



FERNANDA LUISA BASEI

**Caracterização do perfil de interação da proteína humana Nek4 e sua
contextualização funcional**

*Characterization of the protein interaction profile of the human kinase
Nek4 and assignment of its functional context*

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA LUISA BASEI

**Caracterização do perfil de interação da proteína humana Nek4 e sua
contextualização funcional**

***Characterization of the protein interaction profile of the human kinase
Nek4 and assignment of its functional context***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Thesis presented to Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Functional and Molecular Biology, in the area of Biochemistry.

Orientador / *Supervisor*: Dr. Jörg Kobarg

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL
DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA LUISA
BASEI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. JÖRG
KOBARG

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B291c Basei, Fernanda Luisa, 1983-
Caracterização do perfil de interação da proteína humana Nek4 e sua contextualização funcional / Fernanda Luisa Basei. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Jörg Kobarg.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteína Nek4 humana. 2. Interatoma. 3. Redes de interações. 4. Reparo do DNA. 5. Processamento de RNA. I. Kobarg, Jörg. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of the protein interaction profile of the human kinase Nek4 and assignment of its functional context

Palavras-chave em inglês:

Nek4 protein, human

Interactome

Interaction network

DNA repair

RNA Splicing

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Jörg Kobarg [Orientador]

Alessandra Luiza Pelegrini

Ana Carolina de Mattos Zeri

Juliana Helena Costa Smetana

Nadja Cristhina de Souza Pinto

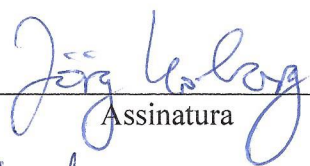
Data de defesa: 27-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

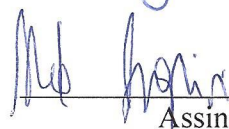
Campinas, 27 de junho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jörg Kobarg (orientador)


Assinatura

Dra. Alessandra Luiza Pelegrini


Assinatura

Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri


Assinatura

Dra. Juliana Helena Costa Smetana


Assinatura

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto


Assinatura

Dr. Marcio Chaim Bajgelman

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo

Assinatura

Resumo

As Neks são proteínas quinases similares a NIMA, proteína que é indispensável para a entrada em mitose de células de *Aspergillus nidulans*. Em humanos foram identificadas 11 Neks (1-11) e, estudos crescentes vêm demonstrando a participação destas em diversas funções celulares além do controle do ciclo e divisão celular. A Nek4 é um dos maiores membros dessa família e sua relação com a manutenção ciliar e resposta ao DNA danificado já foi demonstrada. Contudo, seus parceiros de interação e substratos são ainda desconhecidos. Para melhor compreender o papel da Nek4 foi realizado um estudo de interatoma para identificar novos processos biológicos com os quais a Nek4 está envolvida. Inicialmente foi identificada uma nova isoforma para a Nek4 e assim, realizou-se o estudo de interatoma para as duas isoformas com a finalidade de comparar o perfil de interação das duas proteínas. As duas isoformas da Nek4 foram expressas em células humanas e após imunoprecipitação seguida de identificação por espectrometria de massas, foram identificadas 474 proteínas que interagem com a isoforma 1 da Nek4, Nek4.1 e 149 para a isoforma 2, Nek4.2. Dentre as proteínas identificadas, 102 interagem com ambas isoformas da Nek4. Nossos resultados confirmam o envolvimento da Nek4 com a resposta ao DNA danificado, função ciliar, estabilização dos microtúbulos e ainda sugerem o envolvimento da Nek4 em funções completamente novas, como processamento de RNAm, resposta ao estresse, controle de qualidade das proteínas e apoptose. Entre os parceiros de interação encontramos importantes proteínas como TRAP-1, Whirlin, PCNA, 14-3-3 ϵ , Btf, PARP-1, SRSF1, PAI-RBP1 e KAP-1. As duas isoformas compartilham funções que não foram ainda descritas para os membros da família Nek e a isoforma 1 ainda apresenta funções que já foram descritas para outros membros da família. Aliado ao resultado da imunoprecipitação ainda foram realizadas imunofluorescências que permitiram verificar a localização da Nek4 em diferentes estruturas celulares, como os speckles nucleares e a mitocôndria, corroborando com a função no processamento de RNAm e apoptose. O experimento de imunoprecipitação seguido de identificação por espectrometria de massas também apontou para a possibilidade de autofosforilação e dimerização da Nek4. Além disso, foi possível observar diferenças entre o perfil de interação das duas isoformas da Nek4, sendo que a isoforma 1 interage com proteínas que mantêm funções biológicas similares a outras Neks, que a isoforma 2 não apresenta.

Abstract

Neks are serine-threonine kinases that are similar to NIMA, a protein found in *Aspergillus nidulans* which is essential for cell division. In humans there are eleven Neks (1-11) which are involved in different biological functions besides the cell cycle control. Nek4 is one of largest members of the Neks family and has been related to the primary cilia formation and in DNA damage response. However, its substrates and interaction partners are still unknown. Thus in an attempt to better understand the role of Nek4 we performed an interactomics study to find new biological processes in which Nek4 is involved. Besides, we described here a novel Nek4 isoform and compared the interactomics profile of these two Nek4 proteins. Isoform 1 and isoform 2 of Nek4 were expressed in human cells and after an immunoprecipitation followed by mass spectrometry, 474 interacting proteins were identified for isoform 1 and 149 for isoform 2 of Nek4. 102 proteins are common interactors between both isoforms. Our results confirm Nek4 involvement in the DNA damage response, cilia maintenance and microtubules stabilization, and raise the possibility of new functional contexts including mRNA processing, apoptosis signaling, stress response, translation and protein quality control. Among the interaction partners, we found important proteins such as TRAP-1, Whirlin, PCNA, 14-3-3 ϵ , Btf, PARP-1, SRSF1, PAI-RBP1 and KAP-1. We could observe that both isoforms share functions that are new to the Nek family, and isoform 1 apparently has also maintained functions which have already been established to other Nek family members. From our immunoprecipitation followed by mass spectrometry experiment a possible site for Nek4 autophosphorylation and dimerization was identified. This study provides new insights into Nek4 functions, identifying new interaction partners, localization to new cellular compartment and further suggests an interesting difference between isoform 1 and the novel isoform 2 of Nek4. Nek4 isoform 1 may have maintained similar roles compared to other Neks and these roles are not related to isoform 2.

Sumário

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Agradecimentos	xvii
Lista de Figuras.....	xix
Lista de Tabelas e Quadros.....	xxiii
Lista de Abreviações e siglas.....	xxv
1. Introdução	3
1.1 Neks - o ortólogo NIMA e sua organização estrutural	3
1.2 hNeks e funções biológicas.....	4
1.2.1 Ciclo celular e mitose	9
1.2.2 Dano ao DNA	13
1.2.3 Função ciliar	21
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Amplificação do DNA codificante para a proteína Nek4	33
3.2 Clonagem	34
3.3 Análises <i>in silico</i> da hNek4.....	34
3.3.1 Análise de localização celular	34
3.3.2 Análise da estrutura primária	35
3.3.3 Modificações pós-traducionais.....	36
3.4 Cultivo de células.....	36
3.5 Expressão estável e induzível das Isoformas da Nek4 em linhagens celulares humanas	37
3.6 Imunoprecipitação.....	39
3.6.1 Preparação das amostras para análise de MS	40
3.6.3 Construção da rede de interações – Análise <i>In silico</i> das interações proteína-proteína (PPI)	40
3.7 Separação eletroforética e Western Blotting.....	41

3.8 Coloração por Nitrato de Prata.....	41
3.9 Quantificação de proteína total	42
3.10 Imunofluorescência indireta.....	42
3.11 Silenciamento da Nek4	43
3.12 Irradiação e tratamento com peróxido de hidrogênio	44
3.13 Viabilidade celular	45
3.14 Fracionamento celular.....	45
3.15 Mutagênese sítio dirigida.....	46
3.16 Quantificação de ROS.....	47
4. Resultados e Discussão.....	51
4.1 Amplificação do DNA codificante para a Nek4	51
4.2 Análise em bancos de dados do padrão de expressão e características estruturais da Nek4	55
4.2.1 Localização celular.....	55
4.2.2 Predições estruturais.....	57
4.3 Localização endógena da Nek4 e ciclo celular	64
4.3.1 Nek4 e mitose.....	71
4.4 Nek4 localiza-se em diferentes estruturas celulares	73
4.5 Silenciamento da Nek4	79
4.6 Estabelecimento de linhagens estáveis para expressão induzível da Nek4	80
4.6.1 IP/MS.....	81
4.7 Nek4 e DDR.....	86
4.8 Nek4, mitocôndria e morte celular.....	96
4.9 Função ciliar.....	110
4.10 Processamento de mRNA	116
4.11 Análise dos sítios fosforilados encontrados para Nek4 no experimento de IP/MS	120
5. Conclusões	125
6. Perspectivas	131
7. Referências Bibliográficas.....	135
8. Anexos	153
8.1 Proteínas identificadas no experimento de IP/MS	153

8.2 Anticorpos utilizados	166
8.3 Expressão heteróloga da Nek4KD	167
8.4 Expressão das hNeks no SGC (<i>Structural Genomics Consortium</i>)	174
8.5 Duplo-híbrido em levedura	177
8.6 Artigos submetidos/aceitos	185
8.6.1 Artigo I.....	185
8.6.2 Artigo II.....	185
8.7. Declaração de autorização do Comitê de Biossegurança	247

Ao meu querido Andrey

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe, Zelinda, pela luta, esforço e dedicação para permitir que minha irmã e eu estudássemos e hoje, sem isso, o término dessa etapa não seria possível. Obrigada também pela torcida e orações. Seu apoio nos momentos difíceis foi fundamental.

Ao meu querido pai, que estou certa, sempre esteve ao meu lado dando força, ânimo e esperança para continuar. Sempre será meu maior exemplo! Você sempre será minha maior motivação para continuar, e, sei que independente do que aconteça você estará cuidando de nós.

Ao meu querido Andrey. Fonte da minha motivação, alegrias e inspiração. Obrigada por compartilhar momentos tão difíceis ao meu lado com tanto carinho e dedicação. Por se dedicar e paciente e entusiasmado discutir ideias comigo. Obrigada por me permitir crescer científica e emocionalmente ao seu lado. Obrigada por me ajudar a me manter fiel aos meus princípios e na luta pelo que acreditamos. Você é um exemplo para mim. Admiro demais suas ideias, sua inteligência e caráter. Principalmente, obrigada pelos momentos felizes.

À Ana, minha irmã predileta! Que sempre me motiva, incentiva e torna meu mundo mais especial (rs)!. Você é um exemplo para mim e sempre influenciou muito minhas decisões. Seu Bb admira muito você!

Agradeço ao meu orientador Jörg Kobarg por me aceitar como sua aluna de doutorado, pelo incentivo, por estar sempre disponível e pela compreensão e empolgação com os resultados. Ainda, agradeço pelas oportunidades que me permitiram conhecer grandes centros de pesquisa.

Agradeço à Maria Eugênia Camargo e todo grupo LMA pela colaboração, em especial as companheiras “Nekianas” Edmárcia E. Souza, Priscila F. Papa, Talita D. Melo e Vanessa B. Cardoso pela troca de experiências nestes anos. Aos demais grupos do LNBio, especialmente do Prof. Mário Murakami, pela troca de reagentes e uso de equipamentos (nesse caso, muito obrigada à Celisa Tonoli).

Agradeço à Adriana Paes Leme, Romênia Ramos Domingues e Bianca Alves Pauletti pelo suporte nos experimentos de espectrometria de massas.

Agradeço à equipe do INFABIC e ao Silvio Roberto Consonni pelo auxílio com os experimentos de imunofluorescência confocal. Especialmente ao Silvio pela disponibilidade em ajudar e atenção.

Aos colaboradores Stefan Knapp, Jon Elkins e Joan Roig pela estrutura oferecida durante os estágios realizados no SGC/Oxford e IRB/Barcelona, respectivamente. Agradeço

especialmente ao Juan Pablo Muñoz (IRB) pela receptividade, atenção e disponibilidade em ajudar nos experimentos para quantificação de ROS.

Ao grupo BBE, especialmente as sempre companheiras Aline Sampaio, Carla Polo e Joice Helena Paiva. Pelas conversas “regadas” a boa cerveja e boa comida!

Agradeço também ao Daniel Maragno Trindade, Marcel Nakahira e Marcos Rodrigo Alborghetti pelas frutíferas conversas que me ensinaram muito e inspiraram várias ideias. Pela paciência em ouvirem minhas frustrações e interesse em ajudar sempre.

À Gabriela Vaz Meirelles pelo auxílio no início do doutorado, pelas dicas, pelos divertidos momentos em Oxford e pela contribuição no desenvolvimento do projeto e confecção do artigo.

Ao Deivid Lucas Migueleti pelas conversas, discussões científicas e pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

À Manuela Lourenço Barros Moretti, pela oportunidade em compartilhar conhecimentos.

Agradeço à Ariane Furlan, Fabiana Forte, Marcel Nakahira e Ângela Saito pelos encontros divertidíssimos. Já sinto saudades!

À Germanna Riguetto pelas longas conversas, discussões científicas e de vida, pelas ideias compartilhadas (ou não) e os momentos muito divertidos. Obrigada pela amizade!

À Bárbara Smilgys por acrescentar outro ponto de vista para meu doutorado, pelas conversas sobre tudo, e por ter um “pessoalzinho” muito especial para momentos agradabilíssimos. Você foi uma surpresa muito boa no meu doutorado!

Agradeço ao Mario pela torcida e orações. À Dulce e Júlio pelo incentivo e torcida. Às minhas queridas, tia Zaira, tia Anísia e Ana Lúcia pelas palavras confortantes nos momentos difíceis e as “férias” exóticas (rs)!

Agradeço aos membros da banca de qualificação Celso Eduardo Benedetti, Juliana Helena Costa Smetana e Patrícia da Silva Melo pelas correções e sugestões.

