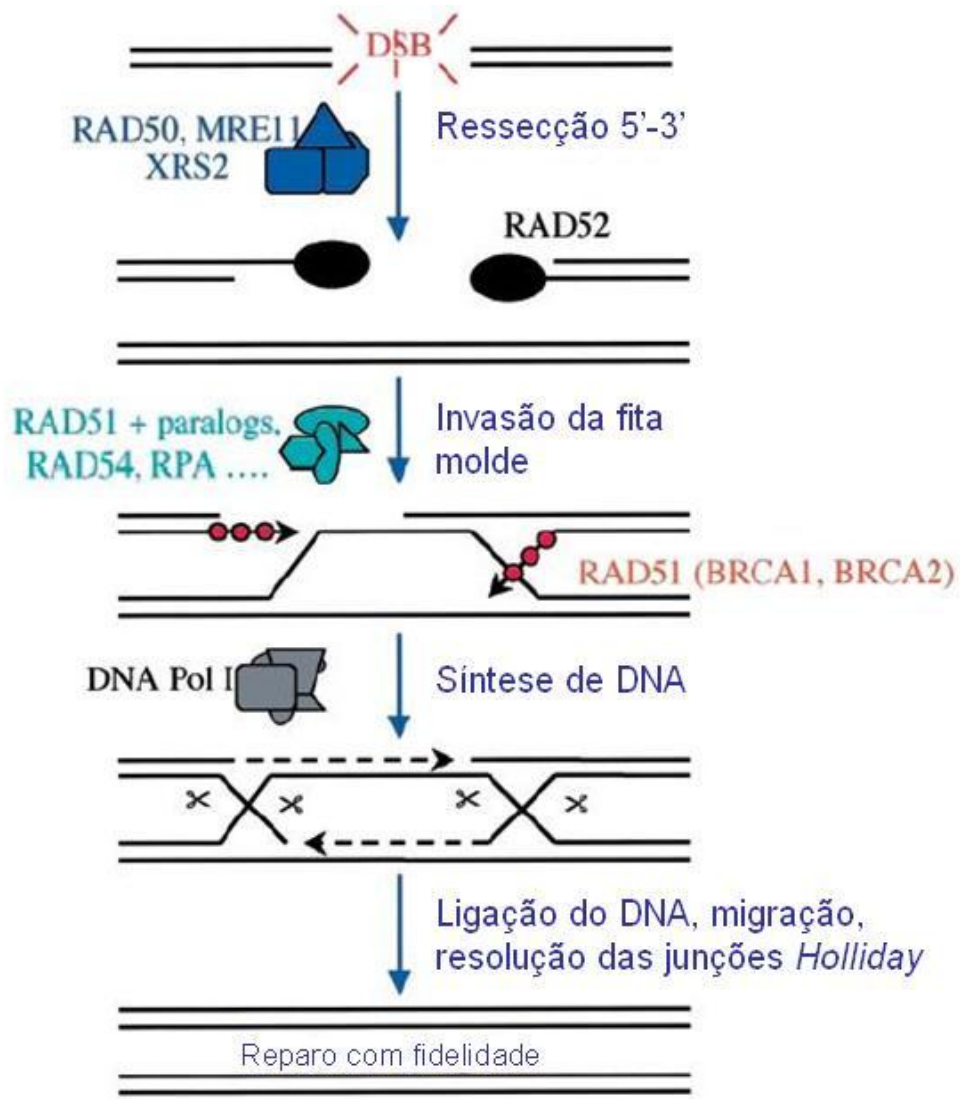


Figura 8: Visão geral do reparo de DSBs por HR em eucariotos superiores. A lesão é reconhecida e a extremidade 3' sofre ressecção pelo complexo RAD50/MRE11/XRS2. Ocorre então o pareamento com uma molécula de DNA homóloga que é invadida pela ação da RAD51, que interage com a BRCA1 e 2. O próximo passo é a síntese e a ligação do DNA ocorrendo a formação de junções *Holliday*, que serão resolvidas por um mecanismo ainda desconhecido, mas que necessita do recrutamento da MUS 81. Figura adaptada de JACKSON, 2002.

A recombinação não homóloga ou NHEJ representa um dos ramos principais da via recombinacional. Em contraste com a HR, essa via não necessita de um molde homólogo e parece ser um mecanismo mais simples de reparo com a recombinação homóloga (SCHARER, 2003). Diversas subvias de reparação pertencentes ao mecanismo de NHEJ são conhecidas, apresentando características próprias, mas cujo resultado final é a reparação de DSBs sujeita a erros.

A NHEJ é iniciada pelo heterodímero Ku70/Ku80, que seletivamente se liga à extremidade do DNA e recruta a proteína cinase DNA-PK. Essa proteína é capaz de fosforilar a si mesma e a outras proteínas, incluindo as Ku, a Xrcc4 e a p53. O heterodímero Ku70/Ku80 protege as extremidades do DNA contra a degradação e sinaliza a região de dano para os demais componentes da via (MILNE *et al.*, 1996; SIEDE *et al.*, 1996). A ligação entre as duas extremidades do DNA requer a presença dos complexos RAD50/MRE11/NBS1 e Xrcc4/DNA-ligase IV e conseqüentemente ambos podem interagir com as proteínas Ku. O reparo é finalizado pelo processamento da fita com a ação da Rad27p e da Pol4p e pela ligação das extremidades pela Dnl4p/Lif1p (JACKSON, 2002). Na figura 6 está demonstrado um esquema geral do mecanismo de reparo pela NHEJ.

Inúmeras patologias associadas com a NHEJ foram descritas em humanos e outros mamíferos. Essas deficiências, em grande parte, resultam no aumento da incidência de tumores malignos, envelhecimento precoce, inviabilidade embrionária e instabilidades cromossômicas de diferentes naturezas (ILIAKIS *et al.*, 2004).

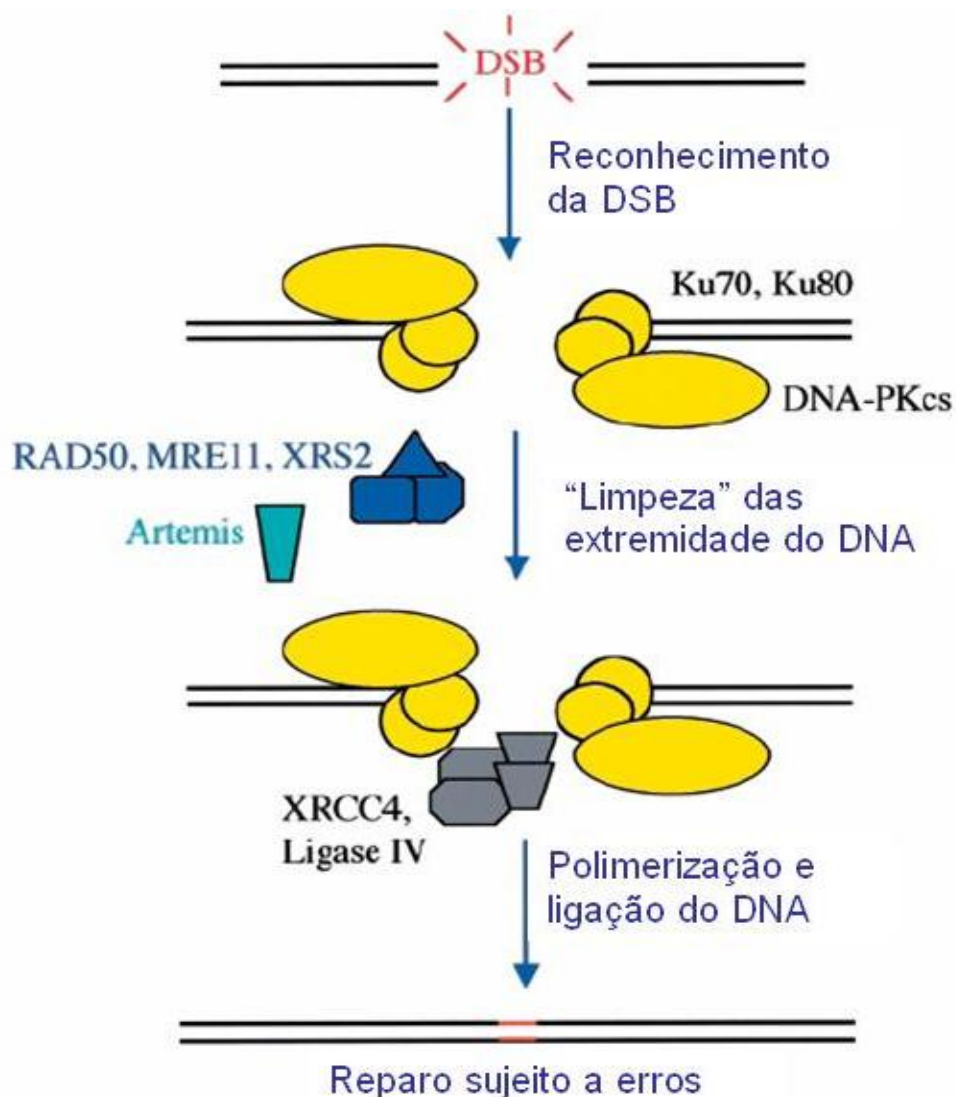


Figura 9: Representação esquemática da rota de reparo NHEJ em eucariotos superiores. Inicialmente as extremidades são reconhecidas pelas proteínas Kus, que se ligam a elas e recrutam as cinases DNA-PKs. Em seguida, a XRCC4, juntamente com a DNA-ligase IV, se reúne ao complexo proteína-DNA e a XRCC4 é fosforilada pelas DNA-PKs. Então a DNA-ligase IV promove a religação entre as extremidades do DNA livre. O complexo MRE11/RAD50/NBS1, que possui atividade de exo e endonuclease e de helicase, pode atuar no processamento após a ligação. Entretanto, é possível que outras nucleases estejam envolvidas, como a Ártemis em mamíferos e a RAD 27 em *S. cerevisiae*. Figura adaptada de JACKSON, 2002.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O objetivo geral do presente trabalho é caracterizar o envolvimento da cinase humana Nek1 na sinalização do reparo da lesão do DNA. Para isso, utilizamos linhagens de células humanas, RNA de interferência (RNAi) e células que expressavam a Nek1 como controle.

Objetivos Específicos:

- Obter linhagens com a Nek1 silenciada e expressando o gene-repórter da GFP. Obter a linhagem controle expressando Nek1 e GFP.
- Avaliar, através do ensaio cometa, se o índice de dano ao DNA das linhagens silenciada e controle é semelhante quando expostas a diferentes agentes genotóxicos.
- Verificar como ocorre o reparo do material genético dessas linhagens após um período de recuperação do estresse genotóxico.
- Testar a sensibilidade dessas linhagens aos agentes utilizados no ensaio cometa;
- Realizar estudos de progressão do ciclo celular das linhagens utilizadas nesse trabalho para posterior análise do efeito do estresse genotóxico no ciclo celular.
- Verificar a existência de proteínas de interação com a Nek1 através de ensaio de imunoprecipitação e espectrometria de massas para posteriores ensaios, utilizando situações de estresse genotóxico.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Anticorpos

Anticorpos anti-Nek1 e anti-pNek1 foram gerados conforme descrito em LENZ et al (manuscrito em preparação). O anticorpo anti-Nek1 humana endógena foi desenvolvido pela imunização de coelhos com o peptídeo CMADGAYQEDNDE e o anticorpo anti-pNek1 foi desenvolvido pela imunização com o fosfopeptídeo CVELART(PO4)SIGTP.

2. RNAi

Vetores lentivirais foram produzidos pela co-transfecção de pLL3.7 contendo a seqüência específica para a Nek1 humana (G[2127]CGAGAAATACTTCGTAGA; iniciador A[1]TG), juntamente com os vetores auxiliares CMV-VSVG, RSV-REV e pMDLg/pRRE em células HEK293 (Rubinson *et al.*, 2003). Após 48 h, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 5000 *g* por 10 min, filtrado através de uma membrana de 45 um e adicionado a culturas de células U87 e Hek293t com 50% de confluência na presença de 100 µg/ml de polibreno. Células expressando GFP foram isoladas por plaqueamento em baixa densidade e seleção de colônias GFP+positivas.

3. Agentes genotóxicos

O metil-metanosulfonato (MMS), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a cisplatina (*cis*-Diammineplatinum(II) dichloride) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

4. Cultura de Células

Células de epitélio renal humano, HEK293t, selvagens e silenciadas por RNAi foram cultivadas em condições padrões em DMEM *high* glicose (Dulbecco's Modified Eagle Médium – Gibco™), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos. As células de glioma humano U87 foram mantidas nas mesmas condições em meio DMEM *low* glicose. Ambas as linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e foram colhidas por tratamento com tripsina 0,15% e EDTA 0,08%.

5. Contagem de células em Câmara de Neubauer:

Antes dos ensaios cometa e de sobrevivência, as células foram contadas e câmara de Neubauer da seguinte forma: as células foram coletadas dos frascos de cultura, diluídas e colocadas sobre a Câmara de Neubauer, contou-se os 4 quadrantes das extremidades (em aumento de 10x na objetiva) e faz-se a média, sendo que foram contadas apenas células que estavam em cima das linhas mais fortes, usando o esquema do L para não contá-las 2 vezes. Quando a diferença foi superior a 10 células entre os quadrantes a contagem foi repetida. Multiplicou-se a média encontrada pelo volume usado na diluição e dividiu-se por 0,1, encontrando assim a quantidade de células total no volume utilizado.

6. Tratamentos

Para o ensaio cometa as células foram tratadas com metil-metanosulfonato (MMS) nas doses 200, 400 e 800 µM por 2 horas , com peróxido de hidrogênio nas concentrações 20, 50 e 100 µM 30 minutos e com cisplatina nas doses 2,5 , 5 e 10

$\mu\text{g/ml}$ por 1 h. Nos ensaios de sobrevivência os tratamentos foram feitos por 24, 48 e 72 horas.

7. Ensaio Cometa

Uma técnica muito utilizada para analisar e quantificar danos ao DNA é o *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*, também conhecido por Ensaio Cometa. Essa técnica permite estimar dano e reparo do DNA em células proliferativas e não-proliferativas, individualmente, empregando-se amostras celulares extremamente pequenas. É utilizado essencialmente para estimar quebra de fita simples e dupla de DNA, mas outros tipos de danos podem ser estudados a partir da introdução de lesões específicas (COLLINS, 2004). A versão utilizada nesse trabalho, em pH alcalino, foi descrita por SINGH *et al.*, (1988), com pequenas modificações (HARTMANN & SPEIT, 1997) e permite estimar danos como sítios álcali-labeis, ligações inter e intracadeia e quebras de simples e dupla fita de DNA (COLLINS, 2004).

O teste cometa em pH alcalino está representado na Figura 1. Após os tratamentos, as células foram colhidas e dissolvidas em agarose *low-melting point* 0,75% (LMPA) e então espalhadas sobre uma lâmina de microscopia com pré-cobertura de agarose (1,5%). As lâminas foram feitas em duplicata para cada tratamento. As células foram lisadas com uma solução de lise pH 10 contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO por no mínimo uma hora. Após a lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. Para permitir o desenrolamento do DNA, as lâminas ficaram incubadas por 20 minutos em tampão alcalino (pH entre 13 e 13,5) feito no momento de uso, contendo 300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH ~13.0 a 4°C. Uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) foi aplicada por 20 minutos a 4°C. As amostras foram então neutralizadas com 0,4 M Tris, pH 7.5. Após estarem secas, as lâminas foram fixadas em ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5% e glicerol 5% e então

coradas com solução de coloração contendo carbonato de sódio 5%, nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilícico 0,25% e formaldeído 0,15%. A reação foi parada com ácido acético 1%.

