

Marques G.P.<sup>1,2</sup>; Pelegrini A.L.<sup>1</sup>; Lenz G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>gaabi.porto@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A Nek1 é uma serina/treonina cinase de mamíferos envolvida na etiologia da Doença Policística do Rim (PKD) em humanos, pois sua deleção em camundongos causa uma síndrome semelhante à PKD, por isso, alguns estudos buscam entender a sua função nas células.

Evidências sugerem a participação da Nek1 na reparação de DNA em resposta à radiação ionizante e UV, e também a sua interação com proteínas envolvidas em vias de reparação e regulação do ciclo celular. Além disso, um trabalho recente publicado por nosso grupo mostrou que a ausência da Nek1 provoca um retardo no reparo normal do DNA de células renais humanas quando tratadas com os agentes genotóxicos metil-metanossulfonato, peróxido de hidrogênio e cisplatina. Quando silenciadas para Nek1, as células não conseguem reparar principalmente as lesões do tipo *crosslinks* causadas pela cisplatina. Também foram observadas alterações na progressão do ciclo celular dessas células em relação a selvagem, sugerindo que a Nek1 poderia atuar como uma molécula sensora de dano e na regulação do ciclo. Entretanto ainda não está estabelecido o mecanismo de ação específico dessa enzima e as vias das quais ela participa.

## OBJETIVO

Avaliar o envolvimento da cinase Nek1 com proteínas de vias reparadoras de lesões ao DNA e de checkpoint de ciclo celular após a exposição ao quimioterápico cisplatina, um indutor de pontes inter e intracadeia de DNA (*crosslinks*).

## METODOLOGIA

**Linhagens:** Células HEK293t selvagens (WT) e com a Nek1 previamente silenciada por siRNA (KD) (Figura 1) foram mantidas em meio DMEM (suplementado em 10% SFB e antibióticos) a 37 C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tratamento:** As células foram tratadas com cisplatina na concentração de 5 µg/mL em diferentes tempos e posteriormente foram lisadas. O extrato protéico foi separado por eletroforesese (SDS-PAGE) e em seguida transferido para a membrana de PVDF (Western Blot) para detecção com anticorpos específicos e revelação em ECL.

**Anticorpos:** Anti-Nek1 (Santa-Cruz), p-BRCA1, p-Chk1, p-Chk2, p-H2AX, pan-Actina (Cell-signalling).

## RESULTADOS

Para determinar em que via de reparo a Nek1 atua, foram realizados ensaios avaliando o estado de fosforilação de diferentes proteínas após a indução de dano ao DNA com cisplatina nas linhagens selvagem (WT) e silenciada para Nek1 (KD). As proteínas foram escolhidas para estudo devido a relevância conhecida no reparo das lesões induzidas por cisplatina.

As proteínas Chk1 e Chk2 são importantes cinases atuantes no reconhecimento de lesões ao DNA e controladoras de checkpoints do ciclo celular e sua ação se dá rapidamente após o início da lesão. Na ausência da Nek1, observou-se a redução na fosforilação de ambas proteínas (Figuras 2 e 3). O mesmo efeito foi encontrado para a proteína BRCA1, uma importante proteína envolvida no reparo de *crosslinks* através da via recombinacional. Após a exposição a cisplatina, a linhagem KD apresentou uma redução nos níveis de fosforilação dessa proteína em relação ao controle (Figura 4).

Outra proteína estudada foi a histona H2AX. Sua forma fosforilada é encontrada em sítios de quebras duplas de DNA e por isso é considerada uma molécula sensora de danos. Como resultado, foi encontrada a diminuição na fosforilação da H2AX nas células KD (Figura 4), indicando que a presença da Nek1 é importante para a atividade dessa proteína, mas não essencial.

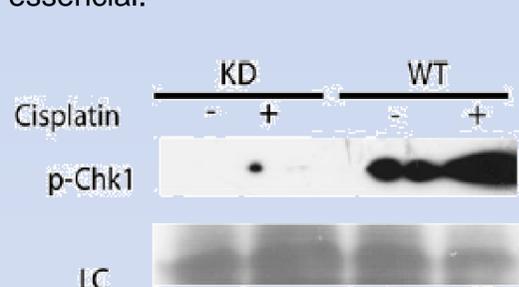


Figura 2: O silenciamento da Nek1 reduz a fosforilação da CHK1. LC- Loading Control.