Agradeço ao CNPEM/LNBio pela estrutura oferecida.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelos recursos concedidos para realização desse trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da estrutura secundária das onze Neks humanas e regiões conhecidas de interação.....	6
Figura 2: Tríade funcional das Neks humanas.....	9
Figura 3: Participação das hNeks na progressão do ciclo celular.....	11
Figura 4: Participação das Neks 2, 6, 7 e 9 juntamente com Eg5/KIF11 na separação dos centrossomos.....	13
Figura 5: Panorama da indução de dano ao DNA, identificação do tipo de dano, resposta celular.....	15
Figura 6: Vias de Reparo HR, NHEJ e NER.....	17
Figura 7: Estrutura do cílio.....	22
Figura 8: Montagem e desmontagem dos cílios e proteínas associadas.....	24
Figura 9: Esquema da transfecção, recombinação e indução da expressão nas células FlpIn.....	38
Figura 10: Amplificação do cDNA para Nek4.....	52
Figura 11: Comparação entre as isoformas da Nek4.....	54
Figura 12: Predição de sinal para localização nuclear (NLS) na sequência de resíduos de aminoácidos da Nek4.....	56
Figura 13: Localização nuclear da Nek4.....	57
Figura 14: Predição da estrutura secundária da Nek4.....	59
Figura 15: Predição de regiões enoveladas da Nek4.1.....	60
Figura 16: Predição de sumoilação da Nek4.1.....	61
Figura 17: Alinhamento do <i>loop</i> de ativação das hNeks.....	63
Figura 18: Alinhamento domínio quinase (lobo N-terminal) das Neks.....	64
Figura 19: Marcação da Nek4 endógena durante a divisão celular em HeLa.....	66
Figura 20: Marcação da Nek4 endógena durante a divisão celular em HEK293.....	68
Figura 21: Citocinese e formação do <i>midbody</i>	70
Figura 22: Localização da Nek4 em células em divisão.....	70
Figura 23: Colocalização da Nek4 endógena e Tubulina acetilada e KIF11.....	71
Figura 24: Nek4 localiza-se em diferentes estruturas relacionadas a divisão celular.....	72
Figura 25: Localização subnuclear da Nek4 – corpos PML.....	74
Figura 26: Localização subnuclear da Nek4 – <i>speckles</i> nucleares.....	74
Figura 27: Localização subnuclear da Nek4 em HeLa.....	76

Figura.28: Localização mitocondrial da Nek4.....	77
Figura 29: Fracionamento da HEK293T e HEK293FlpIn.....	78
Figura 30: Silenciamento da Nek4.....	80
Figura 31: Estabelecimento das linhagens estáveis para expressão das Neks 4.1 e 4.2.....	81
Figura 32: Imunoprecipitação da Nek4 e seus parceiros de interação.....	82
Figura 33: Rede de interação de proteínas identificadas por IP/MS para as isoformas Nek4.1 e Nek4.2.....	84
Figura 34: Verificação da presença das proteínas identificadas após espectrometria de massas nos imunoprecipitados.....	85
Figura 35: Perfil da população celular após IR.....	88
Figura 36: Marcação da Nek4 e γ H2AX após IR.....	90
Figura 37: Marcação da Nek4 e γ H2AX após estímulo com diferentes agentes.....	91
Figura 38: Translocação da Nek4 para mitocôndria após dano ao DNA.....	92
Figura 39: Localização da Nek4 endógena e PCNA.....	96
Figura 40: Localização endógena das proteínas Nek4 e PARP1.....	100
Figura 41: Regulação do poro de transição na membrana interna da mitocôndria.....	101
Figura 42: Colocalização da Nek4 e TRAP1 endógenas.....	103
Figura 43: Colocalização da Nek4 e as proteínas 14-3-3 ϵ e SLC25A6.....	105
Figura 44: Colocalização da Nek4 e BCLAF.....	106
Figura 45: Envolvimento da Nek4 na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio.....	108
Figura 46: Envolvimento da Nek4 na produção de ROS induzida por peróxido de hidrogênio.....	109
Figura 47: Envolvimento da Nek4 na produção de ROS induzida por peróxido de hidrogênio em células estavelmente silenciadas.....	109
Figura 48: Localização da Nek4 no cílio primário.....	111
Figura 49: Localização da Nek4 e Tubulina acetilada em células HEK293T.....	114
Figura 50: Localização da Nek4 e Whirlin em células HEK293T.....	114
Figura 51: Localização da Nek4 e SF2 e hnRNPQ.....	120
Figura 52: Teste de expressão da Nek4KD.....	169
Figura 53: Purificação através de cromatografia de afinidade da Nek4KD.....	170
Figura 54: Expressão em larga escala da Nek4KD.....	170
Figura 55: Purificação Nek4KD – Troca Iônica.....	172
Figura 56: Purificação Nek4KD – Afinidade por metal.....	172

Figura 57: Identificação da Nek4 por espectrometria de massas.....	173
Figura 58: Expressão das Neks 6 e 7.....	175
Figura 59: Purificação das Neks 1 e 6.....	176
Figura 60: Cromatograma da exclusão por tamanho realizada para as amostras Nek1, 6 e 7.....	176
Figura 61: Ensaio de deslocamento térmico para Nek6.....	177
Figura 62: Esquema representativo do sistema de duplo-híbrido em levedura.....	178
Figura 63: Teste de ativação do gene repórter β -galactosidase e de crescimento para pBTM116KQ/Nek4 em meio seletivo.....	179
Figura 64: Teste de ativação do gene repórter para β galactosidase com as colônias que cresceram no <i>screening</i> do duplo-híbrido para a Nek4.....	181
Figura 65: Teste do azul para confirmar interações entre a Nek4 e as proteínas pescadas no duplo-híbrido.....	183

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1: Função celular, estrutura/ciclo celular/doenças em mamíferos.....	8
Quadro 2: Anticorpos utilizados.....	166
Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores.....	33
Tabela 2: Condições da PCR.....	34
Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas para clonagem em diferentes vetores.....	34
Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para mutagênese.....	46
Tabela 5: Lista das proteínas encontradas.....	153
Tabela 6: Predição dos sítios de fosforilação para os parceiros da Nek4.....	95
Tabela 7: Sítios fosforilados identificados no experimento de IP/MS.....	121
Tabela 8: Testes de expressão Nek4KD.....	168
Tabela 9: Testes de expressão/purificação para diferentes construções das Neks.....	175
Tabela 10: Identificação das presas obtidas no <i>screening</i> de duplo-híbrido.....	182
Tabela 11: Resumo dos resultados de crescimento e teste do azul das presas obtidas.....	182

Lista de Abreviações e siglas

Aa: aminoácidos

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

ATR *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

BioGrid: *Database of protein and Genetic Interactions*

BGH: Hormônio de crescimento bovino (*Bovine growth hormone*)

BSA: Albumina bovina sérica (*Bovine serum albumine*)

cDNA: DNA complementar

Cdk: Kinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

CDS: Sequência de DNA codificadora (*Coding DNA sequence*)

CMV: Citomegalovírus

C-Nap1: *Centrossomal Nek2-associated protein 1*

DAXX: Proteína associada à morte (*Death-associated protein*)

DDR: Resposta ao DNA danificado (*DNA damage response*)

DNA-PKcs: Subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*)

DFNB31: Whirlin (*Autosomal recessive deafness type 31 protein*)

DSBs: Quebras de fita dupla (*Double strand breaks*)

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

FGF: Fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblast growth factors*)

GW *bodies*: regiões citoplasmáticas marcadas com a proteína GW182

HeLa: *Human epithelial cervical cancer cell line*

HEK293: *Human Embryonic Kidney 293 Cell line*

HEK93T: HEK293 que expressa o antígeno T do SV40 constitutivamente.

hnRNPQ: Ribonucleoproteína heterogênea nuclear Q (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Q*)

HR: Recombinação homóloga (*Homologous recombination*)

IFT: Transporte intraflagelar

IAA: Iodacetamida

IP: Imunoprecipitação

IR: Radiação ionizante

IRIF: Foco induzido por irradiação (*Irradiation induced foci*)

Jck: *Juvenile cystic kidney*

KIF11: *Kinesin-like protein 1/Eg5*

MMR: Reparo de bases mal pareadas (*DNA mismatch repair*)

MK5: *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 5*

mRNA: RNA mensageiro

MS: Espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

MT: Microtúbulos

MTCO: Centro organizador de microtúbulos (*Microtubule-organizing center*)

MW: *Molecular weight*

NEB: Dissociação da membrana nuclear (*nuclear envelope breakdown*)

Nek: *NIMA Related Kinase*

NER: Reparo por excisão de nucleotídeo (*nucleotide excision repair*)

NES: Sinal de exportação nuclear (*Nuclear export signal*)

NHEJ: Junção de extremidades não-homólogas (*Non homologue End Joining*)

NIMA: *Never in mitoses gene A*

NLS: *Nuclear localization signal*

NSCLC: Câncer de pulmão de células não-pequenas (*non-small cell lung cancer*)

PAR: *Poly ADP ribose*

PARP: *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)

PEI: *Polyethyleneimine*

PI: Iodeto de propídeo

p53: Proteína tumoral 53kDa

Pfam: *Protein families database*

PKC: Proteína Kinase C

PKD: Doença policística renal (*Polycystic Kidney Disease*)

Plk: *Polo-like kinases*

PMC: Material pericentriolar

PML: Proteína de leucemia promielocítica (*Protein of promyelocyt leukemia*)

PMSF: Fluoreto de fenil metil sulfonamida

PEST: Prolina, glutamato, serina e treonina

PVDF: Polivinildifluoridina

RCC1: Regulador de condensação cromossômica (*Regulator of Chromosome Condensation*)

RE: Retículo Endoplasmático

RFC: *Replication Factor C*

ROS: Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

snRNAs: RNAs nucleares pequenos (*small nuclear RNAs*)

snRNPs: Ribonucleoproteínas pequenas nucleares (*small nuclear ribonucleoproteins*)

siRNA: *Small interfering RNAs*

SRF: *Serine, Arginine Factors*

SRPK: *Serine arginine protein kinase*

SUMO: *Small Ubiquitin-like Modifier*

TRAP1: *TNFR-associated protein 1 / Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial / Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein*

TUBA/TUBB/TUBG/TUBac: Tubulinas alfa, beta, gama e tubulina acetilada

UPR: Resposta a proteínas desenoveladas (*unfolded protein response*)

VDAC: Canal dependente de voltage 1 – Porina 1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*)

XP: Xeroderma pigmentoso

Introdução

1. Introdução

1.1 Neks - o ortólogo NIMA e sua organização estrutural

A denominação Neks se refere a um grupo de serina treonina quinases que, em humanos, é constituído por onze proteínas. Essa denominação se deve à relação estrutural primária no domínio quinase desse grupo de proteínas com a proteína de *Aspergillus nidulans*, NIMA, do inglês: *never in mitosis gene A*, portanto Nek origina-se a partir de NIMA related kinases.

A proteína NIMA foi identificada pelo grupo de Ron Morris quando este realizou um *screening* de vários genes que poderiam ter envolvimento com a progressão do ciclo celular em *Aspergillus nidulans* (Morris, 1976). Quando o gene A era mutado, ocorria a parada do ciclo celular e as células não entravam mais em mitose (Bergen, Upshall e Morris., 1984). A proteína codificada por este gene, então denominada NIMA, é uma quinase responsável pela fosforilação da histona H3 e consequentemente a condensação cromossômica necessária para a divisão celular (De Souza *et al.*, 2000). Além da sua importância para dar início a divisão celular, NIMA deve ser degradada para a saída da mitose, o que a coloca como um regulador chave para a divisão celular (Pu e Osmani, 1995) em *A. nidulans*.

Em humanos, a família Nek (hNeks) é constituída por onze membros (Neks1-11) sendo que estes apresentam um domínio catalítico, geralmente N-terminal, conservado e diferem consideravelmente em seu domínio regulatório, o que, provavelmente, determina suas diferenças funcionais uma vez que é o envolvido com as interações com outras proteínas (O'Connell *et al.*, 2003; Moniz *et al.*, 2011) (Figura 1).

A Nek1 é a maior da família e, embora tenha sido a primeira Nek humana descrita (Letwin *et al.*, 1992), é a Nek2 a mais extensivamente estudada, apresentando a maior similaridade sequencial (47%) a NIMA no seu domínio quinase (Fry, 1999). A Nek6 e Nek7 são as menores proteínas da família (313 e 312 resíduos, respectivamente), não apresentando o domínio regulatório carboxi-terminal (Belham *et al.*, 2003), e compartilham a maior similaridade sequencial primária no domínio quinase (cerca de 85%) entre as hNeks. Em relação ao domínio quinase é interessante ressaltar a Nek10 como o membro

mais distinto da família, uma vez que o seu domínio quinase localiza-se centralmente flanquado por duas regiões regulatórias.

Curiosamente, algumas Neks possuem um domínio quinase similar a alguns membros da família Neks, mas, o domínio regulatório se parece mais, sequencialmente, a outros membros. É o caso da Nek11, que no domínio quinase apresenta similaridade com Nek3 e Nek4, mas no domínio regulatório se parece mais com a Nek2 (Noguchi *et al.*, 2002), sugerindo que estas podem assumir funções catalíticas similares mas em diferentes compartimentos celulares ou com diferentes substratos.

A divergência no domínio regulatório se estende a presença de domínios diferentes nessas proteínas, por exemplo, a presença de *coiled coils* é uma característica comum, mas não unânime entre as hNeks. Nek3, 4 e 8 não apresentam esses motivos em seu domínio regulatório. Já, os domínios de degradação do tipo PEST (região rica em Prolina, Acido Glutâmico, Serina e Treonina) não estão presentes nas Neks 4, 5 e 8. Somente a Nek5 apresenta um *Dead box helicase domain*, envolvido no processamento de RNAm e regulação da expressão gênica (Young, Khoshnevis e Karbstein, 2013). O domínio RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation*) é exclusivo para Nek8 e Nek9, enquanto a Nek10 é a única a apresentar sequências repetitivas *armadillo*, importantes para interação com outras proteínas (Huber, Nelson e Weis, 1997) (Figura 1).

Atualmente são conhecidas as estruturas dos domínios catalíticos de apenas três membros da família: Nek2 (Rellos *et al.*, 2007), Nek7 (Richards *et al.*, 2009) e mais recentemente Nek1 (PDBID: 4APC e 4B9D), demonstrando a dificuldade em obter essas proteínas em grande quantidade, principalmente das proteínas inteiras, ou mesmo no estabelecimento das condições adequadas para garantir sua estabilidade *in vitro*. Ainda, essa dificuldade e consequente ausência de informações estruturais dificulta o entendimento da atividade dessas quinases e das diferenças entre estas uma vez que é dada principalmente pela divergência no domínio regulatório.

1.2 hNeks e funções biológicas

Desde a primeira descrição de Neks em humanos, em 1992 (Letwin *et al.*, 1992) e a caracterização de todas as outras, que ocorreu nos anos subsequentes até 2002, com

exceção da Nek10 (que ainda apresenta divergências em relação à sequência de resíduos de aminoácidos) e a Nek5 (a hNek menos estudada), as funções identificadas para essas proteínas extrapolaram o controle do ciclo celular exercido pela homóloga NIMA (Quadro 1). Atualmente, pode-se classificar o envolvimento destas em três processos biológicos principais interconectados que serão discutidos detalhadamente a seguir: função ciliar, controle do ciclo e divisão celular e ainda resposta ao DNA danificado (DDR) (Figura 2).