As células foram analisadas em microscópio óptico. Imagens de 100 células foram analisadas por lâmina e classificadas visualmente dentro de cinco classes de acordo com o tamanho da cauda, variando de 0 - célula sem dano, a 4 - células com máximo de dano (figura 2). Os valores do índice de dano (ID) foram calculados de acordo com essa classificação. O índice de dano ficou em uma faixa de 0 (células sem nenhum dano: 100×0) a 400 (células com máximo de dano 100×4). A frequência de danos (FD) é calculada diminuindo o número de células sem danos (0) por 100 e é expressa em porcentagem (PICADA, *et al.*, 2003; PEREIRA, *et al.*, 2006).

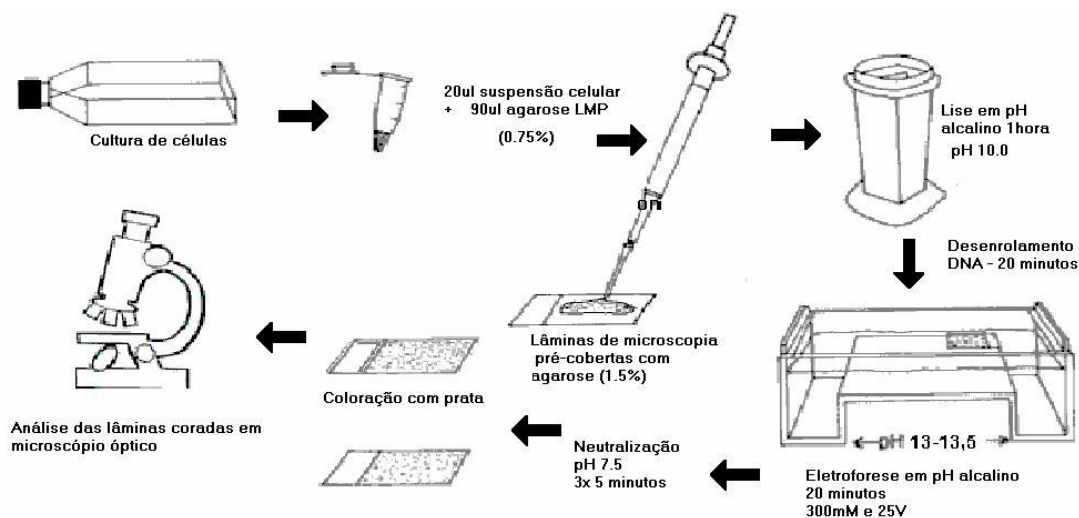


Figura 1: Metodologia do Ensaio Cometa em pH alcalino segundo Singh *et al.* (1988) com pequenas modificações por Hartmann & Speit (1997).

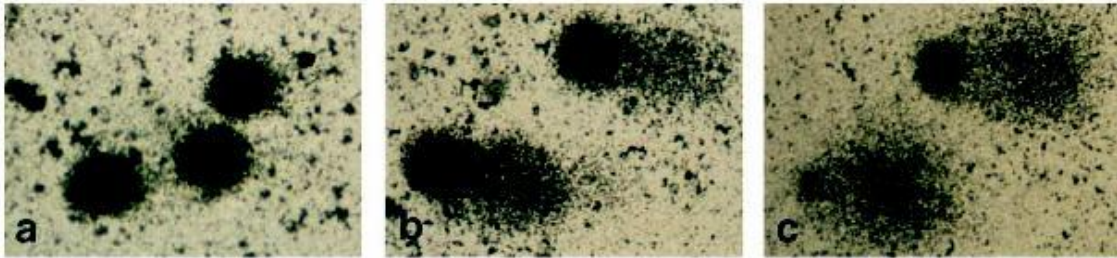


Figura 2: Células do Ensaio Cometa coradas com prata. a) tipos 0 e 1; b) tipos 2 e 3; c) tipo 4.

8. Ensaio de proliferação celular (MTT)

Esse ensaio é baseado na capacidade da desidrogenase mitocondrial de reduzir o sal de tetrazólio (thiazolyl blue tetrazolium bromide – MTT, Sigma) em cristais de formazan. O número de células viáveis é diretamente proporcional a formação do produto formazan (MOSMANN , 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células por poços) com meio completo. No dia seguinte foram tratadas e incubadas por 24, 48 e 72 h com os agentes genotóxicos. Após o período de incubação o meio de cultivo foi aspirado e substituído pela solução de MTT dissolvido em tampão fosfato salina e a placa ficou incubada a 37 °C por 3 h. Então a solução de MTT foi aspirada e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. Após 10 minutos, a placa foi analisada em leitor do tipo Spectramax utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Posteriormente os índices de sobrevivência foram calculados em porcentagem a partir do controle não-tratado. Todas as leituras tiveram o valor do *background* (leitura do poço apenas com o mutágeno diluído no meio, sem as células) do agente utilizado subtraído.

9. Citometria de Fluxo

Células U87 foram sincronizadas na fase G1 do ciclo celular por depleção de soro fetal bovino (0,25% de SFB) no meio de cultivo por 48 horas. Elas então foram coletadas e fixadas em etanol 70% a 4° C. Foram lavadas com PBS e ressuspensas em solução contendo PBS, RNase e o corante Iodeto de Propídeo que possui afinidade por DNA. Após um período de 10 minutos, foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson). Os resultados foram avaliados utilizando os programas WinMdi 2.8 e Cylchred (disponíveis em <http://facs.scripps.edu>).

10. Preparo das células e Eletroforese

As células foram coletadas da cultura e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS foram novamente centrifugadas, descartando o sobrenadante posteriormente. As células foram ressuspensas em solução de lise (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -glicerolfosfato, 2 mM Na_3VO_4 , 25 nM caliculina A, 1% TX100, inibidores de proteases EDTA-free tablets da Roche) e incubadas por 5 minutos a 4° C. Uma nova centrifugação de 1200 g foi realizada a 4° C por 5 minutos. O precipitado foi descartado e adicionou-se o tampão de amostra (250 mM de Tris-HCl pH 6.8, 1% de SDS, 0.25% de azul de bromofenol, 50% de glicerol e 2% de β -mercaptoetanol) ao sobrenadante. As amostras foram incubadas a 95° C por 5 minutos e aplicadas no gel (SDS-PAGE 9%). A eletroforese foi processada em cubas contendo tampão de corrida (25 mM Tris, 0,25 M de glicina e 0,1% de SDS), sob corrente de 120 V durante 120 minutos. As proteínas separadas pela eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose sob para ensaio de imunodeteção.

11. Imunodeteccção

As proteínas separadas pela eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência para ensaio de imunodeteccção (*western Blotting*). Inicialmente a membrana foi lavada com TBS pH 7.5 (NaCl, 30 mM Tris) e bloqueada com M-TBS preparado na hora do uso (5 g de leite em pó para 100 ml de TBS) por no mínimo 3 h sob agitação. Após o bloqueio, retirou-se o M-TBS e lavou-se duas vezes a membrana, por um período de 5 min cada lavagem, com T-TBS (50 µl de Tween-20 em 100 ml de TBS). O primeiro anticorpo, que reconhece a Nek1, diluído em T-TBS (1:500) foi colocado sobre a membrana formando um filme e incubou-se sob refrigeração e agitação por no mínimo 8 h. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com T-TBS 4 x 5 min. Incubou-se o segundo anticorpo conjugado à peroxidase e diluído em T-TBS por no mínimo 2 h sob refrigeração e agitação. Passado o tempo de incubação, a membrana foi lavada duas vezes com T-TBS e uma vez com TBS e em seguida procedeu-se a reação de quimioluminescência, que consiste na exposição da membrana de nitrocelulose a uma mistura contendo partes iguais da solução A (100mM de glicina pH 10, 0,4mM Luminol e 8mM de 4-iodofenol) e da solução B (0,12% de peróxido de hidrogênio). Na sala escura, a membrana foi exposta em filme e esse foi revelado segundo especificações do fabricante (Kodak™).

12. Análise Estatística

Toda análise estatística foi feita utilizando ANOVA seguido de One-way Tukey's Multiple Comparison Test.

13. Imunoprecipitação

As células foram lisadas em 50 mM de Tris pH 7.4, 100 mM de Na Cl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de B-glicerolfosfato, 2 mM de Na₃VO₄, 25 nM de caliculina, 1 % Triton X-100 e com inibidores de proteases (Roche). O lisado foi incubado com anticorpo anti-Nek1 ou anti-pNek1 ligado a proteína A agarose *beads* (Amersham). As *beads* ligadas ao anticorpo e à Nek1 foram lavadas com tampão de lise duas vezes e então foram preparadas para a análise em espectrômetro.

14. Espectrometria de Massas

O imunoprecipitado da Nek1 foi reduzido com DTT (10 mM de DTT em 25 mM de bicarbonato de amônia) e alquilado com Iodoacetamida (55 mM de iodoacetamida em 25 mM de bicarbonato de amônia). Os peptídeos foram digeridos com tripsina (20 ng/ul em 25 mM de bicarbonato de amônia) por 12 h (*overnight*) a 37°C. Após a digestão, a amostra foi centrifugada e aplicada no espectrômetro do tipo eletrospray Q Tof modo positivo. Os arquivos gerados pelo *masslynx* foram processados utilizando o software *Proteinlynx Global Server* disponível no LNLS e a análise foi feita utilizando o MASCOT e o MSDB como banco de dados, disponível na internet (mas8.lnls.br/mascot).

IV. Resultados

1. Obtenção de linhagens Nek1 negativas e GFP positivas:

Células Hek293t e U87 foram transduzidas com vetor lentiviral contendo a seqüência codificadora da GFP e com um segmento da seqüência anti-senso para a Nek1 responsável pela produção do RNA de interferência. Para a obtenção das linhagens controles, células Hek293t e U87 foram transduzidas com vetor lentiviral contendo apenas a seqüência codificadora da GFP. Essas células foram mantidas em cultura normal para posterior seleção.

As linhagens transduzidas foram plaqueadas em baixa densidade e colônias GFP-positivas foram selecionadas através de microscopia de fluorescência. A seleção foi feita até que se obtivesse 100% de células verdes para HEK293t e 90% em U87 (figura 1A, B, C e D). Posteriormente a presença da Nek1 nas linhagens silenciada (Nek-) e controle (Nek1+) foi analisada através de Western blot (Figura 1E e 1F) e comprovou-se a obtenção do silenciamento quase total da Nek1 na linhagem Hek293t e o silenciamento parcial na U87. O anticorpo utilizado para a imunodeteccção da Nek1 foi obtido conforme descrito anteriormente em materiais e métodos.

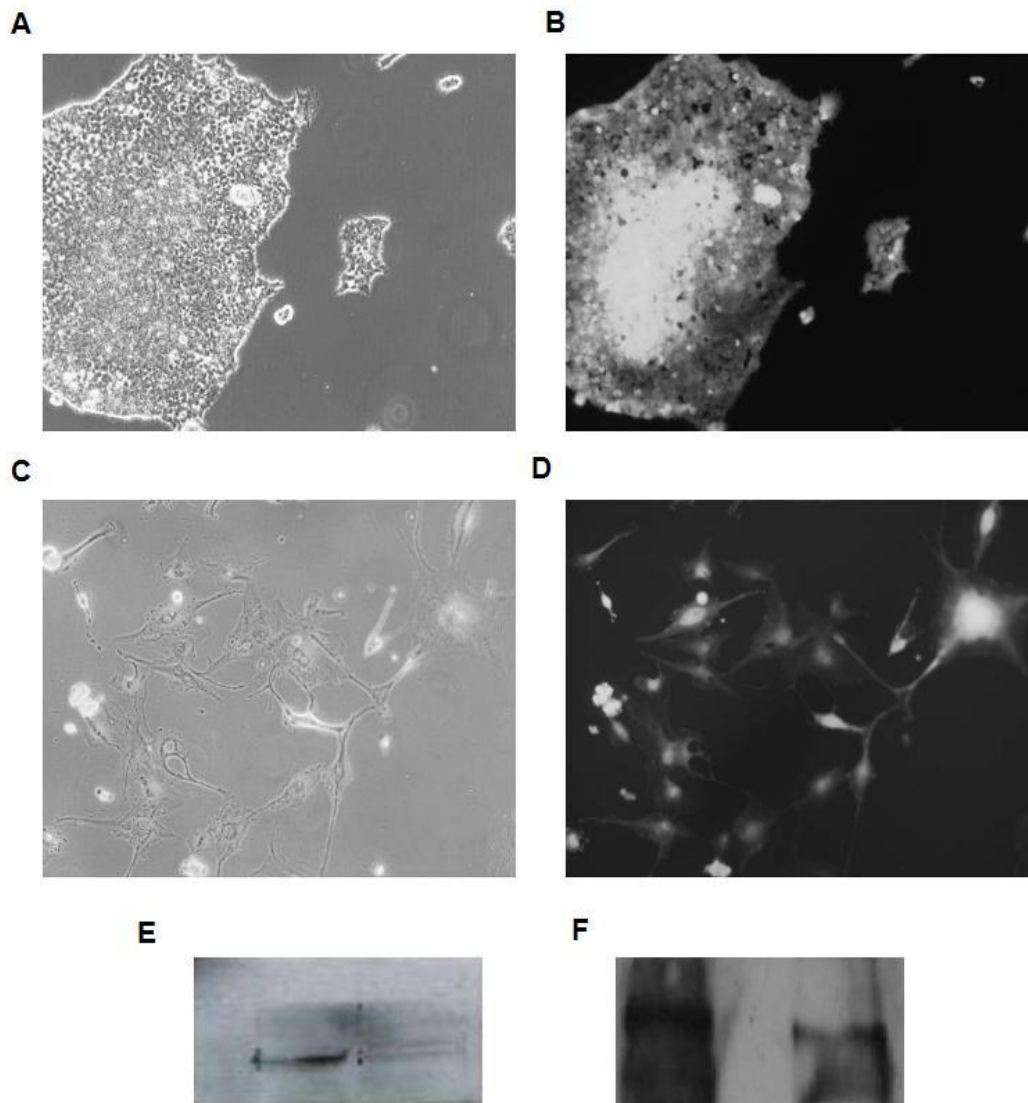


Figura1: Obtenção das linhagens Nek1 negativas. Células Hek293t e U87 foram silenciadas por RNA de interferência e selecionadas a partir da expressão de GFP. (A) Células Hek293t silenciadas e GFP positivas em luz visível e (B) em luz UV; (C) Células U87 silenciadas e GFP positivas em luz visível e (D) em luz UV; (E) Western blot indicando o silenciamento quase total da Nek1 na linhagem Hek293t e (F) western blot indicando o silenciamento parcial da linhagem U87. Para as fotos de microscopia de fluorescência foi utilizado o aumento de 100X.

2. Ensaio cometa para verificar a existência de danos ao material genético

Para verificar a existência de danos ao DNA induzidos por diferentes agentes genotóxicos, células Hek293t e U87 Nek1+ e Nek1- foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metil-metanosulfonato (MMS) e cisplatina e o dano ao material genético foi avaliado através do uso do ensaio cometa alcalino. Para a realização desses ensaios, as células foram previamente semeadas em placas de 24 poços (50 mil células por poço). Inicialmente, foi utilizado apenas um tempo de exposição aos agentes (30 min para H_2O_2 , 1 h para cisplatina e 2 h para o MMS). Os resultados obtidos com a linhagem Hek293t tratada com H_2O_2 e MMS estão mostrados na figura 2 e com cisplatina na figura 3.