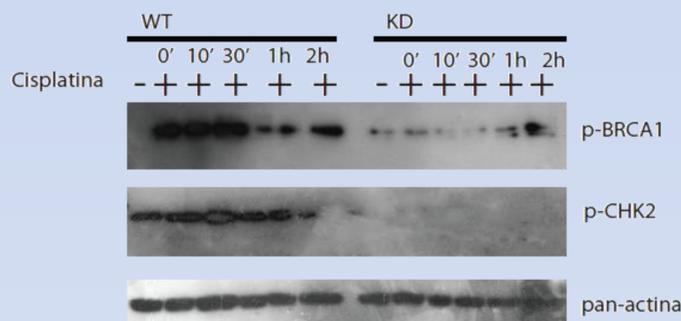


Figura 3: Células silenciadas para Nek1 (KD) apresentam diminuição na fosforilação de BRCA1 e ausência de fosforilação de CHK2 em comparação a linhagem selvagem (WT).

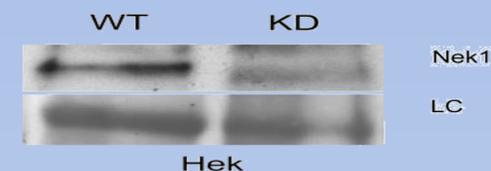


Figura 1. Western Blot mostrando a expressão da proteína Nek1 em ambas as linhagens de Hek293t, WT e KD. LC- Loading control

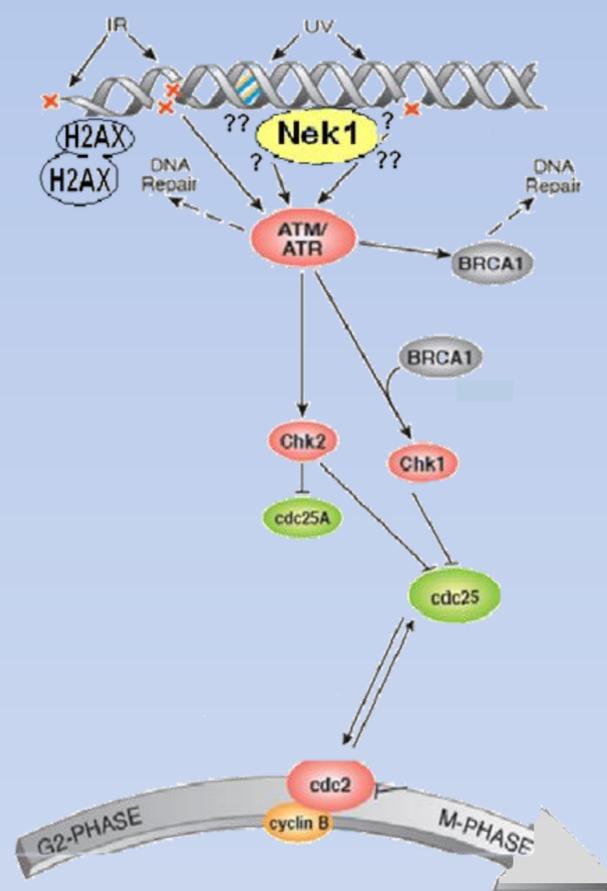


Figura 5: Esquema demonstrando a possível localização da Nek1 na via sensora de dano ao DNA e sinalizando as proteínas utilizadas nesse estudo.

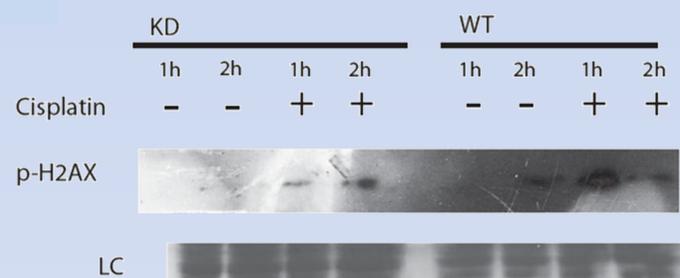


Figura 4: O silenciamento da Nek1 diminui a fosforilação da histona H2AX. LC - Loading control

## DISCUSSÃO

A Nek1 participa do reparo de lesões ao DNA induzidas por cisplatina e a sua ausência altera o padrão de fosforilação de proteínas envolvidas em vias de reparo e *checkpoint*. Essa alteração pode ser responsável pela dificuldade em reparar danos ao DNA induzidos por diferentes agentes, como a cisplatina e também pela maior sensibilidade das linhagens silenciadas a esses. Na figura 5 está representado um esquema da possível atuação da Nek1 na via sensora de dano de DNA, entretanto, não se pode afirmar que a Nek1 interage diretamente com essas proteínas e por isso, estudos específicos deverão ser feitos afim de encontrar moléculas que atuem diretamente com essa cinase.

## PERSPECTIVAS

- Investigar que outras proteínas apresentam alterações devido à ausência da Nek1; após indução de danos ao DNA, principalmente em relação ao reparo de *crosslinks* ;
- Realizar estudos, através de imunoprecipitação e espectrometria de massas, buscando encontrar moléculas que interajam diretamente com a Nek1;
- Elucidar a via de atuação da Nek1 no reparo dos *crosslinks* induzidos por cisplatina.