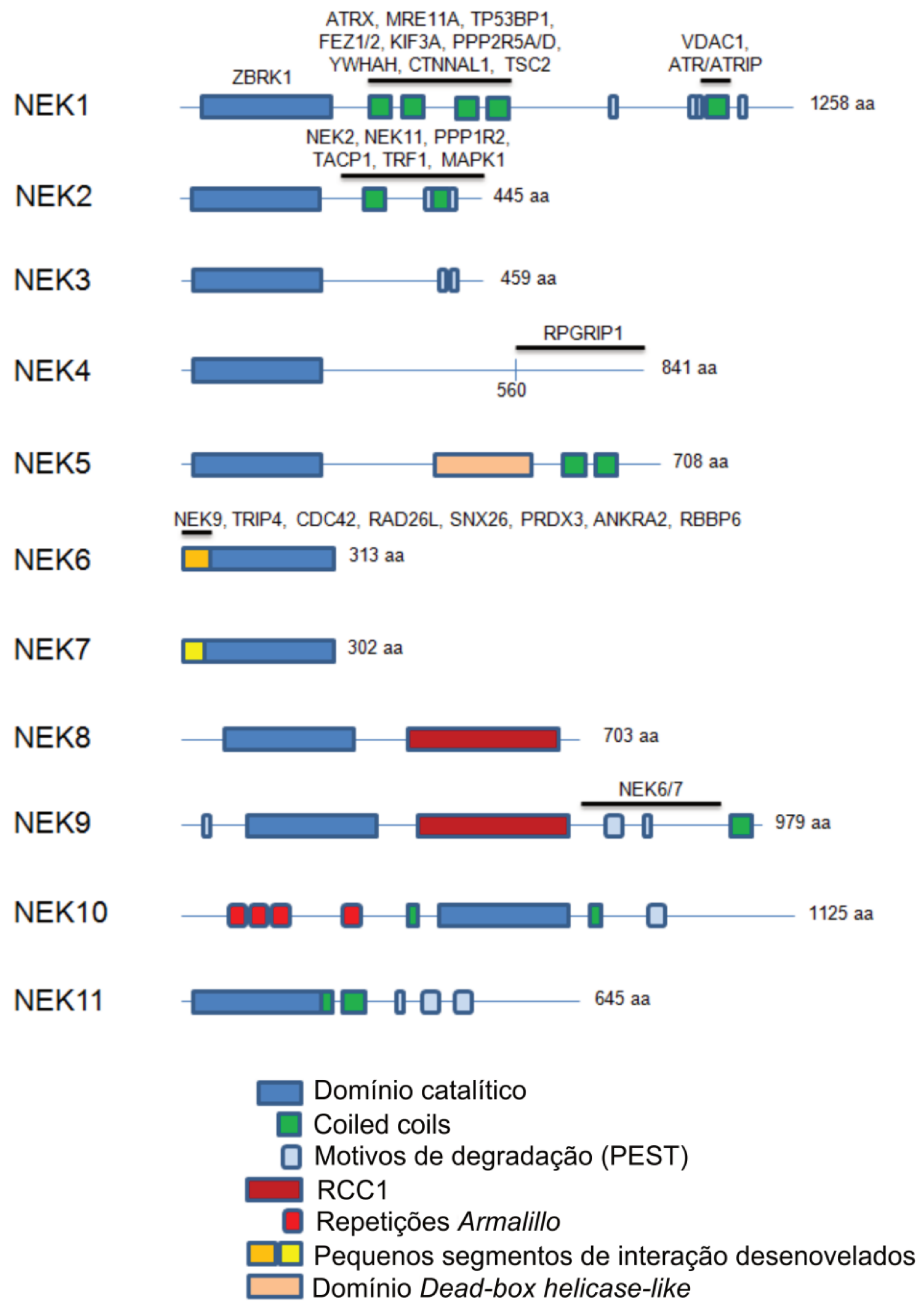


Figura 1: Representação da estrutura secundária das onze Neks humanas e regiões conhecidas de interação. As hNeks apresentam um domínio catalítico (em azul) conservado e o regulatório varia consideravelmente em tamanho e estrutura. PEST (azul claro)- região rica em Prolina, Ácido Glutâmico, Serina e Treonina, que confere maior susceptibilidade a proteólise (Rogers, Wells e Rechsteiner, 1986); Repetições Armadillo (vermelho)- relação com interação com outras proteínas (Huber, Nelson e Weis, 1997); Dead box helicase-like domain (salmão)- envolvido com processamento de mRNA e regulação da expressão gênica (Young, Khoshnevis e Karbstein, 2013) e RCC1 (púrpura). Está representada a região do domínio regulatório através das quais ocorre a interação com as proteínas indicadas (ID gene). Nek1 (Surpili, Delben e Kobarg, 2003; Chen, Carigen e Riley, 2002; Liu et al., 2013) Nek2 (Noguchi *et al.*, 2002; Zhu, Lan e Yu, 2007 e Helps *et al.*, 2000) Nek4 (Coene *et al.*, 2011) Nek6 (Meirelles *et al.*, 2011) Nek9 (Roig *et al.*, 2002). Figura Meirelles *et al.*, 2014.

Nek	Função biológica	Estrutura/ciclo celular	Doenças Relacionadas
Nek1	Ciliogênese; ¹⁻⁵ DDR; ⁶⁻¹⁰ Sinalização de apoptose. ¹¹	Núcleo, membrana nuclear; ⁵⁵	PKD ¹ e infertilidade em camundongos; ⁵⁶ Alta expressão em câncer de mama e ovariano. ⁵⁵
Nek2	Separação dos centrôssomos; ¹²⁻¹⁷ Ponto de checagem em mitose; ¹⁸ Sinalização de SAC e alinhamento e segregação dos cromossomos. ¹⁹	Centrôssomo/ MTOC; Citoplasma (microtúbulos); Núcleo e pontes citocinéticas. ⁵⁵	Aumento da expressão em duto biliar; ⁵⁷ Aumento da expressão em câncer de mama; ^{58,59} Aumento em câncer ovariano; ⁶⁰ (RNAm) Aumento da expressão em mieloma ⁶¹ câncer cervical Aumento da expressão em tumores de Ewing, linfomas de células B, colangiocarcinomas, adenocarcinomas de pulmão e seminomas testiculares; ⁶²⁻⁶⁷ Sua expressão no citoplasma encontra-se aumentada em carcinoma ductal invasivo (IDC) e carcinoma ductal <i>in situ</i> concomitante (DCIS); ⁶⁸ Expressão relacionada a neuroblastoma. ⁶⁹
Nek3	Acetilação de tubulinas; ²⁰ morfologia e polaridade dos neurônios; ²⁰ Endocitose; ²¹ Sinalização da Prolactina. ^{22,23}	ND	Câncer de mama; ^{55,70} Câncer de pulmão tem redução da expressão. ⁵⁵
Nek4	estabilização dos microtúbulos; ²⁴ e formação do cílio primário; ²⁵ DDR. ²⁶	Núcleo ⁵⁵	Redução em câncer de mama, pâncreas, próstata e estômago. ⁵⁵
Nek5	Diferenciação de células musculares. ⁸²	ND	Reduzido em cabeça e pescoço. ⁵⁵
Nek6	Formação e manutenção do fuso mitótico, fosforilação de Eg5, separação dos centrôssomos citocinese/ <i>midbody</i> ; ²⁸⁻³⁶ Fosforilação <i>in vitro</i> de H1 e H3; ³⁷ DDR; ³⁸ Senescência. ³⁹	ND	Aumento da expressão em câncer gástrico; ^{55,71} Linfoma não Hodgkin, mama, colo retal e pulmão; ^{55,72} Aumento em carcinoma hepatocelular ^{73,74} Aumento da expressão em esofagite erosiva e adenocarcinoma de esôfago; ⁷⁵ Redução em câncer de próstata, renal e endometrial. ⁵⁵
Nek7	Duplicação do centríolo, maturação do centrôssomo e formação do fuso mitótico, separação dos centrôssomos. 28,32,35,40,41	ND	Alta expressão em câncer de laringe, mama, colórectal e vesícula biliar; ^{76,72} Redução em cabeça e pescoço, próstata e estômago. ⁵⁵
Nek8	Função ciliar/ sinalização. ⁴²⁻⁴⁴	Região proximal do cílio primário/ centrôssomo Núcleo e citoesqueleto. ⁵⁵	PKD/ câncer de mama; ⁷⁷ Mutações do gene em câncer de pâncreas; ⁷⁸ Redução em renal e de estômago. ⁵⁵
Nek9	Fosforila Nek6 e 7/ Separação dos centrôssomos	Mitocôndria ⁵⁵	Associação com câncer cabeça e pescoço; ⁷⁹

	/Alinhamento e segregação dos cromossomos/Citocinese; ^{28,32,34,45-48} Regula a progressão de G1 e S através da interação com o complexo facilitador da transcrição da cromatina (FACT). ⁴⁹		Alta expressão em LMC. ⁸⁰
Nek10	DDR ⁵⁰	ND	Redução em colo retal e de estômago; ⁵⁵ Gene potencial causador de câncer de mama. ⁸¹
Nek11	Fosforilação H1, H2 e H3 e CDC25A DDR/ Ponto de checagem G2/M ⁵¹⁻⁵⁴	Núcleo ⁵⁵	Redução em câncer de testículo e epitélio do trato urinário. ⁵⁵

Quadro 1: Função celular, estruturas/ciclo celular/ doenças em mamíferos. LMC leucemia mielóide crônica MTOC: centro organizador de microtúbulos DDR: resposta ao DNA danificado FACT: facilitador da transcrição da cromatina PKD: doença policística renal SAC ponto de checagem de montagem do fuso ND: informação não disponível no banco de dados consultado.

1. Upadhyia *et al.*, 2000; 2. White e Quarmby, 2008; 3. Thiel *et al.*, 2011; 4. Yim *et al.*, 2011; 5. Holloway *et al.*, 2011; 6. Surpili *et al.*, 2003; 7. Polci *et al.*, 2004; 8. Liu *et al.*, 2013; 9. Chen *et al.*, 2011; 10. Pelegrini *et al.*, 2010; 11. Chen *et al.*, 2010; 12. Fry *et al.*, 1995; 13. Fry *et al.*, 1999; 14. Fry *et al.*, 2002; 15. Rapley *et al.*, 2005; 16. Mardin *et al.*, 2010; 17. Matsuo *et al.*, 2010; 18. Liu *et al.*, 2010; 19. Wei *et al.*, 2011; 20. Chang *et al.*, 2009; 21. Benjamin *et al.*, 2011; 22. Miller *et al.*, 2005; 23. Miller *et al.*, 2007; 24. Doles e Hemann, 2010; 25. Coene *et al.*, 2011; 26. Nguyen *et al.*, 2012; 28. Belham *et al.*, 2003; 29. Rapley *et al.*, 2008; 30. O'Regan e Fry, 2009; 31. Meirelles *et al.*, 2010; 32. Bertran *et al.*, 2011; 33. Kang *et al.*, 2011; 34. Sdelci *et al.*, 2011; 35. Kim *et al.*, 2011; 36. Hashimoto *et al.*, 2002; 37. Skoblov *et al.*, 2013; 38. Lee *et al.*, 2008; 39. Jee *et al.*, 2010; 40. Yissachar *et al.*, 2006; 41. Kim *et al.*, 2007; 42. Mahjoub *et al.*, 2005; 43. Smith *et al.*, 2006; 44. Otto *et al.*, 2008; 45. Roig *et al.*, 2002; 46. Roig *et al.*, 2005; 47. Sdelci *et al.*, 2012; 48. Kaneta e Ullrich, 2013; 49. Tan e Lee, 2004; 50. Moniz e Stambolic, 2011; 51. Nogushi *et al.*, 2002; 52. Nogushi *et al.*, 2004; 53. Melixetian *et al.*, 2009; 54. Sorensen *et al.*, 2010; 55. Berglund *et al.*, 2008; 56. Holloway *et al.*, 2011; 57. Kokuryo *et al.*, 2007; 58. Tsunoda *et al.*, 2009; 59. Marina e Saavedra, 2014; 60. Liu *et al.*, 2014; 61. Zhou *et al.*, 2013; 62. Wai *et al.*, 2002; 63. de Vos *et al.*, 2003; 64. Kokuryo *et al.*, 2007; 65. Landi *et al.*, 2008; 66. Barbagallo, *et al.*, 2009; 67. Adréasson *et al.*, 2009; 68. Wang *et al.*, 2011; 69. Kohler *et al.*, 2010; 70. McHale *et al.*, 2008; 71. Takeno *et al.*, 2008; 72. Capra *et al.*, 2006; 73. Chen *et al.*, 2006; 74. Cao *et al.*, 2012; 75. Kasap *et al.*, 2012; 76. Wang *et al.*, 2013; 77. Bowers e Boylan, 2004; 78. Carter *et al.*, 2010; 79. Wu *et al.*, 2011; 80. Cooper *et al.*, 2013; 81. Ahmed *et al.*, 2009; 82. Shimizu e Sawasaki, 2013.