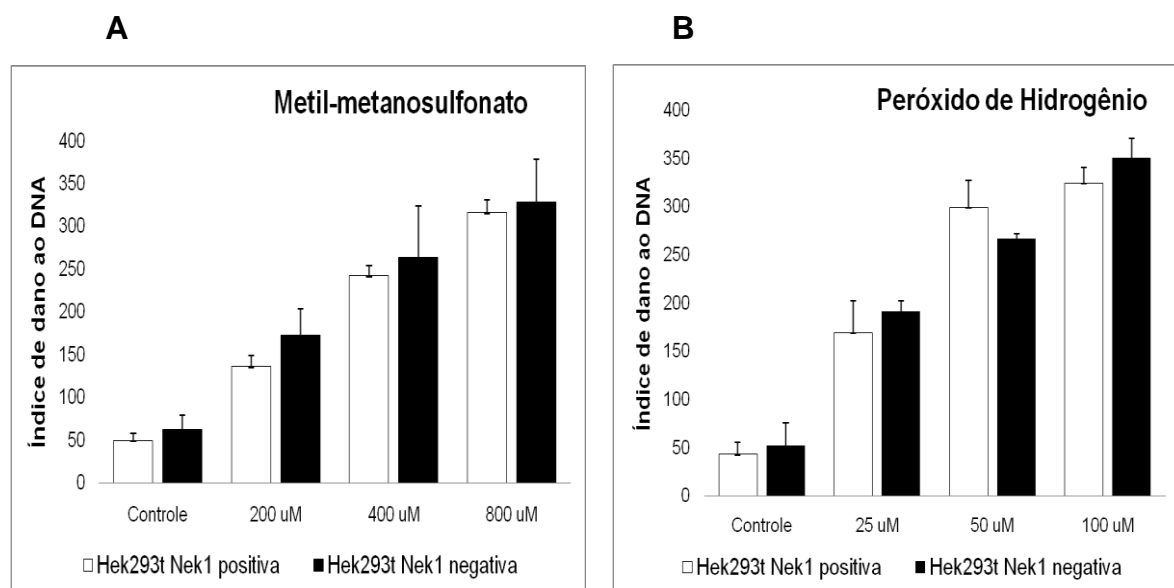


Figura 2: Índice de dano (ID) ao DNA de células Hek293t Nek1-positiva e negativa expostas a agentes genotóxicos medido pelo do ensaio cometa em pH alcalino. (A) Gráfico representado células tratadas com MMS e (B) células tratadas com H_2O_2 . Os dados foram obtidos a partir de três experimentos diferentes.

Conforme mostrado na figura 2, não houve diferenças significantes entre as células Nek1 positivas e negativas, indicando que a ausência da Nek1 não altera os mecanismos de dano ao DNA. Dois experimentos independentes foram feitos com a linhagem U87 e em nenhum deles ocorreram diferenças entre os índices de danos apresentados nas duas linhagens (dados não mostrados).

Nos experimentos utilizando cisplatina, ocorreram alterações na migração dos núcleos das células silenciadas vistas após a coloração com prata no teste cometa (Figura 3). O ensaio cometa é capaz de medir o desenrolamento do DNA com ligações cruzadas intercadeias (ICL), que seria o primeiro passo para o reparo dessas lesões. Sob condições alcalinas, a desnaturação do DNA contendo ICLs é reprimida e a migração do DNA na eletroforese é retardada. Por isso que, enquanto o DNA lesado por outros tipos de danos normalmente forma caudas após a eletroforese, um DNA apresentando ICLs não forma essas caudas de aspecto de cometa (CHENG *et al.*, 2006). As células Nek1-negativas praticamente não apresentaram caudas quando tratadas com diferentes concentrações de cisplatina, enquanto que o aspecto normal de cometa, isto é, com cauda, foi observado na linhagem positiva (Figura 3). O índice de dano não pode ser quantificado utilizando a classificação de danos pelo tamanho da cauda visto que o aspecto das células com ICLs é muito semelhante ao dano classe zero. Nesse caso optamos por contar o número de células com caudas e sem caudas (Figura 4). Encontramos diferenças significativas entre a linhagem controle e a linhagem silenciada sendo que as células Nek1 negativas apresentaram mais células sem caudas em todas as doses usadas. Entretanto, a ausência de cauda não significa ausência de lesão ao DNA, nesse caso essas modificações correspondem a células com ligação intercadeias da DNA.

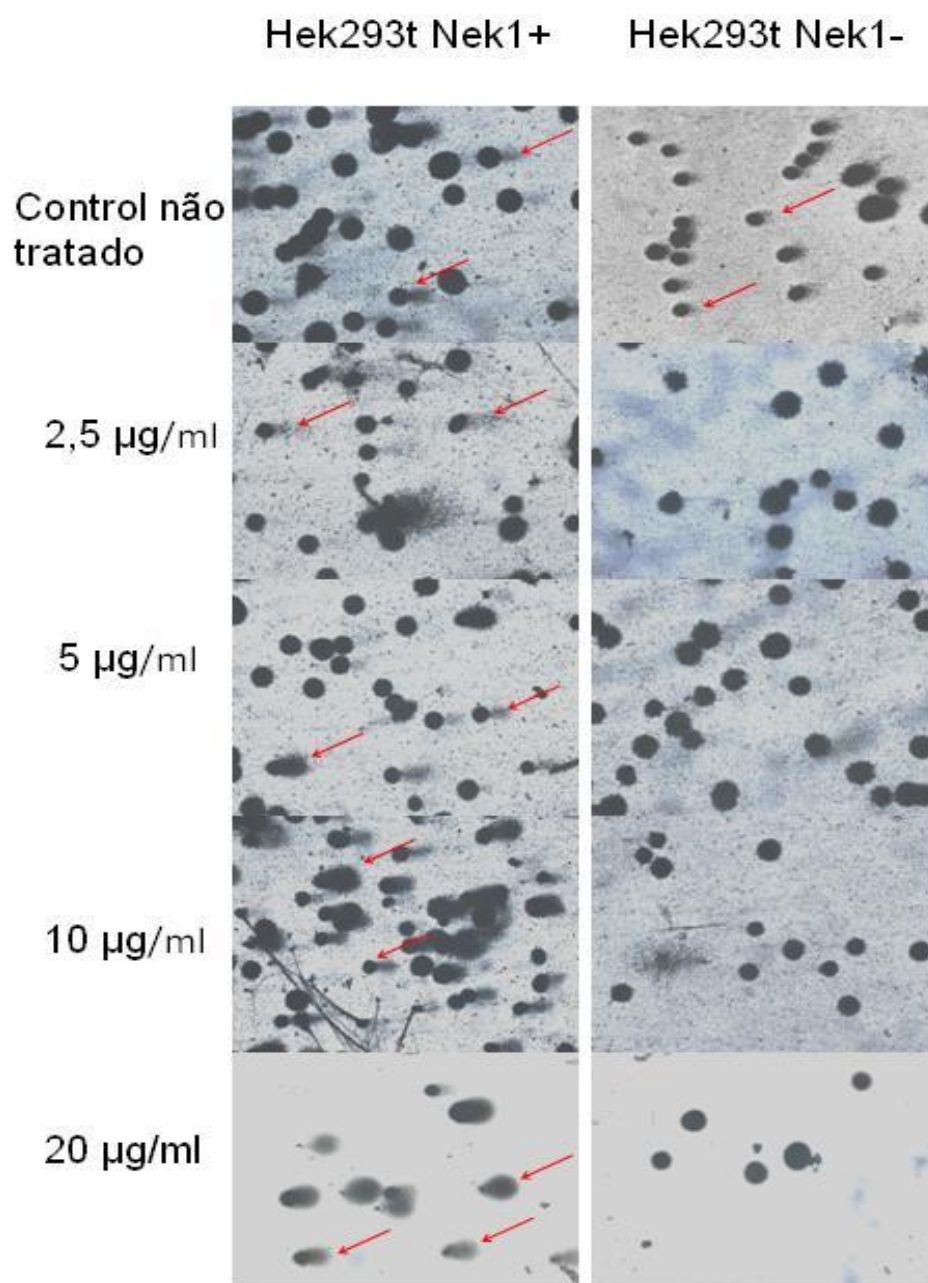


Figura 3: Comparação do aspecto dos núcleos corados com prata após ensaio cometa de células Nek1 positivas e negativas tratadas com diferentes doses de Cisplatina. Para as fotos de microscopia foi utilizado o aumento 200x. As figuras são representativas de três experimentos independentes. As flechas vermelhas indicam células com caudas.

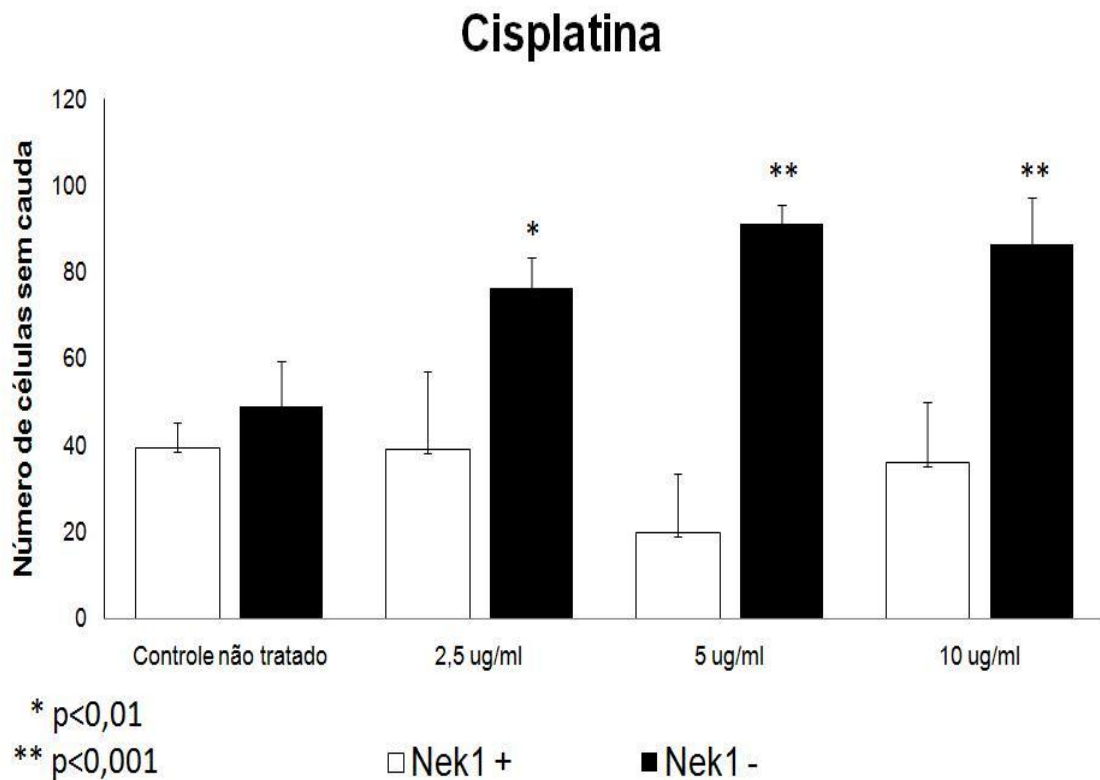


Figura 4: Efeito do tratamento com cisplatina na migração do DNA de células Hek293t. As linhagens Nek+ e a Nek1- foram tratadas com diferentes doses de cisplatina por 1 h e submetidas ao ensaio cometa em pH alcalino. As células foram coradas com prata e analisou-se por microscopia óptica o número de células que não apresentavam caudas. Foram contadas 100 células por lâmina. As barras brancas representam a linhagem Nek1-positiva e as barras pretas a linhagem Nek1 negativa. Os asteriscos correspondem aos tratamentos que diferiram estatisticamente entre as duas linhagens. Três experimentos independentes foram feitos

3. Ensaio cometa para verificar a capacidade de reparo de danos no DNA

Experimentos para avaliar a capacidade de reparação no DNA foram feitos para verificar o possível envolvimento da Nek1 nesses mecanismos. Diferentes tempos entre a exposição aos agentes genotóxicos e o ensaio cometa foram utilizados para estimar a reparação de danos ao DNA (GUECHEVA *et al.*, 2001). A expressão do reparo se dá pela diminuição do índice e da frequência de dano ao longo do tempo. Nesse caso, as células são tratadas durante o período descrito anteriormente, mas somente são utilizadas para o ensaio cometa após um período de recuperação em meio de cultura completo. Esse experimento foi realizado após tratamento com MMS, H₂O₂ e cisplatina. Resultados demonstram que ao longo do tempo a linhagem selvagem apresenta um decaimento no índice de dano (ID). Ao contrário, na linhagem silenciada essa queda do ID ocorre de forma mais lenta (Figura 5A e B). Esse comportamento é observado em todas as doses utilizadas de todos agentes genotóxicos (Figura 6 A e B). Houve diferença significativa entre os índices de dano apresentados pelas duas linhagens durante o período de recuperação, indicando que a ausência da Nek1 pode estar alterando o reparo normal dessas células.

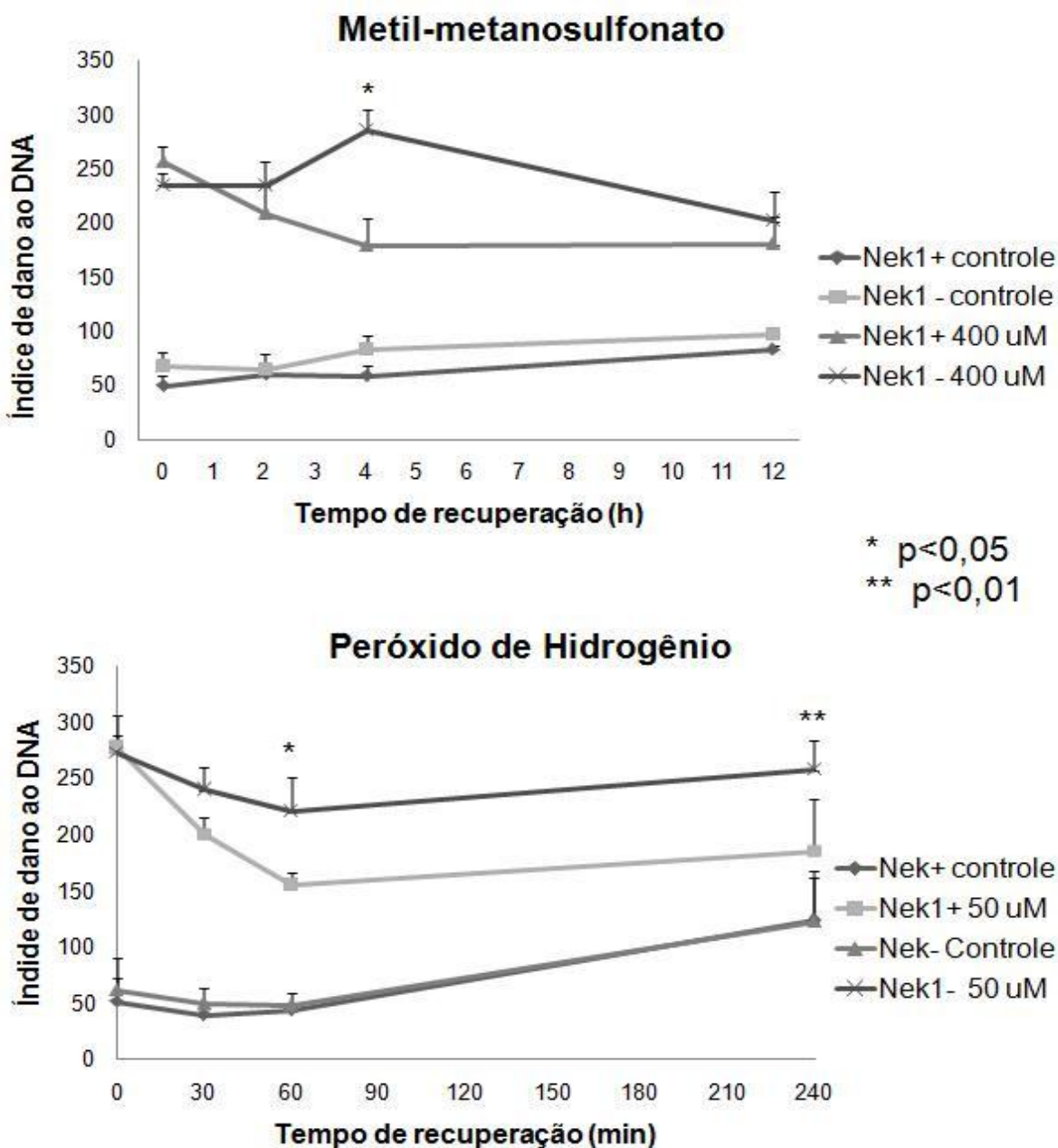


Figura 5: Capacidade de reparação de danos ao DNA após o tratamento com MMS (A) e H₂O₂ (B). Células Hek293t foram tratadas com MMS por 2h e o ensaio cometa foi realizado em seguida à exposição (tempo 0h) e 2, 4 e 12h após o tratamento. No ensaio com H₂O₂, as células hek293t foram tratadas por 30 minutos e o ensaio cometa foi realizado no tempo 0 e 30, 60 e 240 minutos após o tratamento. Três experimentos independentes foram feitos.