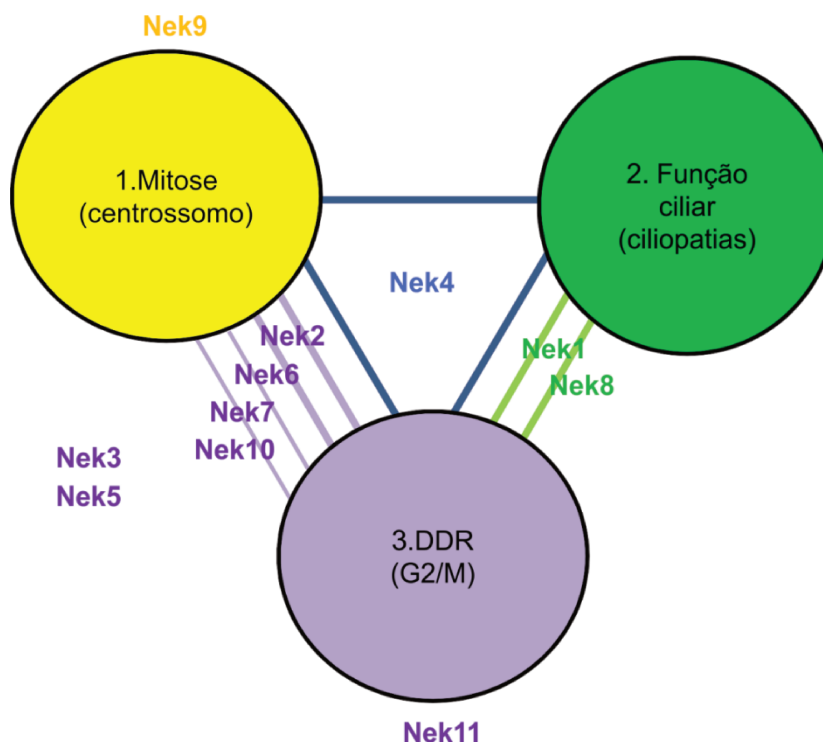


Figura 2: Tríade funcional das Neks humanas. As informações obtidas até o momento permitem classificar as hNeks em três principais funções biológicas, mitose e função centrossomal, resposta ao DNA danificado (DDR) com *checkpoint* G2/M e função ciliar. Nek11 e Nek9 foram, até o momento, envolvidas exclusivamente em DDR e mitose, respectivamente. As linhas mais espessas representam a relação já bem estabelecida na literatura entre as Neks e respectivas funções e, as linhas finas representam as informações que foram obtidas pelo nosso grupo através de estudos de interactoma. Nek4 parece estar envolvida nos três processos biológicos. Adaptado de Meirelles *et al.*, 2014.

1.2.1 Ciclo celular e mitose

Os mecanismos de divisão celular foram elucidados entre 1970 e 80 pelos grupos de Lee Hartwell, Paul Nurse e Tim Hurt. O ciclo celular é composto por dois períodos: a intérfase e a divisão celular. O período de intérfase é mais longo e envolve diferentes etapas que garantem a integridade do DNA e as condições de normalidade para as células filhas geradas. As etapas da interfase incluem a fase G1, na qual ocorre aumento na síntese de proteínas da célula proporcionando o aumento de tamanho da mesma; fase S, quando o DNA da célula é duplicado, bem como o centro organizador de microtúbulos; a fase G2, quando são sintetizadas moléculas importantes para a divisão celular e por fim, a fase G0, fase em que a célula pode ser considerada em estado quiescente, não está em “atividade”. A Mitose, que é a divisão celular propriamente dita, ocorre após G2. Entre cada etapa, existem pontos denominados pontos de checagem, ou do inglês, *checkpoints*, nos quais ocorre a verificação da integridade e condições da célula e DNA antes de prosseguir no

ciclo celular (passar para a etapa seguinte). Caso a célula ou DNA apresente algum “erro”, a divisão celular é interrompida e a célula volta para o estado G0 (para revisão Lapenna e Giordano, 2009).

Os *checkpoints* foram identificados no final da fase G1 (Ponto de restrição), na passagem de G2 para mitose e dentro da própria mitose (na metáfase). Foram identificadas também as proteínas que efetuam essa “verificação”, sendo as principais as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs). A perda ou falha dessa verificação vem sendo associada com o desenvolvimento de células neoplásicas, uma vez que essas não obedecem mais o ritmo de divisão celular e apresentam um acúmulo de erros no DNA (para revisão Malumbres e Barbacid, 2007).

Desde essa caracterização, vem-se investigando e investindo no estudo das proteínas que regulam a divisão celular para o entendimento do desenvolvimento de tumores bem como para o desenvolvimento de fármacos que atuem de forma específica sobre essas proteínas. Durante muito tempo as proteínas mais estudadas e consideradas alvos evidentes foram as CDKs, contudo, atualmente, são conhecidas várias outras proteínas quinases que participam do controle do ciclo celular e estas passaram a ser, também, possíveis alvos para ação de fármacos. Dentre essas proteínas estão várias outras quinases como a Aurora, a Polo like kinase, ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) e ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) (para revisão Malumbres e Barbacid, 2007; Lapenna e Giordano, 2009).

As Neks têm sido implicadas na regulação do ciclo celular, em funções constitutivas, relacionadas à formação do fuso/ separação dos centríolos e também nos *checkpoints* que serão melhor discutidos no tópico de reparo ao DNA danificado. Diante disso, atualmente as hNeks são também alvos interessantes para intervenção em tratamentos de diversas doenças (Quadro 1).

1.2.1.1. Mitose e Centrossomo

O centrossomo, que consiste em dois centríolos e no material pericentriolar (PMC) é o centro primário organizador de microtúbulos (MTOC). Os centrossomos canônicos consistem de 9 pares de microtúbulos. Na fase S ocorre a duplicação dos centríolos, formando-se dois centríolos filhos que dispõem-se perpendicularmente aos centríolos

originais. Durante S e G2 os centríolos filhos ainda estão ligados aos originais, durante a transição G2/M o centrossomo acumula mais material pericentriolar e os centríolos filhos começam a se separar dos originais. O *linker* que os unia começa a se dissolver. Os centrossomos poderão então formar os pólos mitóticos. Ao sair da mitose a célula possui um centríolo original e um filho.

Muitos dos membros da família hNeks, assim como a NIMA o faz em fungo, participam da regulação do ciclo celular (Figura 3), embora diferente dessa, as hNeks não sejam absolutamente necessárias para entrada em divisão. Nek2, Nek6, Nek7 e Nek9 participam em diferentes etapas e algumas vezes cooperativamente na mesma etapa do ciclo celular.

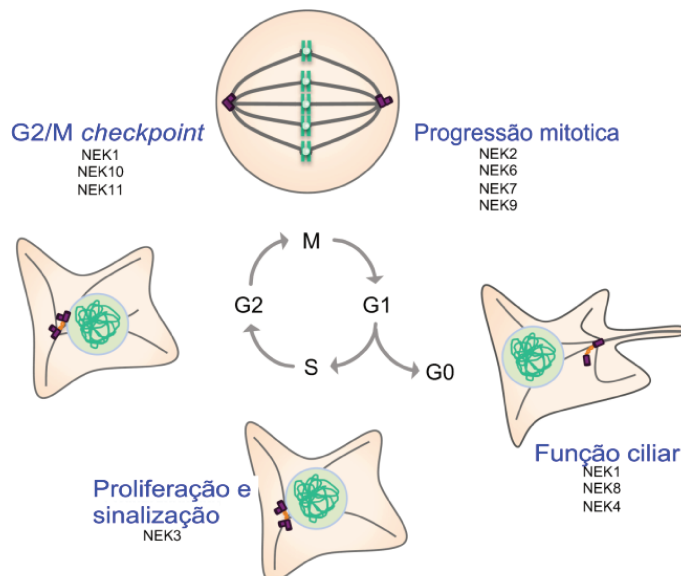


Figura 3: Participação das hNeks na progressão do ciclo celular. O desempenho de alguma atividade das hNeks está em geral associada ao centrossomo, o que proporciona claro envolvimento com o ciclo celular e também com formação ciliar. Nek2, Nek6, Nek7 e Nek9 cooperam para a formação de um fuso mitótico robusto. Ainda, estas podem participar da quebra do envelope nuclear, condensação da cromatina e citocinese. Já Nek1, Nek10 e Nek11 foram implicadas no ponto de checagem G2/M após dano ao DNA e, Nek4, juntamente com Nek1 e Nek8 estariam associadas a função ciliar em G1/G0. Nek3 ainda não foi relacionada a nenhuma fase específica do ciclo celular. Adaptado de Fry *et al.*, 2012.

Antes da dissolução do envelope nuclear ocorre a atividade cooperada das Neks: 9, 6 e 7. A expressão das Nek6 e Nek7 aumenta durante a mitose, quando também ocorre a sua ativação mediada pela fosforilação dos resíduos de serina 206 e serina 195, respectivamente. Essa fosforilação é mediada através da Nek9 (Belham *et al.*, 2003;

O'Regan e Fry, 2009) e será importante para separação dos centrossomos (Figura 4). No trabalho de Bertran e colaboradores (2011) foi proposto que o mecanismo pelo qual a KIF11 é ativada e pode mediar a separação dos centrossomos é via Plk que ativa Nek9 e esta subsequentemente ativa Nek6/Nek7 que então fosforilam o resíduo de serina na posição 1033 da KIF11 (Figura 4).

Nek7 ainda é necessária para a duplicação dos centríolos, maturação do centrossomo e formação do fuso mitótico, uma vez que quando esta é silenciada, as proteínas do PMC não acumulam no centrossomo nas transições G1/S e G2/M (O'Regan e Fry, 2009; Salem *et al.*, 2010) (Figura 4).

A Nek2 apresenta expressão dependente da fase do ciclo celular, com pico nas fases S e G2, período em que se concentra nos centrossomos (Fry *et al.*, 1995; Fry *et al.*, 1998). Ainda, após a dissolução do envelope nuclear, Nek2 é crucial para a separação dos centríolos através da fosforilação de C-Nap1 (ou CEP250) e *rootletin* e consequentemente leva à “dissolução” do filamento que conecta os centríolos (Fry *et al.*, 1998) (Figura 4). Ainda, em *Drosophila melanogaster*, Nek2 já foi detectada no “*midbody*” na fase tardia da mitose sendo que sua superexpressão leva à falência da citocinese (Prigent, Glover e Giet, 2005).

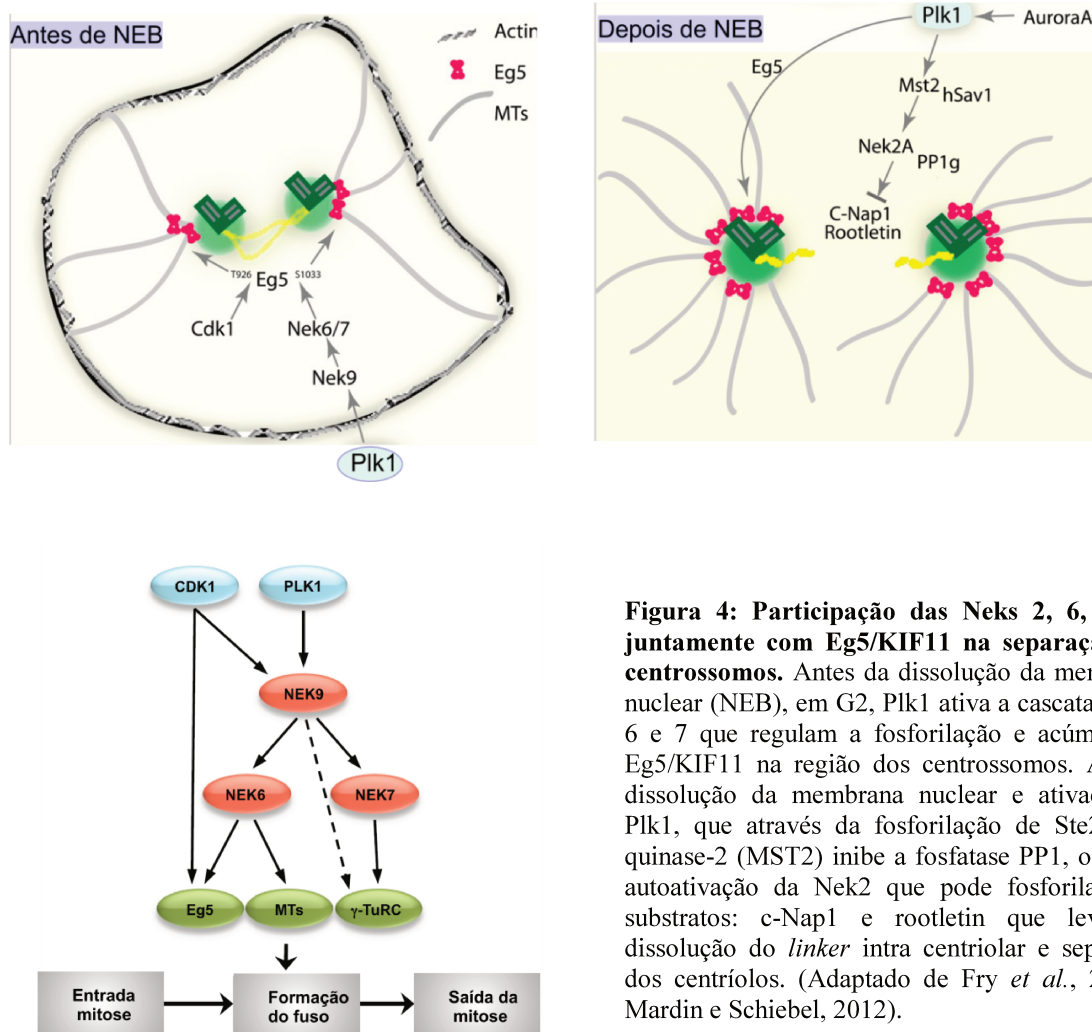


Figura 4: Participação das Neks 2, 6, 7 e 9 juntamente com Eg5/KIF11 na separação dos centrosomos. Antes da dissolução da membrana nuclear (NEB), em G2, Plk1 ativa a cascata Nek9, 6 e 7 que regulam a fosforilação e acúmulo de Eg5/KIF11 na região dos centrosomos. Após a dissolução da membrana nuclear e ativação de Plk1, que através da fosforilação de Ste20 like quinase-2 (MST2) inibe a fosfatase PP1, ocorre a autoativação da Nek2 que pode fosforilar seus substratos: c-Nap1 e rootletin que levam a dissolução do *linker* intra centriolar e separação dos centríolos. (Adaptado de Fry *et al.*, 2012 e Mardin e Schiebel, 2012).

1.2.2 Dano ao DNA

O DNA está sujeito a alterações devido aos próprios metabólitos que são gerados durante os processos celulares, a erros durante a replicação ou ainda a agentes exógenos danificadores do DNA. Essas alterações podem levar desde a simples trocas de bases até translocações cromossômicas ou mesmo aneuploidias. Normalmente essas condições são evitadas devido a quatro principais vias que a célula dispõe para controlar as alterações no DNA: vias de reparo do DNA danificado, vias de controle dos *checkpoints*, vias de resposta transcricional e ainda vias de morte celular. Estas vias podem ser independentes, mas, frequentemente estão interligadas, apresentando proteínas comuns. E, defeitos nessas vias,

principalmente relacionados à reduzida expressão ou atividade de proteínas-chave, podem levar ao aparecimento de doenças como o câncer. Existem diferentes vias de reparo, que serão ativadas conforme a fase do ciclo celular e tipo de dano.