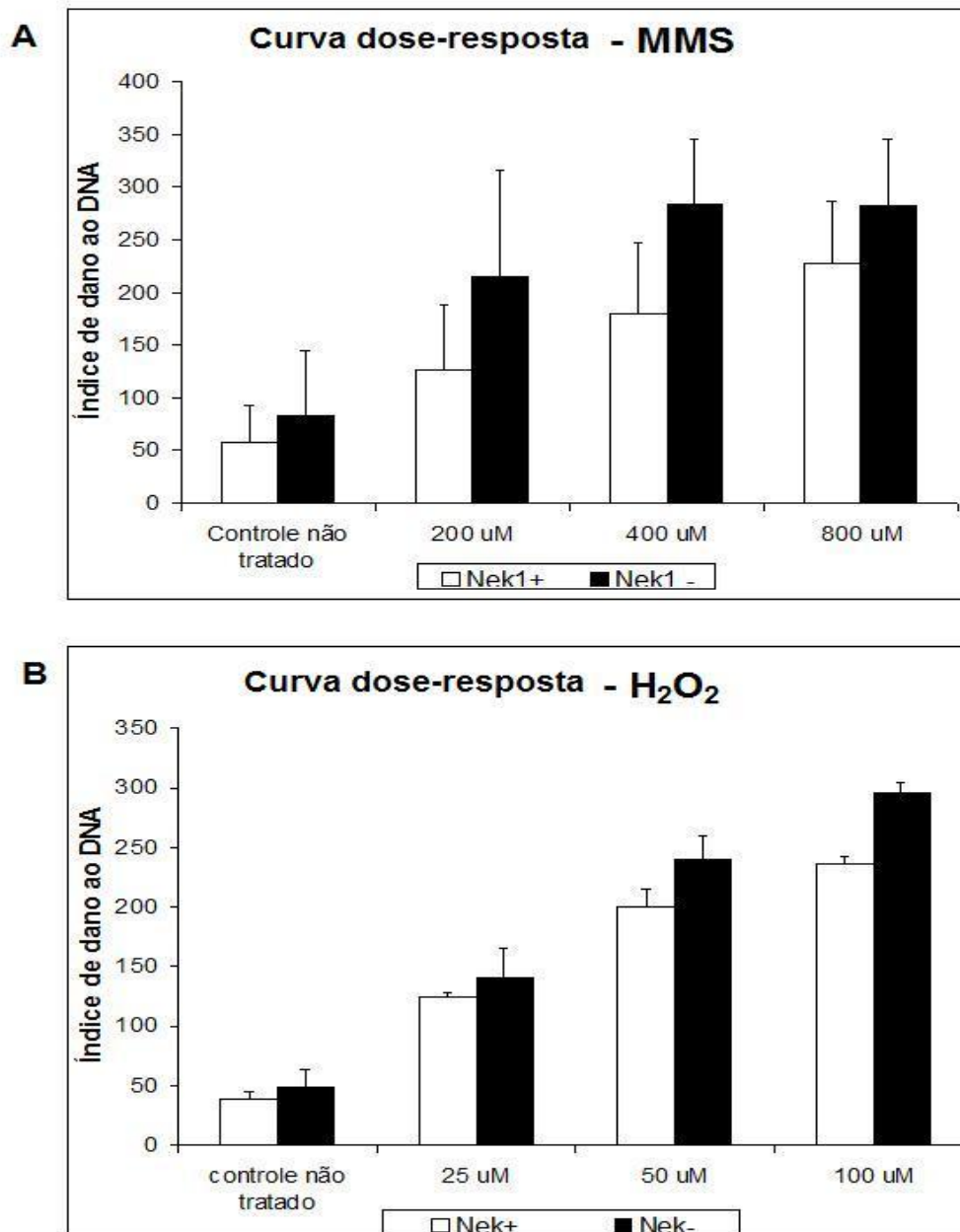


Figura 6: Curva de dose-resposta do ensaio cometa feito com Hek293t com MMS e H₂O₂. Foram utilizadas 3 doses de cada agente para se obter uma curva de dose-resposta. A, gráfico mostrando a curva de dose-resposta feita com MMS após duas horas de tratamento; B, gráfico mostrando a curva de dose-resposta feita com H₂O₂ após 30 minutos de tratamento. As barras brancas representam a linhagem Nek1-positiva e as barras pretas a linhagem Nek1-negativa.

Também foi avaliada a capacidade de reparação em células tratadas com cisplatina. O ensaio cometa com células Hek293t foi realizado 2, 4 e 8 h após a exposição ao agente indutor de ligações cruzadas. Duas horas após a exposição, as células silenciadas apresentaram o mesmo perfil de núcleos encontrados no tempo zero, que seria logo após a exposição à cisplatina (Figura 7) enquanto que as células Nek1+ apresentaram caudas em todos os tempos de recuperação. Entretanto, a partir de 4 horas de recuperação, o padrão de caudas começou a tornar-se mais evidente nas células silenciadas, indicando que possivelmente estejam ocorrendo quebras na molécula de DNA decorrente do reparo de lesões do tipo ligações cruzadas (CHENG *et al.*, 2006). Em todos os tempos as caudas são vistas nos controles. Nesse caso também não foi possível quantificar os índices de dano e por isso optou-se por classificar as células quanto a presença de cauda (Figura 8).

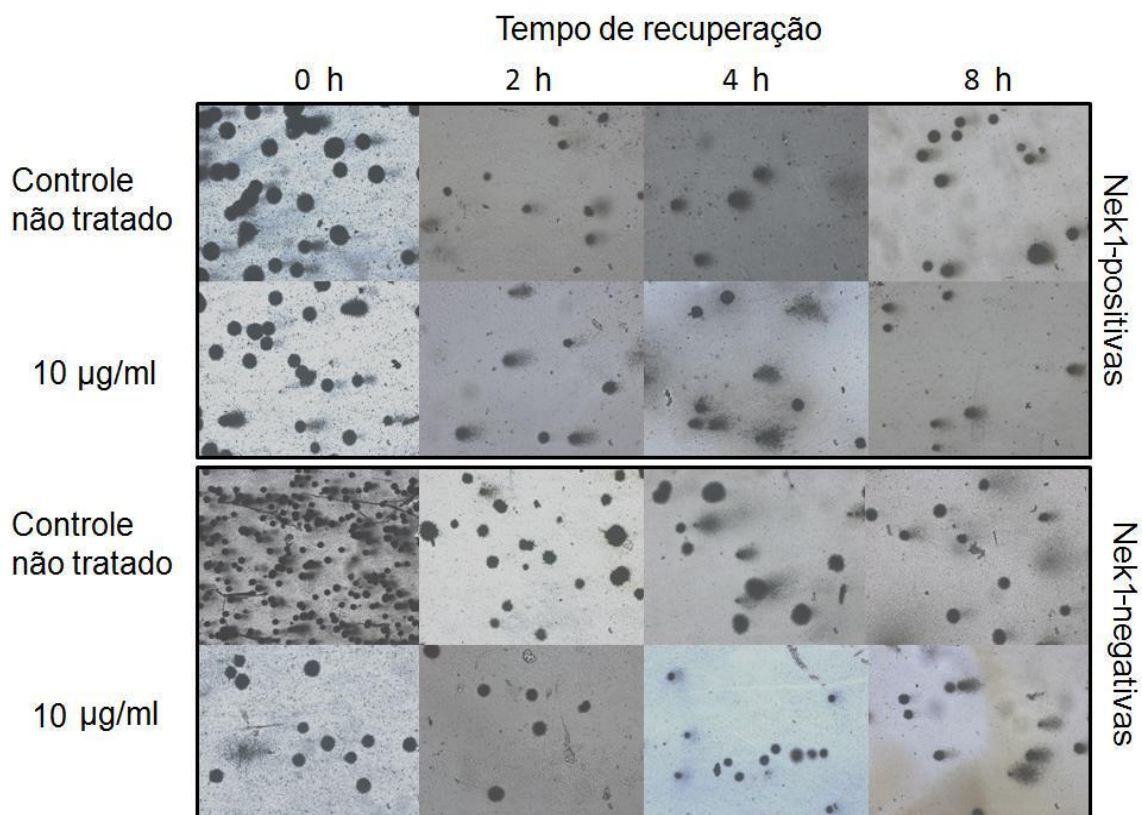


Figura 7: Capacidade de reparo de danos ao DNA de células Hek293t expostas à cisplatina. O quadro apresenta a comparação entre núcleos corados com prata de células Nek1-positivas e negativas, com seus respectivos controles. As células foram tratadas por 1 h com 5 µg/ml e o ensaio cometa foi realizado em seguida (tempo 0) e 2, 4 e 8 h após o tratamento. Para as fotos de microscopia foi utilizado o aumento 200x. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

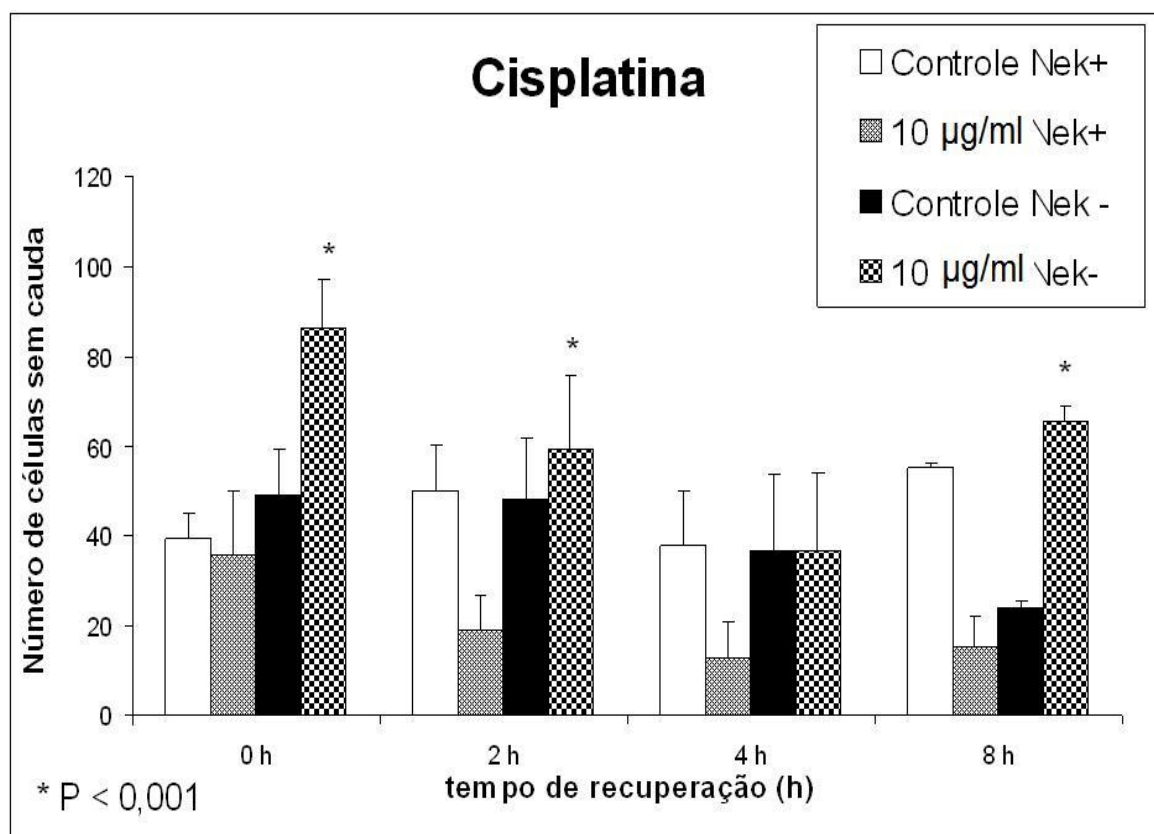


Figura 8: Efeito do tratamento com cisplatina na migração do DNA de células Hek293t. As linhagens Nek+ e a Nek1- foram tratadas com 10ug/ml de cisplatina por 1 h. O ensaio cometa foi realizado logo em seguida (tempo 0 h) e 2, 4 e 8 h após o tratamento. As células foram coradas com prata e analisou-se por microscopia óptica o número de células que não apresentavam caudas. Foram contadas 100 células por lâmina. Os asteriscos correspondem aos tratamentos que diferiram entre as duas linhagens. Dois experimentos independentes foram feitos.

4. Ensaio de sobrevivência e proliferação celular

Para avaliar o efeito da diminuição da velocidade do reparo sobre a biologia da célula, foi verificada a sobrevivência das linhagens em 24, 48 e 72 h após o dano genotóxico. Células Hek293t e U87 GFP-positivas e com a Nek1 silenciada foram semeadas em placas de 96 poços e o teste de MTT foi realizado nos tempos indicados (Figura 9). Nesse caso, obtiveram-se curvas de crescimento das quatro linhagens estudadas observando diferenças entre as linhagens Nek- e Nek1+. Não houve diferença significativa na velocidade de crescimento das células Nek1- e Nek1+, tanto para Hek293t quanto para U87 (Figura 9A e 9B).

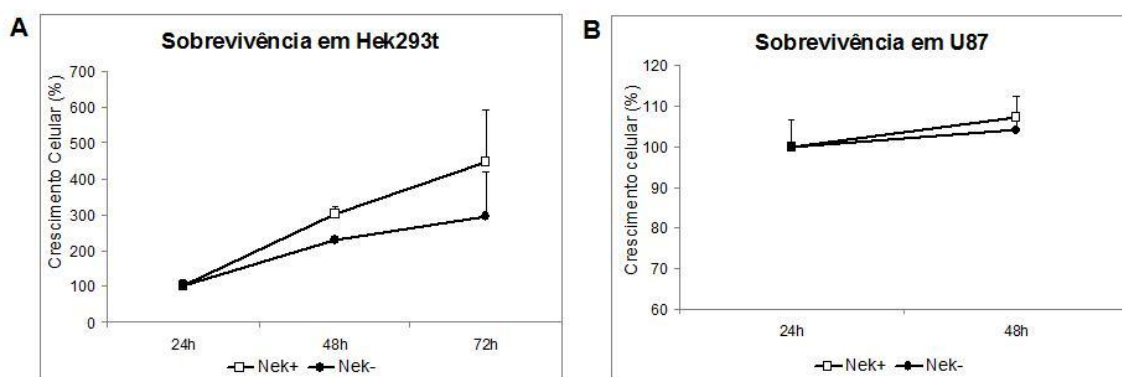


Figura 9: Ensaio MTT para ver proliferação e sobrevivência celular. (A) crescimento celular da linhagem Hek293t Nek1-positiva e negativa; (B), crescimento celular da linhagem U87 Nek1-positiva e negativa.

Posteriormente as células foram tratadas com os diferentes agentes genotóxicos já mencionados, utilizados no ensaio cometa, para avaliar a sensibilidade celular frente a estes agentes.

As células foram semeadas em placas de 96 poços e 24 h após os tratamentos foram realizados. As células foram tratadas com H_2O_2 (25, 50 e 100 μM), ou MMS (200, 400 e 800 μM), ou com cisplatina (2,5, 5 e 10 $\mu g/ml$) em meio de cultura. O ensaio de MTT foi realizado 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento. De maneira geral, as linhagens silenciadas apresentaram maior sensibilidade aos agentes testados (Figura 10). Após tratamento com MMS, a linhagem U87 silenciada apresentou menor índice de crescimento celular em todos os tempos avaliados, enquanto que em Hek293t a diferença entre as linhagens foi significativa em 24 h (Figura 10A). No tratamento com cisplatina, ambas as linhagens Nek-negativas, de U87 e Hek293t, apresentaram um declínio do crescimento celular nos tempos testados (Figura 10A). Entretanto, o tratamento com H_2O_2 foi pouco conclusivo já que na linhagem Hek293t observou-se menor crescimento celular nas silenciadas e na linhagem U87 essa diferença entre a Nek1- e Nek1+ foi pouco significativa (Figura 10). Todos os experimentos foram feitos com 3 doses de cada agente e houve a resposta dose- dependente após 24 h de tratamento, existindo menor taxa de sobrevivência para as doses mais altas utilizadas (Figura 11). Em todas as leituras realizadas, foi diminuída a coloração do agente utilizado (*background*) e a porcentagem de crescimento celular foi calculada a partir do controle, considerado como 100% de crescimento celular conforme descrito em materiais e métodos.

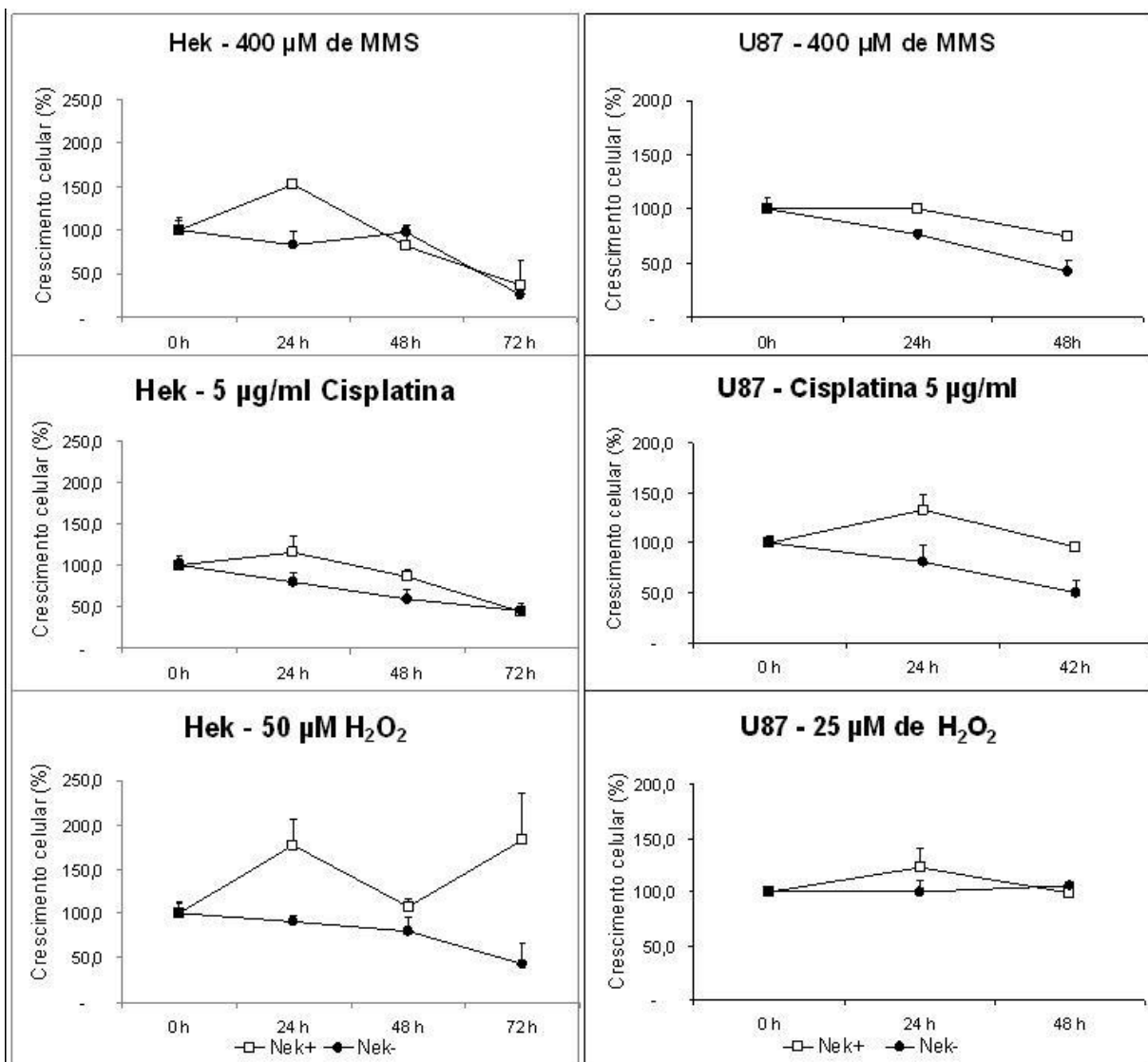


Figura 10: Curva de crescimento de linhagens expostas a agente genotóxicos. Células Hek293t e U87 foram plaqueadas e no dia seguinte foram tratadas com 400 μ M de MMS, 5 μ g/ml de cisplatina e 50 μ M de H_2O_2 . Elas foram então incubadas por 24, 48 e 72 h em condições normais de cultivo. Após esse período a reação do MTT foi feita conforme descrito em materiais e métodos. A absorbância foi medida em leitor de placa Spectramax no comprimento de onda 540 nm. Os dados foram obtidos de dois experimentos diferentes.

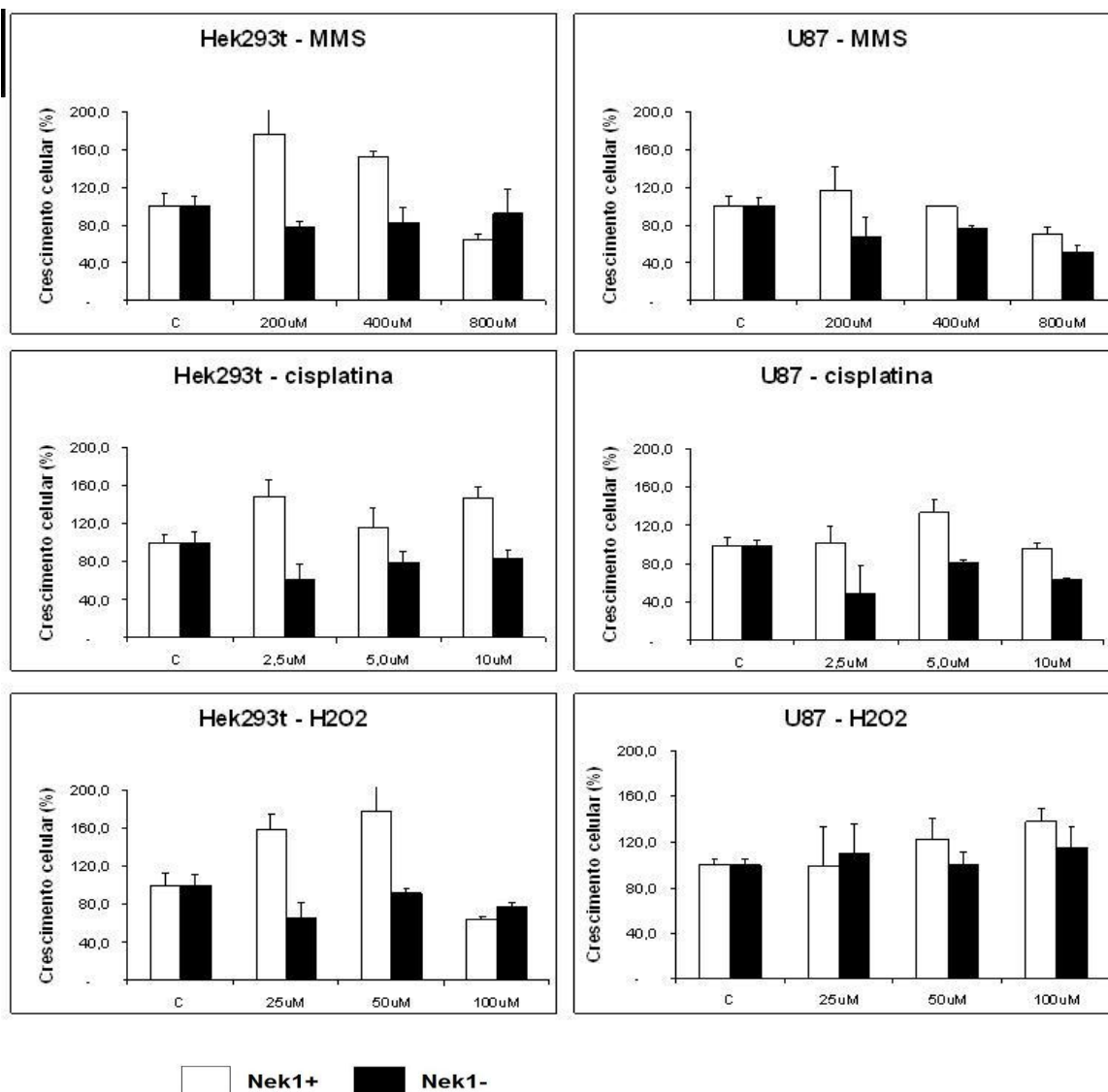


Figura 11: Curva de dose-resposta do ensaio de proliferação celular MTT. Foram utilizadas 3 concentrações de cada agente para esse ensaio. Células Hek293t e U87 foram plaqueadas e no dia seguinte foram tratadas com as doses indicadas nos gráficos. Elas foram então incubadas por 24 h em condições normais de cultivo e após esse período a reação do MTT foi feita conforme descrito em materiais e métodos. A absorbância foi medida em leitor de placa Spectramax no comprimento de onda 540 nm. As barras brancas representam a linhagem Nek1-positiva e as barras pretas a linhagem Nek1-negativa. Os dados foram obtidos de dois experimentos diferentes.

V. Resultados preliminares

1. Estudo do papel da Nek1 na progressão do ciclo celular

Mecanismos de reparo do DNA estão intimamente relacionados com a progressão do ciclo celular. Os pontos de checagem (*checkpoints*) ocorrem durante a progressão do ciclo celular e são responsáveis pela inspeção do material genético por proteínas específicas. Quando encontram erros no DNA, essas proteínas são capazes de sinalizar esse defeito, recrutando outras moléculas para consertá-lo, ou, em caso de danos mais nocivos, induzindo a morte celular programada (BARTEK & LUKAS, 2007). Vários desses mecanismos de sinalização envolvidos no reparo podem regular o ciclo celular, principalmente paralisando o ciclo até que o defeito seja consertado. Portanto, uma falha nessa sinalização altera o padrão de parada no ciclo celular observado em resposta a agentes genotóxicos. Mutações em vias de sinalização que regulam o reparo podem levar à perda da parada no ciclo celular em resposta a agentes genotóxicos (RAI *et al.*, 2007).

Foi realizado um experimento preliminar de sincronização de ciclo celular com a linhagem U87 Nek1+ e Nek1- pela redução de SFB (0,25%) por 2 dias e ambas mostraram uma sincronização em torno de 70% das células em G1 (Tabela 1). Entretanto, na linhagem Nek1+ foi encontrada uma população de células com conteúdo de DNA sub-diplóide, um indicativo de apoptose, enquanto que essa população não foi observada na linhagem silenciada (Figura 12). A sincronização do ciclo pela diminuição da concentração de soro no meio de cultivo foi descrita para outras linhagens de glioma (LI *et al.*, 1996; CHOU & LANGAN, 2003;).

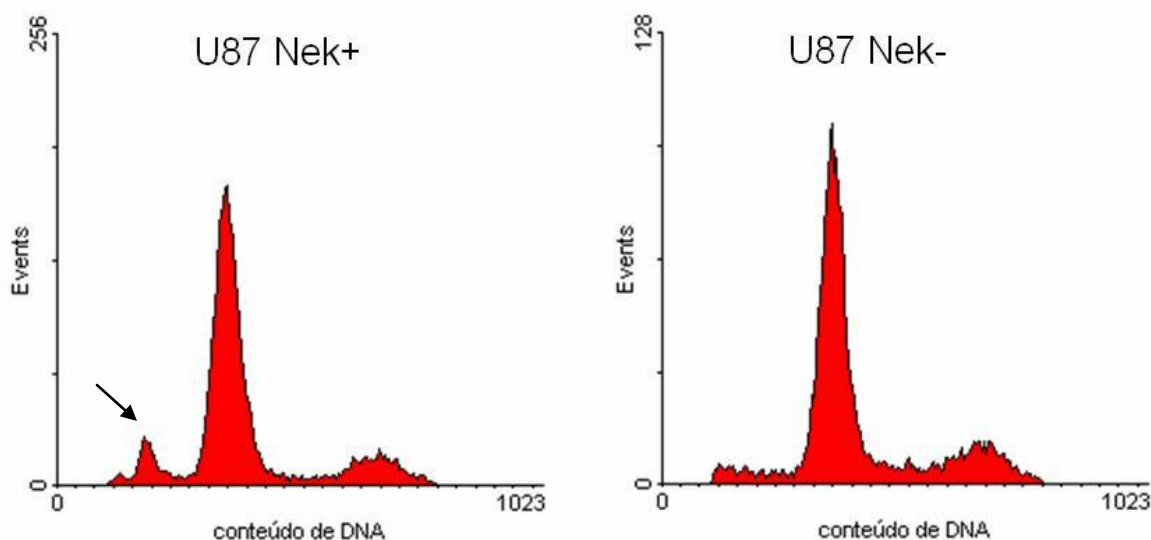


Figura 12: Histogramas de células U87 sincronizadas pela depleção de SFB no meio de cultivo por dois dias. Essas células foram fixadas com etanol e tratadas com RNase e com iodeto de propídeo para marcação do material genético. Em seguida foram analisadas por citometria de fluxo e as fases do ciclo foram associadas ao conteúdo de DNA. A seta indica a presença de uma população sub-diplóide na linhagem Nek1+. Um ensaio foi feito em duplicata.