Como a resposta ao dano ao DNA é muito complexa, pois envolve diferentes agentes indutores, que podem causar danos diferentes a ativar vias diferentes para o reparo (Figura 5), é difícil classificar/dividir esse tipo de processo biológico. Nos eucariotos, principalmente, existe uma sobreposição funcional entre as diferentes vias de reparação, de forma que vários complexos atuam ao mesmo tempo em diferentes tipos de danos (Schärer, 2003). Basicamente, existem 5 vias principais de reparo em eucariotos: MR (*mismatch repair*), reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR) e recombinação não-homóloga (NHEJ). Neste texto serão abordadas, brevemente, as três últimas vias (Figura 6).

NER: Dímeros de pirimidina causados por UV ou ainda adutos de benzipireno, aflatoxina ou cisplatina podem causar distorção da fita e, levar a extensas lesões no DNA. A via de reparo por exclusão de nucleotídeo (NER) representa o maior sistema para remover lesões extensas de DNA provocadas por radiação ou agentes químicos (Lindahl e Wood, 1999; Kamileri, Karakasilioti e Garinis, 2012). Essas lesões são corrigidas por um complexo de enzimas (considera-se que mais de 30 proteínas participam dessa via) sendo que dentre essas estão vários membros da família das proteínas XP (Xeroderma pigmentoso). Nessa via há participação da PCNA na fase final do reparo, que, juntamente com o RFC (fator de replicação C) dá suporte para a polimerase (δ ou ϵ) preencher novamente a fita após a excisão da região lesada (Kamileri, Karakasilioti e Garinis, 2012).

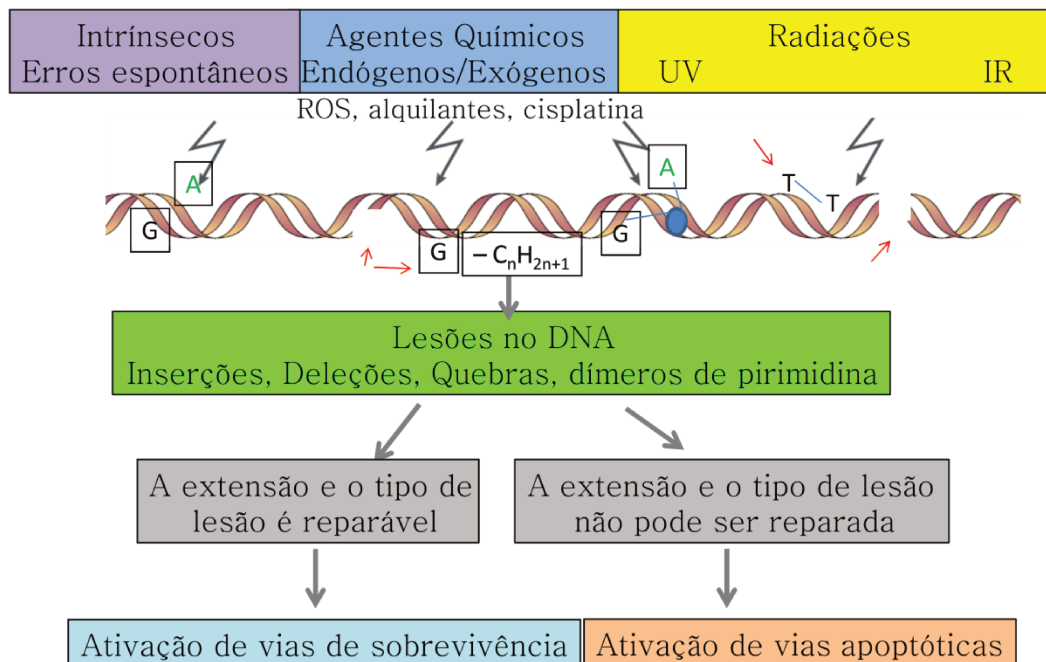


Figura 5: Panorama da indução de dano ao DNA, identificação do tipo de dano, resposta celular.

Durante o processo de replicação podem ocorrer erros – erros intrínsecos- normalmente relacionados a troca de bases e pareamento incorretos. Agentes químicos, sejam eles produzidos endogenamente, como espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pelo metabolismo ou exógenos, como alquilantes e a cisplatina, também levam a alterações no DNA. Normalmente eles reagem com o DNA modificando-o, gerando quebra da fita. Agentes alquilantes como o metil monossulfato (MMS) adicionam um radical alquil normalmente nas bases purínicas, que passam a reagir com outras bases na mesma ou na outra cadeia. Já a cisplatina que normalmente reage com as bases purínicas e forma adutos de DNA. Esses adutos promovem torção na fita e quebra ou parada na replicação. Ainda podem ocorrer danos físicos, causados por radiação UV – que forma dímeros de pirimidinas e distorção da hélice - e a radiação ionizante, raios do tipo gama, que provocam quebra de fita dupla, também por ROS. Após a detecção do dano há dois caminhos para a célula seguir que irão depender do tipo e extensão da lesão, se esta for reparável segue no ciclo. Se o dano for irreparável ocorre ativação das vias de apoptose.

HR e NHEJ: A quebra de fita dupla é a mais deletéria das lesões uma vez que não deixa uma fita complementar intacta para atuar como molde para o reparo. Se não reparada, pode levar a quebras cromossômicas, translocações que são associadas com defeitos no desenvolvimento, neurodegeneração, imunodeficiência e radiosensibilidade (Jackson e Bartek, 2009). Elas são produzidas por ROS, radiação ionizante ou agentes químicos que geram ROS e são reparadas por três vias conhecidas: recombinação homóloga (HR), recombinação não homóloga (NHEJ) e recombinação não homóloga alternativa (NHEJa). Sendo que a primeira é exclusiva das fases tardias de síntese e G2 uma vez que necessita que a replicação já tenha ocorrido. Como ela necessita homologia extensa das sequências

de DNA, o que é dado pela cromátide irmã, ela resulta em um reparo mais acurado. O que diferencia HR da NHEJ é o processo de ressecção característico e exclusivo da HR. Esse processo consiste no processamento da extremidade 5' do DNA danificado, gerando uma fita simples 3'. Essa fita simples invade a cromátide irmã em busca de uma região homóloga para a recombinação. As principais proteínas que integram essa via são: as do complexo MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1) que reconhecem a lesão e recrutam várias outras proteínas como CtIP e Exo1 (que retiram bases para formar uma fita simples longa) e RPA (que previne a formação de estruturas secundárias e recruta ATR/ATRIP). Ainda BRCA2 (ou FANCD1) que substitui RPA e facilita o carregamento de Rad51 que efetuará a invasão da outra fita (Neal e Meek, 2011). Quando o complexo ATR/ATRIP é recrutado, com o auxílio dos mediadores como o complexo MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint*), Clasping e TopBP1 (*topoisomerase binding protein 1*), podem ativar Chk1, proteína efetora para então regular fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular, maquinaria apoptótica e outros fatores de reparo.

Na via NHEJ, que em mamíferos é responsável por 85% dos reparos de danos de dupla fita induzidos por IR e apresenta atividade em todas as fases do ciclo celular, ocorre a participação de várias proteínas da via HR. Dentre as proteínas envolvidas nessa via estão as do complexo MRN que é fosforilado por ATM, BRCA1 e a Ku, proteína-chave dessa via. A Ku, uma proteína nuclear abundante, se liga às extremidades de dsDNA com alta afinidade, mas baixa especificidade e é composta por duas subunidades com aproximadamente 70 e 80kDa (XRCC6 e XRCC5, por isso Ku70 e Ku80) que formam um anel assimétrico que envolve o DNA por interagir com a cadeia, e não com as bases. A Ku se liga ao local de dano em poucos segundos e é necessária para o recrutamento da DNA-PKcs que juntamente com Ku protege a extremidade da fita da ação de nucleases e da ressecção (o que desencadeia HR). Ainda dessa via participam a Xrcc4/DNA-ligase IV e os mediadores de ATM, MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*; ou NFB1), 53BP1 (*p53 binding protein 1*) e BRCA1 que poderão ativar Chk2 e regular dessa forma o ciclo celular (revisão Ciccio e Elledge, 2010; Neal e Meek, 2011). Os fatores envolvidos na via NHEJ também são recrutados alguns segundos após o dano e persistem em até 2h (Polo e Jackson, 2011).

A ativação de ATM leva a fosforilação da histona H2Ax, importante para o recrutamento e ativação de várias proteínas no sítio da lesão e da p53, que irá regular a transcrição de vários fatores importantes para o reparo e controle do ciclo celular.

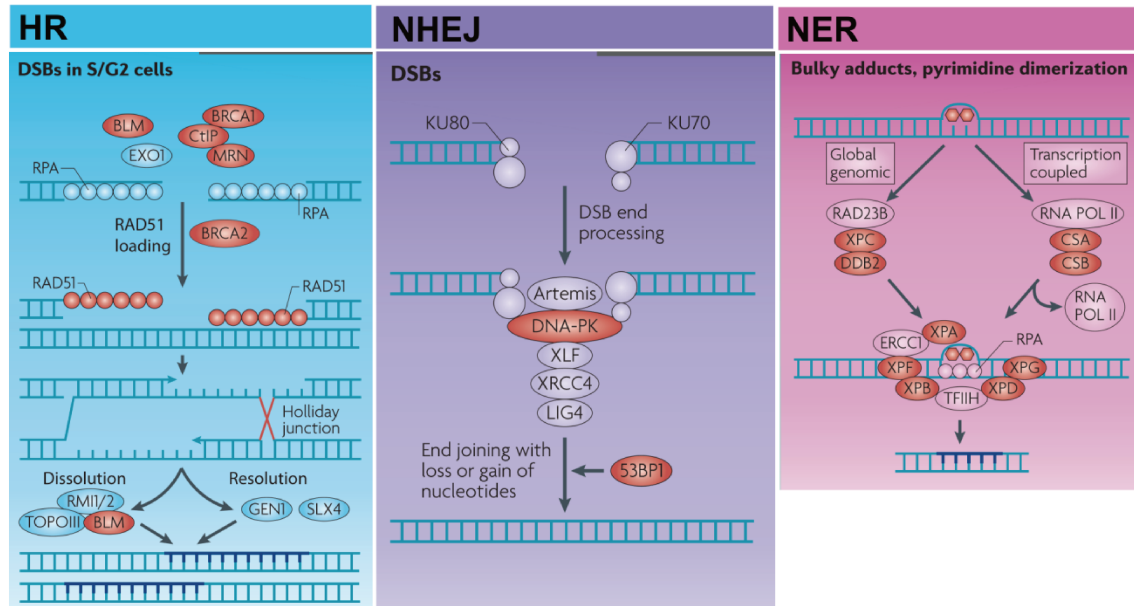


Figura 6: Vias de Reparo HR, NHEJ e NER: Danos ao DNA que levam à quebra de fita dupla ocorridos depois da duplicação do DNA (S/G2) são, principalmente reparados por recombinação homóloga (HR). Nesse tipo de reparo, o dano é reconhecido pelo complexo MRN, que recruta CtIP (CtBP -carboxi-terminal *binding protein* – *Interacting Protein*) e EXO1 que removem as bases de uma das fitas para deixar um segmento de fita simples. A essa fita liga-se RPA que previne a formação de estruturas secundárias e, recruta BRCA2 que, por sua vez, facilita a ligação de RAD51. Esta então vai invadir a cromátide irmã para efetuar a recombinação homóloga. Já quando a quebra de fita dupla ocorre antes da duplicação do DNA, obrigatoriamente será reparada por recombinação não homóloga (NHEJ). Nessa via, a quebra é reconhecida pelo complexo Ku70/Ku80. Estas proteínas ao se ligarem a cadeia de DNA interrompida protegem a mesma da ação de nucleases/ e da ressecção e recrutam a DNA-PKcs, e, posteriormente para a síntese da fita, XRCC4/LIG4 e 53BP1. Já após estímulos como UV, agentes alquilantes ou cisplatina, são formados dímeros de pirimidina, ou adutos que levam a torção da fita e parada na replicação, ativam a via de exclusão de nucleotídeos (NER). A via NER pode diferir conforme a região do DNA que irá reparar, se esse for pertencente ao genoma (GGR global genome repair) ou se a uma região transcricionalmente ativa (TCR- *transcription-couple repair*). A divergência se dá no reconhecimento da lesão, sendo que após esse a via apresenta as mesmas proteínas. De forma sucinta, após o reconhecimento (que pode envolver XPC e XPE para GGR ou a parada na replicação da polimerase II) o fator de transcrição TFIIH se liga ao local, juntamente com RPA e XPA, então, XPC é substituída por XPG que promove maior estabilidade, então XPF/XRCC1 e mediará duas incisões na fita, uma na sexta ligação fosfodiéster 3', efetuada por XPG e outra na vigésima fosfodiéster da 5' efetuada por XPF/XRCC1. O oligômero resultante é então liberado e o *gap* é preenchido por polimerase E com o suporte da RFC e PCNA. Após o preenchimento a DNA ligase I ceta a fita (para revisão Sancar *et al.*, 2004 e Pascucci *et al.*, 2011).

Células deficientes na via NHEJ ainda são capazes de unir as fitas duplas, porque utilizam a via alternativa (aNHEJ), contudo, frequentemente elas apresentam deleções. Na via alternativa, o sensor é PARP1, que compete com Ku na ligação ao DNA (Ciccia e

Elledge, 2010). Ocorre o recrutamento do complexo MRN e CtIP para o processamento e por fim a XRCC1/LigIII para a ligação das fitas (Neal e Meek, 2011).

A escolha entre as vias de reparo de fita dupla parece estar relacionada à disponibilidade das proteínas envolvidas, sendo que DNA-PKcs é muito abundante, NHEJ é a via de escolha. Ainda, quando se considera o tempo para reparo, observa-se que em células em cultura, o reparo é bifásico, com uma fase rápida, com meia vida de 10-20 min, dependendo do número de lesões, e uma fase lenta que leva de 60-90 min. Há relatos de que o reparo por NHEJ pode ser completado em 30 min, e Ku já é observada no foco do dano em poucos minutos, o reparo por HR pode levar até 7h e Rad 51 não aparece em até 2h após o dano. Células deficientes na via NHEJ são mais sensíveis a IR, indicando que sinais de morte são ativados se o reparo não se iniciar em alguns minutos após o dano ocorrer (Neal e Meek, 2011).