Tabela 1: Efeito do silenciamento da Nek1 na distribuição de populações celulares da linhagem U87 em diferentes fases do ciclo celular.

	Conteúdo de DNA		
	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
U87 Nek+	75,7	10,1	14,2
U87 Nek+	78,6	11,8	9,5
U87 Nek-	74,9	16,9	8,2
U87 Nek-	64,7	18,7	16,5

* Resultados do primeiro experimento de citometria de fluxo das células U87 sincronizadas pela depleção de SFB no meio de cultivo.

Um segundo experimento foi realizado para avaliar a participação da proteína Nek1 na via de sinalização de apoptose. Para esse experimento, as células foram previamente tratadas com radiação ultravioleta curta (UVC), um conhecido indutor de apoptose (KULMS *et al.*, 1999 ; KULMS *et al.*, 2002). Células U87 Nek1-positivas e Nek1-negativas foram mantidas em meio com 0,25% de soro fetal bovino para sincronização do ciclo por 2 dias. Posteriormente, essas células foram expostas à radiação UV por 30 segundos e coletadas para análise em citômetro de fluxo. Os resultados estão apresentados na tabela 1. Houve um aumento na população sub-diplóide da linhagem Nek1-positiva em relação à Nek1-negativa não tratadas, confirmando os resultados do primeiro experimento. Entretanto, quando o soro foi retirado do meio para sincronização, não ocorreu diferença entre as populações sub-diplóides, contrastando com os nossos primeiros resultados. As células tratadas com UVC apresentaram resultados semelhantes. Não foi observada diferença significativa nas populações celulares presentes em cada fase do ciclo celular (tabela 2).

Tabela 2: Efeito do silenciamento da Nek1 na distribuição de populações celulares da linhagem U87 em diferentes fases do ciclo celular.

	Conteúdo de DNA			Apoptose
	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	(%)
Nek+ controle	66,8	9,1	24,1	4,9
Nek- controle	75,0	8,3	16,7	2,83
Nek+ s/ SFB	75,7	7,7	16,6	3,47
Nek- s/ SFB	80,7	6,4	12,9	6,67
Nek+ UV	86,6	7,0	6,4	9,46
Nek- UV	82,6	7,8	9,6	8,59

***Resultados do segundo experimento de citometria de fluxo**

2. Estudo da interação da Nek1 com outras proteínas

Estudar moléculas que interagem com uma proteína em muitos casos é fundamental para a compreensão da sua função. Isto se aplica especialmente à Nek1, que possui uma grande região não-catalítica e regiões de interação proteína-proteína clássicas. Com esse intuito, iniciamos estudos de interação da Nek1 com outras proteínas através de ensaios de imunoprecipitação dessa cinase, seguida por análises de espectrometria de massas. Utilizamos anticorpos anti-Nek1 e anti-pNek1 para imunoprecipitar a Nek1 endógena de lisados de Hek293t selvagem. Os imunoprecipitados obtidos foram reduzidos com DTT e alquilados com iodoacetoamida, digeridos com tripsina e em seguida avaliados no espectrômetro de massa do tipo *Eletrospray Q-Tof* no modo positivo para a obtenção de espectros do tipo MS-MS. Os arquivos gerados pelo *masslynx* foram processados utilizando o programa *Proteinlynx Global Server* disponível no LNLS e a análise foi feita utilizando o MASCOT e o MSDB como banco de dados, disponível na internet, considerando apenas seqüências humanas. Proteínas hipotéticas não entraram na análise, já que não possuem função ou outras características descritas. Durante as análises pelo MASCOT, utilizamos a modificação pós-translacional como um recurso opcional. Nesse caso, foram feitas análises selecionando fosforilação em STY e oxidação da metionina. Alguns peptídeos apareceram sem significância estatística, inclusive peptídeos pertencentes à proteína Nek1, entretanto, as proteínas identificadas a partir desses peptídeos apresentam alguma relação com a possível função da Nek1.

No imunoprecipitado da Nek1 endógena encontramos entre os peptídeos analisados pelo espectrômetro de massa algumas proteínas interessantes, como a policistina1 *like* e a Numa, além de algumas proteínas que apareceram nas duas amostras, como a DDX11 (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Proteínas que foram encontradas na análise do espectrômetro de massa após a co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-Nek1.

<u>Nek1 endógena imunoprecipitada com anti-Nek1</u>		
Proteína	Descrição	Referência
Tenascin-M1	Glicoproteína da matriz extracelular	TREBAUL <i>et al.</i> , 2007
Polycystic kidney disease 1-like	Envolvida na etiologia da doença policística do rim	YUASA <i>et al.</i> , 2002
Retinitis pigmentosa 1-like	Envolvida na etiologia da retinite pigmentosa	BOWNE <i>et al.</i> , 2003
DDX11	Helicase humana	HIROTA & LAHTI, 2000
Syntaxin binding protein 5 (Tomosyn)	Envolvida na formação e fusão de vesículas	FUJITA <i>et al.</i> , 1998
NUMA1	Presente na matriz nuclear durante a interfase e atua na regulação da mitose.	SUN & SCHATTEN, 2006

Tabela 4: Proteínas que foram encontradas na análise do espectrômetro de massa após a co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-pNek1.

<u>Nek1 endógena imunoprecipitada com anti-PNek1</u>		
Proteína	Descrição	Referência
PI 3-kinase enhancer	ligadora de GTP com função anti-apoptótica	YE, 2006.
DDX11	Helicase humana	HIROTA & LAHTI, 2000
E2F transcription factor 2	Fator de transcrição envolvido na regulação de apoptose neuronal	NOWAK <i>et al.</i> , 2007
fanconi anemia complementation group A	Envolvida na Doença de Fanconi	DORSMAN <i>et al.</i> , 2007
Polycystic kidney and hepatic disease 1	Envolvida na doença policística do rim	YUASA <i>et al.</i> , 2002

Os próximos experimentos serão feitos baseados nesse primeiro, mas com algumas modificações. Usaremos como controle a linhagem silenciada e tentaremos utilizar peptídeos extraídos do SDS-PAGE. Uma segunda estratégia utilizando superexpressão da Nek1 através da transfecção de células Hek293t com plasmídeos específicos também será empregada.

VI. Discussão

O gene da *Nek1* foi primeiramente clonado e caracterizado a partir de uma biblioteca de cDNA de sangue de camundongo (LETWIN *et al*, 1992). *Nek1* codifica uma proteína cinase com cerca de 1200 aminoácidos, cujo domínio N-terminal catalítico possui homologia com a NIMA, uma proteína cinase que controla o início da mitose no fungo *A. nidulans* (LETWIN *et al*, 1992, FEIGE *et al*, 2006). Essa proteína tem sua atividade aumentada logo após a indução de danos ao DNA por radiação ionizante (POLCI *et al*, 2004) indicando que a *Nek1* pode estar envolvida no início da resposta celular a danos ao material genético. Esse aumento na atividade da *Nek1* não acompanha o aumento de sua expressão que ocorre posteriormente (POLCI *et al*, 2004). Além disso, observou-se o transloco de *Nek1* para o núcleo de células expostas à radiação ionizante e sua colocalização com proteínas envolvidas em reparação de danos ao DNA. Esses achados sugerem a participação da *Nek1* como cinase em vias de reparo de danos ao DNA induzidos por radiação ionizante.

A partir desses indícios, procuramos, no presente estudo, entender a participação dessa cinase em mecanismos de dano e reparo de DNA induzidos por outros agentes mutagênicos capazes de alterar a molécula de DNA. Utilizamos duas linhagens celulares diferentes, U87 e Hek293t, ambas expressando a *Nek1* (linhagem *Nek1+*) e silenciadas por RNA de interferência (linhagem *Nek1-*), em diferentes ensaios após o tratamento com agentes genotóxicos (MMS, H₂O₂ e cisplatina). Se a *Nek1* está atuando como uma proteína sensora de sinais de dano ou nas vias reparadoras dessas lesões ao DNA, a nossa hipótese de trabalho sugere que células deficientes em *Nek1* devem ser mais sensíveis aos agentes genotóxicos que células normais. Em nosso estudo, as células *Nek1-*, de maneira geral, mostraram-se mais sensíveis a esses agentes em ambas as linhagens utilizadas (U87 e Hek293t) sugerindo que essas células podem não ser capazes de reparar eficientemente o material genético lesado e, portanto, estariam seguindo a via de morte celular. A ausência dessa cinase poderia estar comprometendo alguma via de sinalização de dano, prejudicando a ativação de proteínas envolvidas no reparo.

Células deficientes em reconhecer lesões e repará-las ficam mais suscetíveis a mutações e a indução de danos ao material genético pode levar à morte precoce dessas células, inclusive por vias apoptóticas. Esses resultados corroboram com a hipótese levantada por Polci e colaboradores em seu trabalho de 2004 (POLCI *et al.*, 2004), no qual o autor encontra maior sensibilidade em células deficientes em Nek1 em relação a células normais quando expostas à radiação ionizante. Os autores acreditam que essas células deficientes estão morrendo devido a uma não reparação correta do material genético, entretanto a comprovação de que um reparo incorreto possa estar ocorrendo não é demonstrada.

O Ensaio Cometa, uma técnica muito utilizada para estimar danos ao material, é capaz de detectar danos do tipo quebra simples e dupla da fita do DNA, além de quebras em sítios alcaliláveis, danos oxidativos às bases e ligações cruzadas inter e intracadeia (COLLINS, 2004; COLLINS *et al.*, 1997). Quebras simples não são consideradas letais e são rapidamente reparadas, enquanto que quebras duplas são mais danosas para a célula e por isso a existência de um maior interesse em pesquisar esse tipo de lesão e seus mecanismos de reparo. Muitos agentes genotóxicos não induzem quebras diretamente, gerando sítios apurínicos ou apirimidínicos no DNA. Esses sítios são álcali-láveis e provavelmente convertidos em quebras em altos pH, como utilizado no Ensaio Cometa alcalino. Além disso, as quebras podem ser transientes, sendo reparadas por mecanismos como excisão de pares de bases (BER) ou de nucleotídeos (NER) ao longo do tempo e assim pode-se estimar danos ao DNA bem como o reparo do mesmo através dessa técnica (COLLINS *et al.*, 1997).

Durante o nosso estudo procuramos comparar a linhagem com a Nek1 silenciada (Nek1-) com uma linhagem controle expressando Nek1 (Nek1+) quanto a presença de danos ao DNA estimado pelo ensaio cometa. Como visto na Figura 2, o dano ao DNA é semelhante entre as células Nek+ e Nek1- tratadas com H₂O₂ e MMS, isto é, as alterações observadas posteriormente a esses tratamentos serão provavelmente devido a alterações nos mecanismos de reparo e não pelo aumento do índice de dano ao DNA.

Visto que houve um aumento de danos ao material genético em células Nek1+ e Nek1- tratadas com agentes genotóxicos em relação aos seus controles não tratados, e que esse aumento não diferiu entre as linhagens utilizadas, o próximo objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de reparação do DNA dessas células ao longo do tempo. Através de uma curva de tempo é possível observar mudanças nos índices de danos de células tratadas com agentes genotóxicos. Uma diminuição nesses índices indica que a célula está reparando o material lesado enquanto que a manutenção ou aumento do índice indica que os mecanismos de reparo estão alterados (GUECHEVA *et al.*, 2001). Além disso, proteínas envolvidas no início da rota de reparo ao DNA, como a ATR e a ATM, são encontradas ativas logo após a indução de dano ao material genético, pois alguns tipos de lesão, como quebras duplas da fita de DNA, são mais letais e requerem uma resposta rápida da célula (SHILOH, 2001). Em nosso trabalho, observamos a queda rápida dos índices de dano na linhagem Nek1+ quando tratada com MMS e H₂O₂, mas esses resultados não se repetiram na linhagem Nek-. O reparo foi mais lento na linhagem silenciada embora, após 12h o índice tenha diminuído tanto quanto na linhagem Nek1 + tratadas com MMS como demonstrado na Figura 5.

O tratamento com cisplatina provocou alterações no perfil normal dos núcleos com lesão ao DNA de células Nek1- detectadas pelo ensaio cometa (Figuras 3 e 7). Segundo CHENG e colaboradores (CHENG *et al.*, 2006), essa alteração no padrão de migração das caudas de DNA dos cometas seria pela presença de lesões do tipo ligações cruzadas intercadeias (ICL) e nesse caso a ausência da Nek1 seria responsável pela presença dessas lesões ao material genético exposto à cisplatina. No ensaio para estimar a capacidade de reparação do DNA ao longo do tempo após o tratamento com cisplatina observamos a presença de caudas em todos os períodos na linhagem Nek1+ ao passo que na linhagem Nek1- as caudas apareceram apenas 4 horas após a indução de danos (Figuras 7 e 8). A presença dessas caudas nesse caso significaria que está ocorrendo o reparo das lesões do tipo ICL, pois é necessária a quebra da molécula de DNA para que o reparo ocorra (CHENG *et al.*, 2006).

Esses resultados sugerem a participação da Nek1 em vias de reparo, mas pouco podemos concluir sobre a especificidade dessa cinase nessas vias. A resposta a agentes genotóxicos que induzem dano ao DNA é parcialmente mediada pela ativação de cascatas de sinalização celular que envolvem diversas proteínas sinalizadoras, entre elas as proteínas cinases. Os nossos resultados sugerem que Nek1 pode estar envolvida, mas aparentemente não é essencial para a sinalização do reparo, uma vez que, mesmo com retardo, as células acabam conseguindo reparar o dano causado.

O MMS é um agente alquilante monofuncional muito utilizado como agente indutor de danos ao DNA em estudos mutagênicos. Ele reage covalentemente com um único centro nucleofílico do DNA, modificando a guanina para 7-metil-guanina e a adenina para 3-metil-adenina, causando o pareamento incorreto dessas bases e o bloqueio da replicação (BERANEK, 1990). A reparação de danos ao DNA causada por agentes alquilantes é feita predominantemente pela via reparo por excisão de bases (BER) e por DNA-alquiltransferases. Contudo, quando outras vias de reparo estão comprometidas a sensibilidade ao MMS aumenta significativamente (LUNDIN *et al.*, 2005). Exemplo disso ocorre nos mutantes para gene *RAD52* em *Saccharomyces cerevisiae*. Esses mutantes deficientes em recombinação homóloga (HR) tornam-se mais sensíveis ao MMS sendo este considerado um indutor de quebras duplas (DSB) (KROGH & SYMINGTON *et al.*, 2004). Outra evidência do papel do MMS na formação de DSBs surgiu durante a análise por *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) de cromossomos de levedura, na qual o tratamento com esse agente alquilante causou a fragmentação do material genético (MYUNG & KOLODNER, 2003). O H₂O₂ é uma espécie reativa de oxigênio (ERO). ERO é qualquer molécula que contém oxigênio capaz de gerar radicas ou espécies químicas cujo último orbital quântico possua um elétron desemparelhado. O H₂O₂ pode produzir várias alterações no DNA. O ataque oxidativo pode resultar em sítiosapurínicos ou apirimidínicos (AP) no DNA e também em quebras simples e duplas. O mecanismo geral de reparação de sítios AP é via reparo por excisão de base (BER) (BARNES & LINDAHL, 2004). Em nossos estudos, encontramos um índice de dano

do DNA semelhante em células com a Nek1 silenciada tratadas com H₂O₂ e MMS quando comparadas à linhagem Nek1-positivas.

A cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento do câncer (LOEHRER & EINHORN, 1984). É sabido que a atividade citotóxica dessa droga é consequência da sua interação com o DNA, resultando em adutos covalentes entre a molécula de cisplatina e o DNA. Esses adutos, que podem ser mono e bifuncionais, são capazes de formar ligações intra e intercadeia, causando distorções locais na molécula de DNA que influenciam no dobramento e no enrolamento da dupla fita. Essas distorções interferem na interação do DNA com outras moléculas e por isso ocorre a inibição de processos celulares fundamentais, como a replicação, a transcrição, a tradução e o reparo do DNA (WOZNIAK & BLASIAK, 2002). O reparo dos adutos de cisplatina ocorrem primariamente pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (ZAMBLE *et al.*, 1996). Existem ainda as ligações cruzadas que ocorrem entre a molécula de DNA e proteínas. Essas interações podem obstruir o acesso de enzimas de reparo e essas lesões precisam inicialmente da ação de proteases, e posteriormente o reparo é processado pela maquinaria da NER ou por outras vias dependentes das rotas de recombinação. Muitos estudos sugerem que as ligações cruzadas de DNA são reparadas através dos mecanismos de incisão recombinacional que estão envolvidos na NER e na recombinação homóloga (HR) (THOMPSON, 1996; LEGERSKI & RICHIE, 2002). A HR é, em geral, importante para células que estão sofrendo rápidas divisões celulares e especialmente durante a fase S e G2 do ciclo celular. A recombinação não-homóloga (NHEJ) parece ser mais requisitada em células quiescentes ou que estão se diferenciando e principalmente durante a fase G1 do ciclo, quando as cromátides irmãs não estão disponíveis. Além disso, a HR é importante durante a meiose e no reparo de *crosslinks* de DNA, enquanto que a NHEJ está presente na recombinação do sistema V(D)J na produção de anticorpos pelo sistema imunológico e na manutenção do telômero (SCHARER, 2003). O tratamento com cisplatina em células selvagens e silenciadas provocou alterações no perfil normal dos núcleos com lesão ao DNA. Segundo CHENG e colaboradores (2006), essa alteração no

padrão de migração das caudas de DNA dos cometas seria pela presença de lesões do tipo ICL, e nesse caso a ausência da Nek1 seria responsável pela presença dessas lesões ao material genético exposto à cisplatina.

Por atuarem diferentemente na célula e causarem diferentes tipos de danos ao DNA, esses agentes ativam diferentes rotas de sinalização para reparo nas células. Essas diferentes vias são realizadas por diferentes moléculas, embora existam fatores atuantes em muitas rotas, principalmente aquelas que agem na checagem de danos ao DNA no início da sinalização de reparo. Por esses motivos, é possível que um tratamento cause alterações no reparo normal da célula enquanto que outros não. Nossos resultados mostraram alterações no reparo normal de células expostas a três agentes genotóxicos com ações diferentes sobre o DNA. Esse achado sugere que a Nek1 pode estar participando do início da resposta celular ao estresse genotóxico e que essa cinase pode não fazer parte de uma via específica de reparo e sim estar atuando como integradora de diferentes vias de sinalização. Entretanto, em nosso trabalho encontramos evidências da participação da Nek1 no reparo de lesões do tipo ICL causadas pela presença da cisplatina. A linhagem silenciada apresentou aspecto característico desse tipo de lesão no ensaio cometa e aparentemente o reparo está ocorrendo mais lentamente em comparação com a linhagem Nek1 positiva. Nesse caso, o reparo se dá a partir da formação de quebras na dupla fita de DNA (*double strand break* – DSB), que serão reparadas pelo mecanismo de recombinação homóloga (HR) ou recombinação não-homóloga (NHEJ) (SCHARER, 2003). Durante os tratamentos com MMS e H₂O₂, também encontramos um retardo no reparo ao DNA das células Nek1-negativas em relação as normais. Os agentes utilizados causam diferentes modificações na molécula de DNA ,entretanto ambos são capazes de gerar DSBs (LUNDIN *et al.*,2005; BARNES & LINDAHL, 2004).

Outra evidência sobre a participação da Nek1 em vias de reparo de DSBs são os resultados encontrados por SURPILI e colaboradores (2003). Através de um ensaio de duplo híbrido, esses pesquisadores encontraram proteínas que interagem com a Nek1. Dentre essas, algumas estão envolvidas no controle do ciclo celular

(YWHAH, subunidade B56 da PP2A) e envolvidas em mecanismos de reparação (ATRX, Mre11 e 53BP1), além da FEZ-1 e 2, que atuam na regulação do desenvolvimento neuronal (SURPILI *et al.*, 2003). A proteína Mre11 pertence ao complexo MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) e está envolvida em processos de reparação de DNA e em mecanismos de controle de ciclo celular. Esse complexo atua principalmente no reparo de DNA DSB em ambas as vias de reparação HR e NHEJ (SCHARER, 2003). A 53BP1 é um mediador de pontos de checagem de danos ao DNA (WANG *et al.*, 2002). Em *Xenopus laevis* está associado à cromatina e colocaliza com a Mre11 durante o reparo de DSBs (ANDERSON *et al.*, 2001; SCHULTZ *et al.*, 2000). A Mre11 interage com a BRCA1 também durante o reparo de DSBs e a ZBRK1 interage com a BRCA1 (SURPILI *et al.*, 2003). No trabalho de SURPILI *et al.*, 2003, os autores sugerem que a Nek1 humana poderia estar envolvida na regulação da ZBRK1, influenciando na interação BRCA1/ZBRK1. A ATRX, também encontrada no ensaio de duplo híbrido, é homóloga da Rad54 de *S. cerevisiae* e participa do reparo de DSBs por HR (DRONKERT *et al.*, 2000) além de contribuir para a manutenção da estabilidade genômica em células de vertebrados (YAMASHITA *et al.*, 2002).

Mre11, 53BP1 e ATRX podem estar interagindo com a Nek1, sendo reguladas pela ou regulando-a, corroborando com a hipótese de que a Nek1 está envolvida no reparo de quebras duplas na fita de DNA. Com o objetivo de avaliar a interação de Nek1 com possíveis proteínas, realizamos ensaios de imunoprecipitação seguida da análise por espectrometria de massas. A vantagem de realizar esse ensaio em células eucarióticas em relação aos ensaios de duplo híbridos já feitos é que seria possível realizar a imunoprecipitação da Nek1 em condições fisiológicas e em condições de dano em DNA. Em nossos estudos, encontramos peptídeos da Nek1 entre aqueles de baixa significância estatística, provavelmente pela baixa concentração endógena dessa proteína, mas algumas proteínas com função relacionada com a Nek1 foram encontradas, como uma proteína semelhante a policístina que está envolvida na doença policística do rim. Outras proteínas encontradas estão envolvidas na etiologia de doenças genéticas associadas a

deficiências no reparo por recombinação (anemia de Fanconi). Entretanto, esses resultados são preliminares e novos ensaios dessa linha de pesquisa são necessários para a obtenção de resultados definitivos.

Defeitos nas vias de reparação recombinacional resultam em uma série de patologias cuja principal característica é a instabilidade genômica que pode acarretar na perda de partes do cromossomo. Como resultado dessas perdas, os fenótipos encontrados incluem predisposição ao desenvolvimento de câncer, imunodeficiências e sensibilidade à radiação ionizante (SCHARER, 2003). Em seu trabalho, Polci e colaboradores (2003) encontraram em sua linhagem deficiente em Nek1 uma maior sensibilidade a radiação ionizante, indicando que a ausência da função da Nek1 seria responsável por esse fenótipo. Animais modelos da doença policística do rim apresentam alterações no gene da Nek1 e como características associadas a essa deficiência encontram-se a esterilidade dos machos, anemia, retardo de crescimento e anormalidades faciais (UPADHYA *et al.*, 2000). Fenótipos como anemia e esterilidade têm sido relacionados com deficiências no reparo de DSBs (THOMPSON & SCHILD, 2002; SCIURIANO *et al.*, 2006; FEITSMA *et al.*, 2007; [KUZNETSOV et al., 2007](#)). Outras características como o desenvolvimento lento, também estão relacionadas com patologias de reparo recombinacional como a síndrome de Bloom e a doença de Rothmund–Thomson (THOMPSON & SCHILD, 2002). Assim, pode-se relacionar o fenótipo alterado de animais mutantes, com perda de função da Nek1, como resultado de uma deficiência nas vias de reparo por recombinação.

O estresse genotóxico pode ativar uma variedade de respostas celulares incluindo a ativação da transcrição de genes que regulam a reparação do DNA, além de genes envolvidos no controle do ciclo celular e da apoptose (ISLAH *et al.*, 2005). Além disso, a resposta pode se dar por modificações pós-transcricionais e traducionais de genes envolvidos nessas rotas. Nesse caso, o envolvimento de proteínas cinases é observado. As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) estão parcialmente envolvidas na resposta celular ao estresse genotóxico. Essas cinases, juntamente com as cinases reguladas por fatores externos (ERKs) e

as jun-cinases (JNKs) atuam na ativação de rotas de transdução de sinal que ativam fatores de transcrição, sendo que o supressor de tumor p53 e o NFκB são os mais bem estudados. A proteína p53 é considerada o principal sensor de estresse genotóxico e atua estabelecendo associações entre dano ao DNA, alterações e paradas no ciclo celular e apoptose (ISLAH *et al*, 2005). Proteínas que atuam relacionando diferentes rotas são muito importantes para o funcionamento normal da célula e a apresentam função redundante que favorece a economia de energia da célula, uma vez que rotas interligadas podem ser ativadas por um mesmo estímulo. Uma falha nas vias que ligam essas rotas pode resultar em diferentes fenótipos.

Outra possibilidade seria a atuação dessa cinase dependente do tipo celular, ou seja, sua atividade poderia estar envolvida com a especificidade do tecido na qual ela está sendo expressa. Podemos ainda pensar que a ausência de reparo e o aumento do índice de mortalidade em células Nek1-negativas expostas a estresse genotóxico podem ser resultado de defeitos no ciclo celular. Muitas vezes, mutantes relacionados à regulação do ciclo celular se apresentam mais susceptíveis ao estresse genotóxico uma vez que certos mecanismos de reparo dependem da progressão normal do ciclo celular (ISLAH *et al.*, 2005). A NIMA, que é homóloga à Nek1, atua diretamente no ciclo celular, sendo essencial para a mitose (O'CONNELL *et al*, 2003). Por apresentarem seqüência conservada, pode-se especular se possuem a mesma função. Nesse caso, a Nek1 poderia atuar unindo diferentes rotas, participando da regulação do ciclo celular e de vias de reparo ao DNA.

Um estudo preliminar utilizando citometria de fluxo foi realizado a fim de avaliar o efeito do silenciamento da Nek1 na progressão do ciclo celular. Apesar de preliminares, estes resultados sugerem que não está havendo uma grande alteração na distribuição das células no ciclo celular. Células Nek1+ e Nek1- foram sincronizadas pela depleção de soro fetal bovino no meio de cultivo. Cerca de 70% das células sincronizaram em G1, porém, durante a análise dos dados coletados no citômetro, encontramos uma população de células sub-diplóide, indicando de apoptose na linhagem Nek1+, enquanto que esse padrão não foi observado na linhagem silenciada. Entretanto, no segundo experimento, encontramos ausência de

apoptose apenas nas células silenciadas não tratadas. A linhagem Nek1 negativa apresentou apoptose durante a sincronização e houve um aumento de duas vezes na população em apoptose no tratamento com radiação UVC. A apoptose é a principal via de morte celular programada e deficiências na sua via de sinalização podem acarretar prejuízos para a própria célula bem como para o tecido no qual ela se encontra. A célula com lesões ao DNA que não foram reparadas deveria iniciar a via de apoptose e, no caso de uma deficiência, a célula pode morrer por outra via, como a necrose, ou continuar viva, mas com defeitos no material genético. Em organismos vivos, a ausência de apoptose pode levar ao desenvolvimento de cânceres. Em vista disso, mais estudos devem ser feitos para confirmar o papel da Nek1 nas vias de morte celular e um estudo detalhado da progressão do ciclo celular se faz necessário para o entendimento do papel da Nek1 em células de mamífero.

Ainda é cedo para afirmar se a Nek1 está atuando diretamente no controle do ciclo celular ou em rotas de reparo ou até mesmo nas duas. Entender como essa proteína funciona in vivo pode auxiliar no estudo da etiologia da Doença Policística do Rim bem como no entendimento de patologias associadas a lesões no material genético.

VII. PERSPECTIVAS

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho nos ajuda a entender a função da Nek1 em células de mamíferos, entretanto ainda não podemos afirmar em que vias de sinalização essa cinase está atuando.

Para dar continuidade e maior aprofundamento ao trabalho aqui apresentado, alguns estudos deverão se feitos:

1. Utilizar um agente genotóxico que provoque um efeito semelhante à radiação ionizante, como mitomicina C, (ou a própria radiação se possível) para a realização de um ensaio de cinética de reparo com as linhagens utilizadas nesse trabalho. Realizando esse experimento, poderemos confirmar a atuação da Nek1 em resposta à radiação ionizante.
2. Realizar ensaio de micronúcleos para ver instabilidade genética que pode estar ocorrendo na linhagem negativa quando tratadas com agente genotóxicos. Uma das conseqüências da deficiência no reparo de quebras duplas é a instabilidade no material genético que está sendo replicado e durante a divisão celular podem ocorrer perdas de parte dos cromossomos.
3. Analisar a progressão do ciclo celular através de citometria de fluxo utilizando linhagens Nek1 positiva e negativa tratadas com agentes genotóxicos.
4. Realizar ensaio de localização celular com células tranfectadas com Nek1 fusionada a GFP após o tratamento com agentes genotóxicos pois proteínas que atuam no reparo de danos ao DNA são capazes de migrar para o núcleo em situações de estresse genotóxico.
5. Estudar a ativação da Nek1 em presença dos mutagênicos utilizando ensaios de imunodeteção (*western blot*) para ver a ação dessa cinase em presença de lesão ao material genético da célula.
6. Examinar a interação da Nek1 com proteínas envolvidas no reparo de DNA em resposta a danos no DNA a partir da imunoprecipitação de Flag-Nek1 ou de Nek1 endógena e separação do imunoprecipitado em eletroforese de SDS e identificação das bandas por espectrometria de massa.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Anderson L; Henderson C & Adachi Y. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell. Biol*, 2001, 21(5):1719-29.

Arama E.; Yanai A.; Kilfin G.; Bernstein A. & Motro B. Murine NIMA related kinases are expressed in patterns suggesting distinct functions in gametogenesis and a role in the nervous system. *Oncogene*, 1998, 16(14):1813-23.

Barnes D. E. & Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*, 2004, 38:445-76.

Bartek J. & Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2):238-45.

Belham C., Comb M. J. & Avruch J. Identification of the NIMA family kinases NEK6/7 as regulators of the p70 ribosomal S6 kinase. *Curr Biol*, 2001, 11(15):1155-67.

Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp B E, Comb M & Avruch J. A mitotic cascade of NIMA family kinases. Ncc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J. Bio. Chem*, 2003, 278(37):34897-909.

Ben-David Y, Letwin K, Tannock L, Bernstein A & Pawson T. A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J*, 1991, 10(2):317-25.

Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*, 1990, 231(1):11-30.

Berman SA, Wilson NF, Haas NA & Lefebvre PA. A novel MAP kinase regulates flagellar length in *Chlamydomonas*. *Curr Biol*, 2003, 13(13):1145-9

Bloom L & Horvitz RH. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *PNAS*, 1997, 94(7):3414-9.

Bosl GJ & Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*, 1997.

Bowers, A. J. & Boylan, J. F. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*, 2004.

Bowne SJ, Daiger SP, Malone KA, Heckenlively JR, Kennan A, Humphries P, Hughbanks-Wheaton D, Birch DG, Liu Q, Pierce EA, Zuo J, Huang Q, Donovan DD, Sullivan LS. Characterization of RP1L1, a highly polymorphic paralog of the retinitis pigmentosa 1 (RP1) gene. *Mol Vis*, 2003.

Bressan DA, Baxter BK & Petrini JHJ. The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*, 1999.

Caldecott KW. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*, 2001.

Caldecott KW. DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell*. 2003.

Caldecott KW. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*, 2004

- Chen Y, Riley DJ, Zheng L, Chen PL & Lee WH. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J. Biol. Chem.*, 2002.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem*, 1992.
- Cheng, W. H.; Kusumoto, R.; Opresko, P. L.; Sui, X.; Huang, S.; Nicolette, M.L.; Paull, T. T.; Campisi, J.; Seidman, M. & Bohr, V. A. Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Research*, 2006.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003
- Chou RC, Langan TJ. In vitro synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2003.
- Cloutier M, Vigneault F, Lachance D & Séguin A. Characterization of a poplar NIMA-related kinase PNek1 and its potential role in meristematic activity. *FEBS Letters*, 2005.
- Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 1997.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 2004.
- Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, Schindler D, Arwert F, Pals G, Mathew CG, Waisfisz Q, de Winter JP, Joenje H. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol*, 2007.
- Dronkert MLG, Berna Beverloo H, Johnson RD, Hoeijmakers JHJ., Jasin M & Kanaar R. Mouse RAD54 Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. *Mol. Cell. Biol*, 2000.
- Dronkert ML, Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res*, 2001.
- Dudas A & Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res*, 2004.
- Ellis NA & German J. Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet*, 1996.
- Evans MD, Dizdaroglu M & Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 2004.
- Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E & Mathew CG. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. *Blood*, 2000.
- Feige E., Chen A. & Motro B. Nurit, a novel leucine-zipper protein, expressed uniquely in the spermatid flower-like structure. *Mech. Dev*, 2002.
- Feige E, Shalom O, Tsurie S, Yissachar N, Motro B. Nek1 shares structural and functional similarities with NIMA kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1763(3):272-81.

- Feitsma H, Leal MC, Moens PB, Cuppen E & Schulz RW. Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females. *Genetics*, 2007.
- Finst RJ, Kim PJ & Quarmby LM. Genetics of the deflagellation pathway in *Chlamydomonas*. *Genetics*, 1998.
- Fletcher L, Cerniglia GJ, Nigg EA, Yend TJ & Muschel RJ. Inhibition of centrosome separation after DNA damage: a role for Nek2. *Radiat. Res*, 2004.
- Fry AM, Schultz SJ, Bartek J. & Nigg EA. Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.*, 1995.
- Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*. 1998 (a).
- Fry AM, Meraldi P & Nigg EA. A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *EMBO J*, 1998 (b).
- Fry AM, Arnaud L & Nigg EA. Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J. Biol. Chem*, 1999.
- Fry AM, Descombes P, Twomey C, Bacchieri R & Nigg EA. The NIMA-related kinase X-Nek2B is required for efficient assembly of the zygotic centrosome in *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci*, 2000.
- Fry AM. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene*, 2002.
- Fujita Y, Shirataki H, Sakisaka T, Asakura T, Ohya T, Kotani H, Yokoyama S, Nishioka H, Matsuura Y, Mizoguchi A, Scheller RH, Takai Y. Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron*, 1998.
- Guecheva T, Henriques JA & Erdtmann B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res*, 2001.
- Hartmann A & Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett*, 1997.
- Hayward DG & Fry AM. Nek2 kinase in chromosome instability and cancer. *Cancer Lett*. 2006.
- Heyer WD. Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Curr Biol*, 2004.
- Hirota Y & Lahti JM. Characterization of the enzymatic activity of hChIR1, a novel human DNA helicase. *Nucleic Acids Res*, 2000.
- Holland PM, Milne A, Garka K, Johnson RS, Willis C, Sims JE, Rauch CT, Bird TA & Virca GD. Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicc2. *J. Biol. Chem.*, 2002.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Howell SA, Dortland BR, De Zeeuw CI, Willemsen R, Visser P, Grosveld F & Galjart N. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J*, 2001.
- Huang JC, Hsu DS, Kazantsev A, Sancar A. Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci*, 1994.

Huang J & Dynan WS. Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res*, 2002.

Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L & Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 2003.

Huse M & Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 2002.

Igarashi P & Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G & Pantelias G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 2004.

Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, Li B, Reid-Hubbard JL, Flick L, Altizer JL, Thom Deahl J, Monteith DK, Newton RK & Watson DE. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res*, 2005.

Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002.

Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*, 2003.

Kandli M, Feige E, Chen A, Kilfin G & Motro B. Isolation and characterization of two evolutionarily conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA. *Genomics*, 2000.

Kim S, Lee K & Rhee K. NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007.

Kondo S, Sato-Yoshitake R, Noda Y, Aizawa H, Nakata T, Matsuura Y & Hirokawa N. KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J Cell Biol*, 1994.

Krien MJ, Bugg SJ, Palatsides M, Asouline G, Morimyo M & O'Connell MJ. A NIMA homologue promotes chromatin condensation in fission yeast. *J. Cell Sci*, 1998.

Krogh, B.O. & Symington, L.S. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 2004.

Kulms D., Poppelmann B., Yarosh D., Luger T.A., Krutmann J. & Schwarz T. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1999.

Kulms D., Zeise E., Poppelmann B. & Schwarz T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene*, 2002.

Kuznetsov S, Pellegrini M, Shuda K, Fernandez-Capetillo O, Liu Y, Martin BK, Burkett S, Southon E, Pati D, Tessarollo L, West SC, Donovan PJ, Nussenzweig A, Sharan SK. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Bio.*, 2007.

Legerski R.J. & Richie C. Mechanisms of repair of interstrand crosslinks in DNA. *Cancer Treat*, 2002.

- Letwin K, Mizzen L, Motro B, Ben-David Y, Bernstein A & Pawson T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J*, 1992.
- Li V, Kelly K, Schrot R, Langan TJ.. *Brain Res Dev Brain Res*, 1996.
- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N & Dutcher SK. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell*, 2004.
- Lindahl T & Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science*, 1999.
- Lizcano JM, Deak M, Morrice N, Kieloch A, Hastie CJ, Dong L, Schutkowski M, Reimer U & Alessi DR. Molecular basis for the substrate specificity of NIMA-related kinase-6 (NEK6). Evidence that NEK6 does not phosphorylate the hydrophobic motif of ribosomal S6 protein kinase and serum- and glucocorticoid-induced protein kinase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 2002.
- Loehrer PJ & Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med*, 1984.
- Lu KP & Hunter T. Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell*, 1995.
- Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS & Helleday T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 2005.
- Mahjoub M, Montpetit B, Zhao L, Finst RJ, Goh B, Kim AC & Quarmbly LM. The *FA2* gene of *Chlamydomonas* encodes a NIMA family kinase with roles in cell cycle progression and microtubule severing during deflagellation. *J. Cell. Sci.*, 2002.
- Mahjoub M, Rasi MQ & Quarmbly LM. A NIMA-related kinase, FA2p, localizes to a novel site in the proximal cilia of *Chlamydomonas* and mouse kidney cells. *Mol. Biol. Cell.*, 2004.
- Mahjoub MR, Trapp ML & Quarmbly LM. NIMA-Related Kinases Defective in Murine Models of Polycystic Kidney Diseases Localize to Primary Cilia and Centrosomes. *J Am Soc Nephrol*, 2005.
- McNulty JM, Jerkovic B, Bolton PH & Basu AK. Replication inhibition and miscoding properties of DNA templates containing a site-specific cis-thymine glycol or urea residue. *Chem Res Toxicol*, 1998.
- Memisoglu A & Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*. 2000.
- Mi J, Guo C, Brautigam DL & Larner JM. Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res*, 2007.
- Miller SL, DeMaria JE, Freier DO, Riegel AM & Clevenger CV. Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. *Mol Endocrinol*, 2005.
- Milne GT, Jin S, Shannon KB & Weaver DT. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1996.
- Morris NR. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Camb.*, 1976.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983.

Myung, K. & Kolodner, R.D. Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 2003.

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.

Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y & Uehara Y. Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J. Biol. Chem.*, 2004.

Nowak K, Killmer K, Gessner C & Lutz W. E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim Biophys Acta*, 2007.

O'Connell MJ. A NIMA homologue promotes chromatin condensation in fission yeast. *J Cell Sci*, 1988.

O'Connell MJ, Norbury C & Nurse P. Premature chromatin condensation upon accumulation of NIMA. *EMBO J*, 1994.

O'Connell MJ, Krien MJ & Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends in Cell Biology*, 2003.

Ong AC & Wheatley DN. Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet*, 2003.

O'regan L, Blot J & Fry AM. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div*, 2007.

Osmani SA, Engle DB, Doonan JH & Morris NR. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, 1988 (a).

Osmani SA, Pu RT & Morris NR. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*, 1988 (b).

Osmani AH, McGuire SL & Osmani SA. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell*, 1991.

Pan J, Wang Q, & Snell WJ. An aurora kinase is essential for flagellar disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev. Cell.*, 2004.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M & Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.*, 2000.

Pazour GJ, Agrin N, Leszyk J & Witman GB. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol*, 2005.

Pei Y. Diagnostic approach in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006.

Pelka P, Scime A, Mandalfino C, Joch M, Abdulla P & Whyte P. Adenovirus E1A proteins direct subcellular redistribution of Nek9, a Nima-related kinase. *J Cell Physiol*. 2007 Jul;212(1):13-25.

Pereira P, de Oliveira PA, Ardenghi P, Rotta L, Henriques JA, Picada JN. Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006.

Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R & Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003.

Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N & Lifschitz E. Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*, 2001.

Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, & Chen Y. NIMA-Related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Research*, 2004.

Pu RT, Xu G, Wu L, Vierula J, O'Donnell K, Ye XS & Osmani SA. Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *J. Biol. Chem.*, 1995.

Quarmby LM & Mahjoub MR. Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J Cell Sci*, 2005.

Rai R, Peng G, Li K & Lin SY. DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics*, 2007.

Rapley J, Baxter JE, Blot J, Wattam SL, Casenghi M, Meraldi P, Nigg EA & Fry AM. Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. *Mol Cell Biol*, 2005.

Ravanat JL, Douki T & Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol*, 2001.

Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH & Sancar A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997.

Rellos P, Ivins FJ, Baxter JE, Pike A, Nott TJ, Parkinson DM, Das S, Howell S, Fedorov O, Shen QY, Fry AM, Knapp S & Smerdon SJ. Structure and regulation of the human Nek2 centrosomal kinase. *J Biol Chem*, 2007.

Roig J, Mikhailov A, Belham C & Avruch J. Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Des*, 2002.

Roig, J., Groen, A., Caldwell, J. and Avruch, J. Active Nercc1 protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis, and is necessary for proper spindle assembly. *Mol. Biol. Cell*, 2005, 16, 4827-4840.

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML & Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*. 2003.

Scharer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003.

Scharer OD. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *ChemBiochem.*, 2005, 6(1):27-32.

Dunand-Sauthier I, Hohl M, Thorel F, Jaquier-Gubler P, Clarkson SG, Schärer OD. The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity. *J Biol Chem*, 2005.

Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A & Halazonetis TD. p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *J. Cell Biol*, 2000.

Sciurano RB, Rahn MI, Pigozzi MI, Olmedo SB & Solari AJ. An azoospermic man with a double-strand DNA break-processing deficiency in the spermatocyte nuclei: case report. *Hum Reprod*. 2006.

Shang YL, Bodero AJ & Chen PL. NFB1, a novel nuclear protein with signature motifs of FHA and BRCT, and an internal 41-amino acid repeat sequence, is an early participant in DNA damage response. *J. Biol. Chem.*, 2003.

Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 2001.

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer*, 2003.

Siede W, Friedl AA, Dianova I, Eckardt-Schupp F & Friedberg EC. The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics*, 1996.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988.

Slupphaug G, Kalvli B. & Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 2003.

Sun QY, Schatten H. Role of NuMA in vertebrate cells: review of an intriguing multifunctional protein. *Front Biosci*, 2006.

Steinman TI. Polycystic kidney disease: A new perspective from the beginning. *Kidney Int*, 2005.

Surpili MJ, Delben TM & Kobarg J. Identification of proteins that interact with the central coiled coil region of the human protein kinase NEK1 involved in the cell cycle regulation. *Biochemistry*, 2003.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, 1998.

Tan BC & Lee SC. Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. *J. Biol. Chem.*, 2004.

Thompson L.H. Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways. *Mutat. Res.*, 1996.

Thompson LH & Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res.*, 2002.

Thompson CL & Sancar A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*. 2002, 21(58):9043-56

Torres VE, Harris PC & Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 2007.

Trebaul A, Chan EK, Midwood KS. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans.*, 2007.

Twomey C, Wattam SL, Pillai MR, Rapley J, Baxter JE & Fry AM. Nek2B stimulates zygotic centrosome assembly in *Xenopus laevis* in a kinase-independent manner. *Dev. Biol.*, 2004.

Upadhy P, Birkenmeier EH, Birkenmeier CS & Barker JE. Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000.

Uto K & Sagata N. Nek2B, a novel maternal form of Nek2 kinase, is essential for the assembly or maintenance of centrosomes in early *Xenopus* embryos. *EMBO J.*, 2000.

Van Adelsberg J, Chamberlain S & D'Agati V. Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol.*, 1997.

Vigneault F, Lachance D, Cloutier M, Pelletier G, Levasseur C, Seguin A. Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice. *Plant J.*, 2007.

Vogler C, Homan S, Pung A, Thorpe C, Barker J, Birkenmeier EH, Upadhy P. Clinical and pathologic findings in two new allelic murine models of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999.

Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB & Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, 2002.

Wheatley DN, Wang AM & Strugnell GE. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell. Biol. Int.*, 1996.

Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.*, 2004.

Witzgall R. New developments in the field of cystic kidney diseases. *Curr Mol Med.*, 2005.

Wozniak K & Blasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol.*, 2002.

Wu W, Baxter JE, Wattam SL, Hayward DG, Fardilha M, Knebel A, Ford EM, da Cruz E Silva EF, Fry AM. Alternative Splicing Controls Nuclear Translocation of the Cell Cycle-regulated Nek2 Kinase. *J Biol Chem.*, 2007.

Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G. Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Takeda, S. RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J.* (2002).

Yissachar N, Salem H, Tennenbaum T & Motro B. Nek7 kinase is enriched at the centrosome, and is required for proper spindle assembly and mitotic progression. *FEBS Lett.*, 2006.

Ye XS, Xu G, Pu RT, Fincher RR, McGuire SL, Osmani AH & Osmani SA. The NIMA protein kinase is hyperphosphorylated and activated downstream of p34^{cdc2}/cyclinB: coordination of two mitosis promoting kinases. *EMBO J.*, 1995.

Ye K. PIKE GTPase-mediated nuclear signalings promote cell survival. *Biochim Biophys Acta.*, 2006

Yuasa T, Venugopal B, Weremowicz S, Morton CC, Guo L & Zhou J. The sequence, expression, and chromosomal localization of a novel polycystic kidney disease 1-like gene, PKD1L1, in human. *Genomics*, 2002.

Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A & Lippard SJ. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*, 1996.

Zhang H, Scofield G, Fobert P & Doonan JH. A nimA-like protein kinase transcript is highly expressed in meristems of *Antirrhinum majus*. *J. Microsc.*, 1996.