1.2.2.1 DDR, ciclo celular e apoptose

Os pontos de checagem que ocorrem durante o ciclo celular são uma ferramenta para permitir que caso exista algum tipo de dano que comprometa a integridade do genoma sejam realizadas as correções antes de progredir no ciclo e ocorrer a divisão celular. A relação entre DNA danificado e regulação do ciclo se dá, especialmente, via ativação de ATM/ATR, seus mediadores, e efetores Chk2/Chk1. Quando ocorre dano de fita dupla, o principal sensor é ATM que ativará Chk2, já ATR é ativada principalmente em caso de quebra de fita simples. Estas proteínas podem parar o ciclo celular transitoriamente em G1, S ou G2 ou de forma prolongada em G1 e G2, através do aumento da expressão e atividade de p53, inibição de síntese de proteínas essenciais, inibição do complexo ciclina/CDK e, em última instância, síntese de fatores pró-apoptóticos. Basicamente, as vias ativadas levarão a parada no ciclo por fosforilação de fosfatases, como a CDC25A, e sua consequente degradação. Essas fosfatases são responsáveis pela ativação do complexo ciclina/CDK, que é o sinal para a progressão no ciclo celular. Chk1 e 2, além de fosforilarem a fosfatase, fosforilam MDM2, uma ubiquitina ligase que mantém os níveis (*turnover*) de p53. Como resultados, são garantidos altos níveis de p53 e sua atividade. p53 estimula a transcrição de um inibidor de CDK, levando a parada do ciclo por várias horas. Na fase S, que é a fase onde ocorre a síntese do DNA, a inibição da CDK2 inibe a translocação da CDC45 para a

cromatina. A CDC45 é importante para o recrutamento da polimerase alfa para os sítios de replicação. Em G2/M O alvo nesse *checkpoint* é a ciclina B/CDK1, cuja ativação após o dano é inibida por ATM/ATR, Chk1/Chk2 ou pela degradação ou sequestro (para outras partes da célula) de membros da família CDC25 pela p38. Ainda, PLK pode levar à degradação de CDC25C (Kastan e Bartek, 2004).

Em mamíferos o ciclo celular tem EF2 e Rb como principais proteínas que controlam a transcrição de proteínas essenciais para a síntese de DNA na fase S. Na ausência de fosforilação, Rb está complexada com E-2F, inibindo assim sua atividade. É o complexo ciclina E-CDK2 que fosforila Rb. Quando ocorre dano, ATM ou ATR fosforilam p53, que leva a síntese de p21 que por sua vez, inibe a atividade da ciclina E-CDK2, sendo que a Rb não se dissocia de E-2F e o ciclo celular para em G1 (Stracker, Usui e Petrini, 2009).

1.2.2.2 DDR e Neks

Em 2003 foram publicados resultados obtidos pelo nosso grupo que já indicavam para a relação da Nek1 com a resposta ao dano ao DNA. Surpili, Delben e Kobarg (2003), utilizando o sistema de duplo-híbrido em levedura, identificaram como parceiros de interação da Nek1 as proteínas Mre11, 53BP1, 14-3-3 e ATRX. Posteriormente, uma série de trabalhos vem demonstrando a relação da Nek1 com a resposta ao dano de DNA por vários estímulos, como radiação ionizante, UV, etoposídeo, peróxido de hidrogênio, entre outros. Em 2011 Chen e colaboradores observaram que após radiação ionizante a Nek1 apresenta localização nuclear, juntamente com γ H2AX e MDC1/NFBD1. Ainda, uma hora após a radiação ionizante é observado um aumento na atividade de quinase da Nek1 (Polci *et al.*, 2004). Logo, a localização nuclear da Nek1 após o dano, parece ser tempo e dano dependente. Por exemplo, em células nas quais a expressão de Nek1 foi suprimida, após tratamento com cisplatina, observa-se uma redução nos focos de DSBs nos tempos iniciais, sugerindo que a Nek1 é essencial para a formação destes. A atuação de Nek1 também parece variar conforme o tipo de dano, sendo que após radiação ionizante, a Nek1 é essencial para fosforilação de Chk1 e não da H2AX, já no caso de dano induzido por cisplatina a Nek1 é importante para a fosforilação de H2AX (Pelegrini *et al.*, 2010). Pelegrini e colaboradores também avaliaram a participação da Nek1 em resposta ao dano

por peróxido de hidrogênio e, observaram que no caso da supressão da expressão dessa proteína as células perdem o ponto de checagem em G2.

Mais recentemente, Liu e colaboradores (2012), utilizando UV como fonte de radiação, demonstraram que a interação da Nek1 com o complexo ATR-ATRIP e a fosforilação de ATR por Nek1 são importantes para a ativação de Chk1. Ainda, eles demonstraram que a interação e ativação desse complexo por Nek1 ocorre independentemente de dano ao DNA e sugerem que essa interação prévia poderia ser importante para a resposta rápida ao dano. Nesse caso, Nek1 promoveria a autofosforilação de ATR e então sua ativação.

Em 2009 a participação de outra Nek com o reparo foi relatada no trabalho de Melixetian. Nesse estudo foram silenciadas várias proteínas com o objetivo de observar alterações no ciclo celular após radiação ionizante e, portanto, proteínas importantes para a checagem após dano ao DNA. Eles então observaram que células U2OS com redução na expressão da Nek11 progridem no ciclo celular G2/M após radiação ionizante. Após a radiação a Nek11 seria fosforilada por Chk1 (S273), que também fosforila a fosfatase CDC25A. Após a fosforilação de alguns resíduos de CDC25A por Chk1, Nek11 também é capaz de fosforilar esta, o que desencadeia a sinalização para degradação proteassomal de CDC25A e consequente inibição das ciclinas e parada no ciclo em G2/M.

Já a redução na expressão de Nek8 leva a danos espontâneos de DNA e já foi demonstrada a interação com componentes da via de ATR. Os animais *jck* com mutação para Nek8 não interagem com as proteínas dessa via e apresentam instabilidade genômica (Choi *et al.*, 2013).

Células superexpressando a Nek6 não param a divisão celular após dano ao DNA induzido por radiação ionizante, sugerindo que Nek6 deve ser inibida no ponto de checagem G2/M após dano ao DNA (Lee *et al.*, 2008).

Por fim, para a Nek4, um apontamento para participação no processo de reparo ao DNA danificado surgiu quando no trabalho de Nguyen e colaboradores (2012), que tinha como objetivo identificar proteínas envolvidas com a entrada em senescência replicativa, foi encontrada a Nek4. Nesse estudo foi observado que células nas quais a Nek4 era suprimida, ocorria um aumento na taxa de proliferação devido a uma redução na transcrição de p21, através da inibição do promotor. Esse resultado era exclusivo para o silenciamento,

não sendo observado na superexpressão. Ainda, células sem Nek4 apresentavam uma sensibilidade menor ao etoposídeo, IR e bleomicina, um radiomimético, e continuavam a proliferar. A indicação de que Nek4 estava associada com a via de reparo se deu pela identificação da interação da Nek4 com as proteínas Ku70, Ku80 e ainda com a DNA-PKcs, sendo que redução na expressão da Nek4 interfere negativamente no recrutamento da DNA-PKcs para o local do dano. Esse efeito é explicado pela observação na redução nos níveis de H2AX fosforilada em células sem a Nek4 após tratamento com etoposídeo. Por fim, ainda foi observado que a ativação da p53, via fosforilação na serina 15, foi reduzida em células silenciadas para Nek4. E, isso é independente da ativação de ATM que não é alterada na ausência de Nek4 (Nguyen *et al.*, 2012).

1.2.3 Função ciliar

Os cílios são protusões da superfície celular basicamente formados por microtúbulos que desempenham papel relevante em diversas funções, principalmente as relacionadas à percepção sensorial, química e mecânica, que sinalizam para diferenciação ou divisão celular. A presença marcante dos cílios se dá em células sensoriais, onde então participam da percepção visual, olfativa e de equilíbrio. Ainda estão presentes em tecidos com a finalidade de proteção, a fim de evitar a entrada ou promover a saída de agentes nocivos. Assim, tem-se diversas patologias relacionadas à motilidade ciliar, como infecções respiratórias, anosmia, infertilidade masculina, degeneração retinal, cistos renais e hidrocefalia (para revisão Bisgrove e Yost, 2006; Plotnikova, Pugacheva e Golemis, 2009; Boldt *et al.*, 2009).

Os cílios podem apresentar uma variedade de formas polarizadas e longitudinais, mas a estrutura básica ciliar é altamente conservada e consiste em um axonema (feixes de microtúbulos) ancorado no corpo basal que conectará a base e a ponta do cílio. A disposição dos microtúbulos no axonema, diferencia cílios móveis de cílios imóveis, sendo que os primeiros apresentam a configuração 9 dupletos + 2 centrais e os segundos não apresentam os centrais, ou seja, apresentam configuração 9+0 (Figura 7).

A maioria das células desenvolve um único cílio primário imóvel que estará envolvido com a recepção de sinais extracelulares e então vias de sinalização intracelulares como as vias Hedgehog, Wnt, de polaridade celular planar, FGF (*Fibroblast growth*

factors), Notch, mTor, PDGF (*platelet-derived growth factor*) e Hippo. As células que apresentam cílios móveis em geral possuem de 200-300 cílios envolvidos com o movimento dos fluídos extracelulares. Para estes movimentos são necessários braços de dineína motora e a interação dessa com uma série de outras proteínas (para revisão Plotnikova, Pugacheva e Golemis, 2009).

O corpo basal do cílio origina-se a partir do centríolo-mãe, que será duplicado para a divisão celular, e então corresponde ao centro organizador de microtúbulos (MTCO) necessário para a mitose. Logo, em vertebrados a oscilação entre corpo basal e MTCO ocorre nos diferentes estágios do ciclo celular, sendo que a formação dos cílios e, portanto a presença do corpo basal será observada em G1 e G0 e a reabsorção do cílio, e então a presença do MTCO ocorre em S ou na transição G2/M (para revisão Plotnikova, Pugacheva e Golemis, 2009).

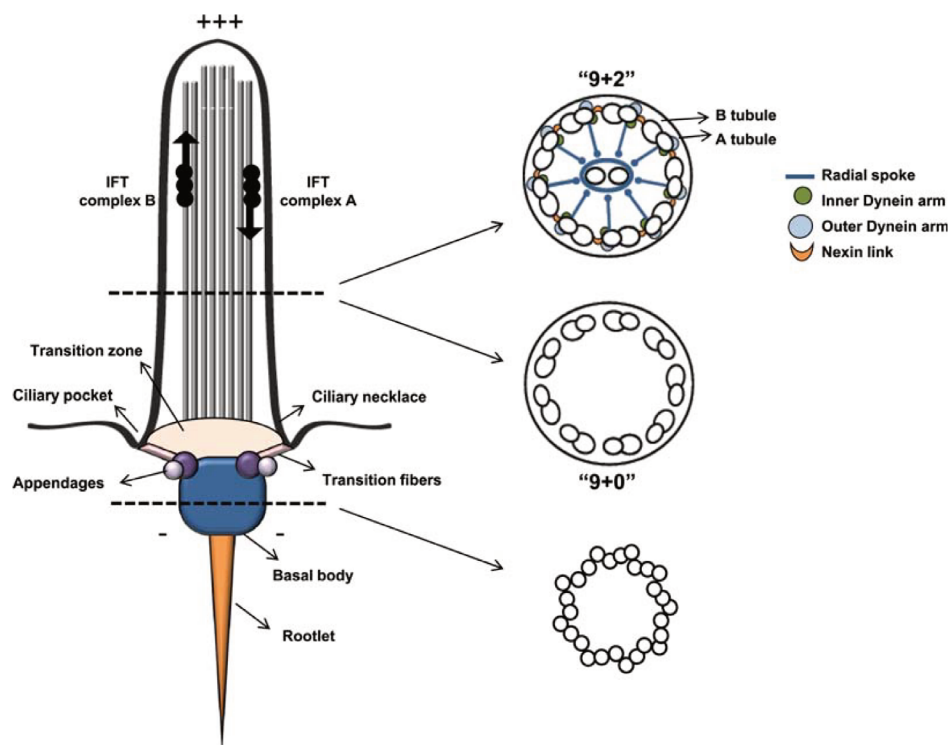


Figura 7: Estrutura do cílio (Reeuwijk, Arts e Roepman, 2011). Configuração geral do cílio móvel baseia-se na disposição de 9 pares de microtúbulos periféricos e um par central quando deixa a base. O cílio imóvel não apresenta o par central ("9+0"). O cílio se origina a partir do corpo basal (originado a partir do centríolo mãe) e se estende pelo axonema. Essa estrutura é mantida através do transporte intraflagelar que leva proteínas da base para a ponta do cílio e vice-versa.

A estabilidade do cílio é garantida pela raiz ciliar, enquanto que as fibras de transição, que conectam o corpo basal à membrana plasmática, constituem uma barreira para proteínas. As proteínas são dirigidas para o cílio através de vesículas originadas do Golgi no bolso ciliar (Figura 7). O transporte na zona de transição ocorre através do transporte intraflagelar (IFT), que é bidirecional e requer a atividade da kinesina II e motores de dineína além dos complexos IFTA e IFTB. Para o processo de formação ou reabsorção ciliar são envolvidas diversas proteínas que participam da sinalização/transporte intraflagelar e, alterações nessas vias, que levam a defeitos na ciliogênese, são relacionadas a várias patologias, como mencionado acima, e, mais recentemente, também com a tumorigênese (Wong *et al.*, 2009; Egeberg *et al.*, 2012).

No trabalho de White e Quarmby (2008), a superexpressão da Nek1 de camundongo (mNek1) em células epiteliais renais inibe a ciliogênese e células contendo a Nek1 mutante (sem o seu domínio regulatório) superexpressa, apresentam a desmontagem dos centrossomos, indicando relevante papel dessa proteína na formação ciliar. Esse papel da Nek1 murina é muito interessante, e, curiosamente, no trabalho de Mahjoub, Trapp e Quarmby (2005) foi demonstrado que esta localiza-se exclusivamente no centrossomo durante a intérfase e mitose em vários tipos celulares, enquanto, a mNek8 localiza-se na região proximal do cílio primário nessas mesmas condições. Eles também observaram que quando a expressão da Nek8 de camundongo é suprimida a formação do cílio primário não é comprometida, sugerindo então que a importância da Nek8 está relacionada à sinalização ciliar especificamente renal e não à ciliogênese em si, uma vez que a mutação de um único aminoácido nessa proteína leva ao comprometimento apenas dos rins, não afetando outros órgãos (Mahjoub, Trapp e Quarmby, 2005). Esses resultados apontam para um papel combinado dessas duas proteínas da família Nek na desmontagem/ reabsorção ciliar, sendo que uma atua na região do centrossomo e a outra na sinalização intraflagelar (Figura 8).

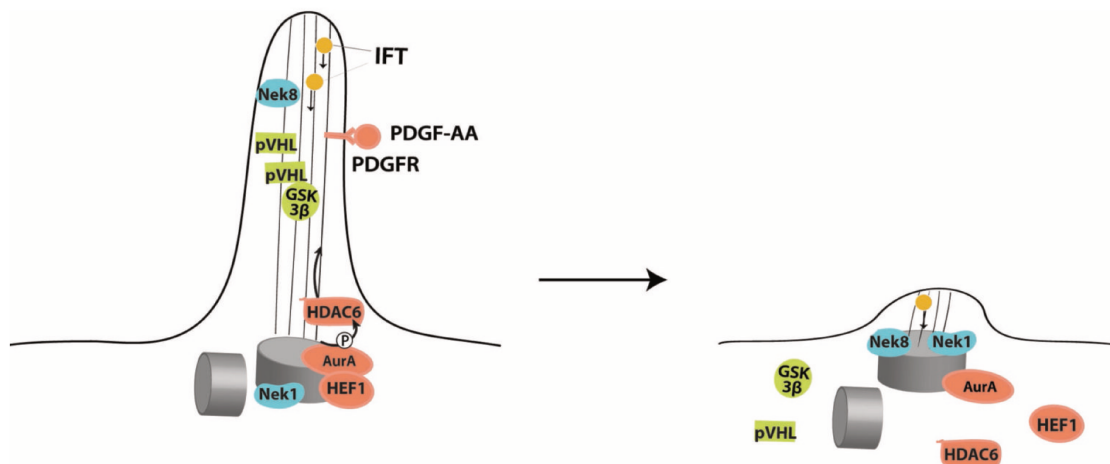


Figura 8: Montagem e desmontagem dos cílios e proteínas associadas: Nek1 e Nek8, atuando no corpo basal e axonema do cílio durante a desmontagem do mesmo (Plotnikova, Pugacheva e Golemis, 2009).

Alguns estudos indicaram o envolvimento direto de mNek1 na etiologia da PKD (doença policística renal) progressiva, uma vez que camundongos mutantes em Nek1 desenvolvem esta doença (Upadhyaya *et al.*, 2000). Mutações na mNek8 também demonstraram causar a formação de cistos renais em modelo murino da doença renal policística juvenil recessiva, *jck* (*juvenile cystic kidney*). A expressão *in vitro* da Nek8 mutante resultou em células aumentadas, multinucleadas e com um citoesqueleto de actina anormal (Liu *et al.*, 2002). Recentemente, também foi relacionado a presença de mutações no gene da NEK1 com a síndrome de costelas curtas-polidactilia do tipo Majewski (SRPS), uma ciliopatia de origem autossômica familiar recessiva (Thiel *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

Coene e colaboradores (2011) realizaram um estudo proteômico a fim de identificar parceiros de interação das proteínas RPGRIP1 e RPGRIP1L, proteínas que interagem com RPGR e envolvidas em retinite pigmentosa, e, identificaram a Nek4. Nesse trabalho foi apresentada a localização da Nek4 na raiz ciliar, indicando que, como a Nek2, esta poderia regular a estabilidade do cílio, embora, diferente da Nek2, a atividade ou expressão da Nek4 não seja essencial para a separação dos centrosomos (Fry *et al.*, 1998). Ainda, RPGRIP1 e RPGRIP1L não são substratos da Nek4, e por isso, eles propõem que estes poderiam atuar como *scaffolds* para uma rede de proteínas, incluindo a Nek4, que

promoveria a estabilidade do cílio sensorial na retina (nos segmentos externos dos fotorreceptores).

Considerando-se o trabalho de Doles e Hemann (2010), que mostra que após o tratamento com taxol a Nek4 promove a polimerização dos microtúbulos e na sua ausência ocorre redução da formação dos ásteres mitóticos, uma possibilidade seria a de que a atuação da Nek4 na função ciliar esteja relacionada diretamente com a polimerização dos microtúbulos e daí formação/estabilização do cílio primário, e não na sinalização intraflagelar.

Nosso grupo, através dos resultados obtidos nos experimentos de interactoma com a Nek1 (Surpili, Delben e Kobarg, 2003), apontou inicialmente para o envolvimento da família hNek em funções além da regulação do ciclo celular, como o reparo ao DNA danificado. Com o passar dos anos, novas e diversas funções para essa família de proteínas foram identificadas por diferentes grupos, incluindo o nosso (Meirelles *et al.*, 2014 *in press*, anexo 8.6.2). A conservação das funções relacionadas ao ciclo celular (principalmente para as Neks 2, 6 e 7) apresentada para NIMA e aquisição de novas funções diferentes das apresentadas pelo ortólogo, justifica a existência de várias Neks em mamíferos, mas, também desperta curiosidades em relação às formas de regulação e parceiros de interação das Neks.

As funções biológicas da Nek4 ainda não são bem determinadas, inclusive seus substratos ou ativadores também não foram identificados até o momento. Alguns estudos já excluíram a importância desta Nek para o controle do ciclo celular, apontando para seu papel em funções diferentes das exercidas por NIMA. Outros estudos demonstraram que, por sua vez, a Nek4 compartilha funções como regulação da estabilidade de microtúbulos, formação / manutenção do cílio primário e até mesmo resposta ao DNA danificado, com outros membros da família hNeks. Assim, a identificação dos parceiros de interação da Nek4 permitiria melhor caracterizar suas funções biológicas, bem como indicar possíveis substratos, ativadores, inibidores e, conseqüentemente as diferenças entre essa Nek e outros membros dessa família, que também estão sob estudo em nosso grupo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo inicial deste trabalho foi caracterizar funcionalmente a proteína serina/treonina quinase humana Nek4.

2.2 Objetivos específicos

- Amplificação da sequência codificadora para a hNek4;
- Caracterização da localização endógena da hNek4;
- Identificação dos parceiros de interação da hNek4;
- Contextualização biológica/funcional da hNek4.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Amplificação do DNA codificante para a proteína Nek4

Para as amplificações das sequências de cDNA codificante foram utilizadas as bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech 638804), medula óssea (B&D 638823), leucócito (Clontech HL4050AH) e Hela (Clontech HL4048AH), ou ainda, cDNA obtido a partir do RNAm extraído de células HEK293T. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na sequência codificante (CDS completo) do gene da proteína Nek4 considerando-se a sequência canônica, ou maior isoforma apresentada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e são apresentados na tabela 1. Para a determinação da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, com inclusão de sítios de reconhecimento para enzimas de restrição, a sequência foi primeiramente analisada pelo programa *WebCutter2.0* (Max Heiman, 1997 <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) para verificar os sítios que não estavam presentes no interior do fragmento e dessa forma garantir que a sequência não seria cortada ao meio. As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram preparadas utilizando-se de 60 – 300 ng de biblioteca como DNA molde, 2,5 µL do tampão 10X da enzima, 0.2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0.3 mM de dNTP, até 3 mM de sulfato de magnésio, 2,5 unidades de *High Fidelity Taq Platinum®* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para volume final de 25 µL. Estas reações foram amplificadas nas condições descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores

Nome	Sequência	Enzimas rest.	Origem
Nek4S3	5'-CCGCTCGAGATGCCCTGGCCGCC-3'	<i>XhoI</i>	Invitrogen
Nek4S2	5'-AAGCTTCCCATATGCCCTGGCCGCCTAC-3'	<i>NdeI</i>	IDT
Nek4AS	5'-ACGCGTCTGACTCAAAAATTCATGTTTCTTCAAAA-3'	<i>SalI</i>	Invitrogen
Nek4AS2	5'-ACGCGTCTGACTCAAAAATTCATGTTTCTTCAAAA-3'	<i>SalI</i>	IDT
Nek4ASKD	5'-ACGCGTCTGACTCATATATAAGGCTGCCTCAGGAT-3'	<i>SalI</i>	IDT
Nek4SI1	5'-CTATGAAATGGCCACCTTGA-3'	-	IDT
Nek4SI2	5'-TGCAGTATTCTCAAGTGGA-3'	-	IDT
T7S	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	-	Invitrogen
T7AS	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	-	Invitrogen
SP6AS	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	-	Invitrogen
CMV	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'		Invitrogen
BGH	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'		IDT

S – sense; AS – anti-sense ou reverso; I – oligonucleotídeo interno; KD – domínio quinase

Tabela 2. Condições da PCR

	Tdes inicial(°C)/ tempo(min) / n°Ciclos	Tdes(°C)/ tempo(min)/ n°Ciclos	Tan1(°C)/ Tempo(min)/ n°Ciclos	Text(°C)/ Tempo(min) /n°Ciclos	Tan2(°C)/ tempo(min)/ n°Ciclos	Texfinal)/ tempo(min)/ n°Ciclos
Nek4S3	95/3/1	95/0.5/27	62/1/4	72/3/27	64/1/23	72/10/1
Nek4S2/ Nek4KDAS	95/5/1	95/0.5/27	57/1/4	72/1/27	62/1/23	72/10/1

Tdes: temperatura de desnaturação; Tan: temperatura de anelamento; Tex: temperatura de extensão.

3.2 Clonagem

Para inserção das sequências de interesse nos vetores, tanto a sequência, então clonada em pGEM-T ou pGEM-T Easy, como os vetores, foram clivados com as enzimas apropriadas (Tabela 3) e respectivos tampões por 4 h, a 37°C, conforme recomendações do fabricante, no caso, Fermentas ou Invitrogen. Para Nek4 foi utilizado um sítio de restrição presente na sequência do pGEM-T, devido à ausência de sítios compatíveis. Após a digestão foi realizada a inativação da enzima, o produto da reação foi aplicado em gel de agarose para separação dos fragmentos.

O vetor pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) foi modificado para inserção da sequência codificadora para Flag, logo, o vetor utilizado foi pcDNA5FRT/TO-FLAG.

Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas para clonagem em diferentes vetores

Vetor – Inseto	Enzimas de restrição
pET-28a-TEV – Nek4KD	<i>NdeI/SalI</i>
pBTM116KQ – Nek4	<i>XhoI/NotI</i>
pcDNA5/FRT/TO-FLAG	<i>BamHI/NotI</i>

3.3 Análises *in silico* da hNek4

3.3.1 Análise de localização celular

Foram utilizados três preditores disponíveis para localização celular: o BaCelLo (*Balanced Subcellular Localization Predictor*) (Pierleoni *et al.*, 2006; <http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>), discrimina entre cinco possíveis localizações celulares: secretada, citosólica, mitocondrial, nuclear ou no cloroplasto, no caso de plantas.

Ele utiliza a informação dos resíduos de aminoácidos e considera o perfil evolutivo; o iPSORT (Bannai *et al.*, 2002; <http://ipsort.hgc.jp/>) identifica a presença de um peptídeo sinal para mitocôndria na região N-terminal; o Mitoprot (Claros e Vincens, 1996; <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) que também busca no N-terminal uma sequência alvo para clivagem; o TargetP (Nielsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2000; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) busca no N-terminal sequência sinal para cloroplasto, mitocôndria ou secreção. Para identificação da localização nuclear foram utilizados 3 preditores: NucPloc (Shen e Chou *et al.*, 2007; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Nuc-PLoc/>), NLS mapper (Kosugi *et al.*, 2009; http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) e Nuc-Pred (Brameier, Krings e MacCallum, 2007; <https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>).

Para delinear o perfil de expressão das proteínas em diferentes tecidos, além dos dados experimentais disponíveis na literatura, foi utilizado o atlas de proteínas humanas - *The Human Protein Atlas* (Berglund *et al.*, 2008; <http://www.proteinatlas.org/>) um banco de dados organizado pela fundação da Suécia Knut & Alice Wallenberg com dados de proteômica baseados em anticorpos, acompanhado por resultados de imunofluorescência, imunohistoquímica e *western blotting* para caracterizar a expressão de diferentes proteínas bem como sua sublocalização celular em tecidos normais e tumorais.

3.3.2 Análise da estrutura primária

As características físico-químicas foram determinadas utilizando-se o *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://www.proteinatlas.org/>). Para informação sobre estrutura secundária foi utilizado o programa PSIPRED (Bryson *et al.*, 2005; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

A predição de regiões desenoveladas (*unfolded*) foi realizada através do algoritmo FoldIndex© (Prilusky *et al.*, 2005; <http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>) que estima a probabilidade local e global de uma proteína se enovelar de acordo com os padrões de hidrofobicidade e carga da sua sequência primária.

Por fim, para predição dos domínios utilizou-se o programa SMART (Schultz, *et al.*, 1998; <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

3.3.3 Modificações pós-traducionais

Para busca de modificações pós-traducionais foram utilizados preditores para SUMOilação (GPS SUMO -Ren *et al.*, 2009; <http://sumosp.biocuckoo.org/> e SUMOPlot (<http://www.abgent.com/sumoplot>) e fosforilação. Para fosforilação foram utilizados NetPhosK (Blom *et al.*, 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>); o banco de dados/preditor PHOSIDA (Gnad *et al.*, 2007; <http://www.phosida.de/>); PHOSPHOSITE (Hornbeck *et al.*, 2004; <http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) e SCANSITE (Obenauer, Cantley e Yaffe, 2003; <http://scansite.mit.edu/>).

3.4 Cultivo de células

Foram utilizadas as células HEK293T, linhagem de célula derivada de células renais embrionárias humanas, HeLa e RPE-hTERT (células do epitélio pigmentoso da retina). Ainda foi utilizada a linhagem de células HEK293 FlpIn-T-Rex. Estas células foram originadas a partir de células HEK293 transfectadas com os vetores pFRT*/*lacZeo* e o pcDNA6/TR, inserindo assim sítios de recombinação para integração do DNA recombinante no DNA genômico da célula. Estas células foram utilizadas para o estabelecimento das linhagens estáveis (item 3.5)

As células foram cultivadas em meio MEM (*Eagle's minimum essential médium*) ou DMEM-F12 com 10% de soro fetal bovino e estreptomicina (100 µg/mL)/penicilina (100 U/mL), em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi trocado em média três vezes por semana.

A viabilidade e densidade celular foram obtidas através do método de azul de trypan, que se baseia no fato de células vivas não incorporarem o corante (Freshney, 1994) e a contagem utilizando o contador Countess[®].

Para as transfecções, as células foram semeadas numa densidade de 7×10^5 células/poço em placa de 6 poços e mantidas em cultura até atingirem confluência de 60-80% (aproximadamente 48 h). O meio de cultura foi então substituído por meio sem soro 1 h antes da transfecção. Durante a incubação com o meio novo foi preparado o DNA a ser transfectado e o agente carreador (Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou PEI (Sigma Aldrich)). O DNA a ser transfectado e o agente carreador foram preparados separadamente em meio de cultura ou solução de NaCl (no caso da transfecção com PEI), e após agitação

gentil foram incubados 30 min a temperatura ambiente. Passado esse período as duas soluções (DNA/meio ou NaCl e agente carreador/meio) foram combinadas e a solução resultante incubada por mais 30 min. Após esse período todo o volume foi colocado nas garrafas de transfecção, ficando em contato com as células por um período de 4 a 6 horas, no caso da transfecção com lipofectamine ou 24 h no caso da transfecção com PEI. Terminado o processo, o meio foi trocado por novo meio contendo soro. Para a co-transfecção da recombinase (codificada pelo vetor pGO44) e do DNA de interesse foi usada a proporção de 9:1. O PEI é um polímero catiônico que se associa com os ácidos nucleicos do DNA negativamente carregados. O excesso de carga positiva no complexo DNA/PEI garante a aproximação do complexo à membrana celular e, a entrada do complexo na célula ocorre, provavelmente, por endocitose (Godbey, Wu e Mikos, 1999).

3.5 Expressão estável e induzível das Isoformas da Nek4 em linhagens celulares humanas

Para gerar as linhagens celulares que exibem uma expressão estável, induzida por tetraciclina, das isoformas de Nek4, foi utilizado o sistema Flp-In T-REx (*Invitrogen Life Technologies*). O Flp-In usa um sistema de recombinação sítio-específico. A linhagem celular hospedeira escolhida foi a HEK293 (essas células foram previamente transfectadas com o vetor pFRT*/*lacZeo* - que contém o sítio alvo para recombinação e carrega o gene para resistência a zeocina, permitindo então a seleção das linhagens transfectadas- e com o vetor pcDNA6/TR, que constitutivamente expressa o repressor Tet). Então, as células foram co- transfectadas com PEI (*polyethyleneimine*) ou lipofectamine[®] para inserção do vetor contendo o DNA codificante para as isoformas da Nek4 (pcDNA5/FRT/TO-Nek4.1 FLAG ou pcDNA5/FRT/TO-Nek4.2 FLAG) ou o vetor vazio (pcDNA5/FRT/TO-FLAG) e também da recombinase (vetor pOG44). O pcDNA5/FRT/TO-FLAG contém a sequência de interesse sob o controle do promotor regulado por tetraciclina e provê resistência a higromicina B, além do sítio FRT que permitirá a recombinação. Dessa forma, a recombinase expressa, a partir do vetor pOG44, medeia a recombinação homóloga entre os sítios do pcDNA5/FRT/TO-FLAG e o FRT integrado já ao genoma da célula hospedeira. Após a recombinação ocorre a inserção do cassete com o gene de resistência a higromicina, o gene que codifica a proteína de interesse e o repressor Tet e as células tornam-se

resistentes a higromicina e sensíveis à zeocina. Nessa condição, a expressão da proteína não ocorre devido ao repressor Tet. O promotor (CMV) da proteína de interesse no pcDNA5/FRT/TO contém duas cópias *em tandem* do operador Tet2 (TetO2) aos quais ligam-se duas moléculas de repressor. Na ausência de tetraciclina o repressor Tet (que já está expresso na célula hospedeira) forma homodímeros que se ligam com alta afinidade aos operadores. Quando a tetraciclina é adicionada, esta se liga ao repressor causando alteração na sua conformação e consequente desligamento do operador, deixando livre a expressão da proteína. (Esquema apresentado na figura 9).

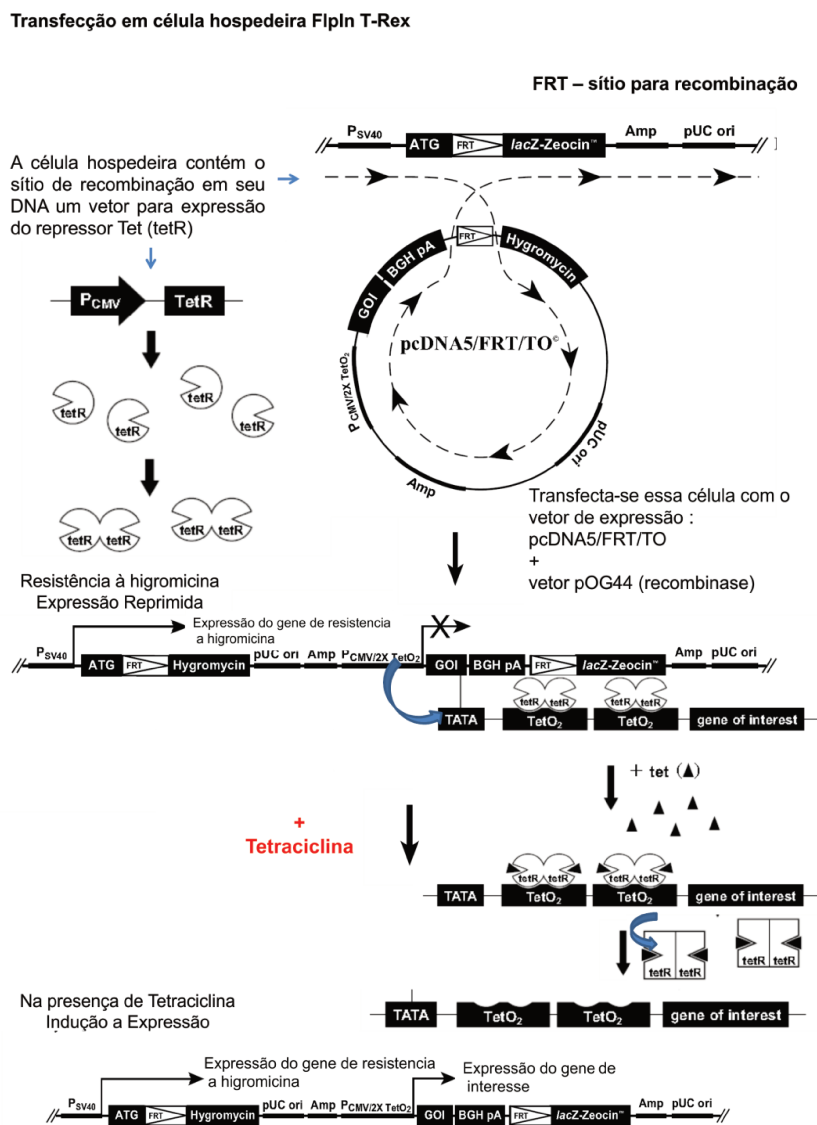


Figura 9: Esquema da transfecção, recombinação e indução da expressão nas células FlpIn. Adaptado do manual do fabricante. FlpIn -T-REX – Invitrogen Life Technologies

3.6 Imunoprecipitação

Para o ensaio de imunoprecipitação (IP) seguido de identificação por espectrometria de massas (MS) das isoformas da Nek4 e das proteínas que com elas interagem foram utilizadas garrafas com 80 - 90% de confluência de HEK293/Flp-In (75 cm^2 para os testes iniciais e 175 cm^2 para o ensaio de interação) após 48h de indução com tetraciclina (500 ng/mL). As células foram coletadas com PBS e centrifugadas $450 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente. A lise foi realizada com tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA e 1% Triton X-100) contendo aprotinina (10 $\mu\text{g/mL}$), PMSF (1 mM), glicerofosfato (10 mM), ortovanadato de sódio (2 mM) e NaF (1 mM). Para o ensaio de interação foram utilizadas 5 garrafas grandes (175 cm^2) por condição (Nek4.1; Nek4.2; e vetor vazio – Flag vazio). Para cada condição foi utilizado 10 mL de tampão de lise para ressuspender o *pellet* e a suspensão foi incubada em gelo por 30 min, com agitação ocasional. Após a incubação o lisado foi centrifugado a $12000 \times g$ por 15 min a 4°C . A concentração de proteínas totais no sobrenadante foi então determinada pelo método Bradford e, quantidades iguais de proteínas totais presentes no sobrenadante foram adicionadas à resina preparada (item abaixo) e foram incubadas a 4°C com agitação moderada por 16 – 20 h.

Para IP foi utilizada a resina agarose-*beads* conjugada com anticorpo anti-Flag (M2) (Sigma-Aldrich). Previamente à incubação a resina foi lavada 3 x com TBS gelado (20 x o volume da resina empacotada) e centrifugada $8000 \times g$ por 1 min a 4°C . Para cada condição foi utilizado 150 μL de resina, logo lavou-se com 3 mL de TBS.

Após a incubação com a resina, foram realizadas 3 lavagens com TBS e então realizou-se a eluição das proteínas fusionadas ao Flag com o peptídeo 3 x Flag® (Sigma-Aldrich) na concentração final de 150 ng/ μL , em um volume final de 300 μL de TBS. Incubou-se por 2 h a 4°C sob agitação moderada e então seguiu-se a centrifugação com coleta do sobrenadante. Parte do sobrenadante foi utilizada para corrida em gel SDS-PAGE com posterior coloração com nitrato de prata e/ou *western blotting* e parte foi utilizada para análise por MS.

3.6.1 Preparação das amostras para análise de MS

Ao sobrenadante da IP (80-200 µg ou 50-100 µL) foi adicionado 500 µM de DTT e incubou-se por 30 min a 56°C. Adicionou-se iodoacetamida (IAA) (4 mM) e incubou-se por mais 30 min a temperatura ambiente protegido da luz. Adicionou-se então a tripsina/bicarbonato de amônio (50 mM) a 20 ng/µL na razão 1:50 enzima:substrato. Incubou-se 16 h a 37°C até a adição de ácido fórmico 1%. As amostras foram secas e armazenadas a -20°C até o dia da corrida. As amostras (4.5 µL) foram analisados no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um LC-MS/MS por um sistema EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) através de uma fonte de ion nanoeletrospray Proxeon. Esta etapa foi realizada pelo corpo técnico do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio/CNPEN/Campinas/Brasil. A busca pelos peptídeos através da lista dos picos, foi realizada utilizando o Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) segundo banco de dados do *Swiss-Prot human database* (25/03/2013), com os seguintes parâmetros: carbamidometilação (+57.021 Da) como modificação fixa e oxidação da metionina (+15.995 Da) como modificação variável, tolerância de um sítio ausente de tripsina e 10 ppm para o precursor e 1 Da para os íons fragmentados.

Para a busca de peptídeos fosforilados, adicionou-se a fosforilação de serinas e treoninas como modificação variável. Ainda para a análise dos resultados, comparou-se as proteínas identificadas nas amostras contendo as diferentes isoformas de Nek4 com as proteínas identificadas pela amostra que continha o vetor vazio (pcDNAFlag vazio). As proteínas que foram encontradas para as isoformas da Nek4 que também foram imunoprecipitadas com o vetor vazio foram desconsideradas, não constando na tabela de resultados.

3.6.3 Construção da rede de interações – Análise *In silico* das interações proteína-proteína (PPI)

Os parceiros de interação para as isoformas Nek4.1 e Nek4.2 identificados após o experimento de IP-MS foram integrados numa rede de interação usando a plataforma Integrated Interactome System (IIS) - Laboratório Nacional de Biociências LNBio (Carazzolle *et al.*, submetido) com o auxílio da pesquisadora Gabriela Vaz Meirelles. Os processos biológicos enriquecidos obtidos a partir do banco de dados Gene Ontology

(GO, <http://www.geneontology.org/>) foram agrupados em cada rede utilizando a distribuição hipergeométrica (Carazzolle *et al.*, submetido). A rede de interações gerada foi visualizada utilizando o programa Cytoscape 2.8.3 (Shannon *et al.*, 2003).

3.7 Separação eletroforética e Western Blotting

Nos experimentos de eletroforese pelo método SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foram utilizados mini-géis (10 x 9 x 0,05 cm) constituídos de um gel de amostra de 4% e um gel de separação com 7 - 12,5% de poliacrilamida. Para a corrida, foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%) e tensão de 100V. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de polivinildifluoridina (PVDF) Immobilon-P (Millipore). A transferência foi realizada durante 60 - 75 minutos a 1 mA por cm² de membrana/gel, utilizando-se o *Semi-Dry Blotting System* (The W.E.P. Company). O tampão utilizado para a transferência foi o *Towbin Buffer* que apresenta a seguinte composição: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 3.5 mM de SDS e 15% de metanol. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Full Range Rainbow Molecular Weight Markers* (RPN800 GE Healthcare). Terminada a transferência, as membranas de PVDF foram saturadas em solução de TBS-T (Tris Buffer Saline – Tris.HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; e 0,05% de Tween 20) contendo leite desnatado (5%) por cerca de 18 h (*overnight*) a 4°C. Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2 – anexo) por 16h a 4°C. Em seguida, o anticorpo primário não ligado foi retirado por lavagens com TBS-T e o anticorpo secundário foi adicionado, incubando-se a membrana, novamente, durante 1 hora à temperatura ambiente, seguido por lavagens com TBS-T. Para a revelação da membrana, adicionou-se uma mistura do reagente luminol com uma solução de peróxido de hidrogênio (Santa Cruz Biotechnology) na proporção de 1:1 e a membrana foi exposta a filme radiográfico (Sigma-Kodak) para detecção da quimiluminescência.

3.8 Coloração por Nitrato de Prata

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em fixador (50% de metanol, 12% de ácido acético e formaldeído 1:2000) e aquecido em micro-ondas (potência máxima) por 30 segundos e então deixado sob agitação por 5min a temperatura ambiente.

Posteriormente, foi trocada a solução incubando-se então com etanol 30%, sendo que se seguiu o mesmo padrão de aquecimento e agitação. Então, foi passado para solução de tiosulfato de sódio (0.2 mg/mL), com aquecimento por 30 segundos e agitação a temperatura ambiente por 2 min. Lavou-se então o gel 2x com água destilada, seguindo o mesmo padrão de aquecimento e agitação. Prosseguiu-se com incubação em solução de nitrato de prata (2 mg/mL) e formaldeído (1:1350), aqueceu-se por 30 s e agitou-se por 5min a temperatura ambiente. Efetuou-se, ainda, uma lavagem com água destilada e incubou-se com a solução de revelação (6% (p/v) de carbonato de sódio, formaldeído (1:2000) e tiosulfato de sódio (4 µg/mL), até a visualização das bandas. A reação foi parada com uma solução contendo metanol (50%) e ácido acético (12%).

3.9 Quantificação de proteína total

Para quantificação de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford. Este método baseia-se na interação do corante “*Coomassie Brilliant Blue*” com aminoácidos que contém cadeia lateral aromática ou básica. No pH em que ocorre a reação, a formação desse complexo desloca a absorção do corante de 465 para 595 nm. Foi utilizada como referência uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) na concentração de 0,1- 1,4 mg/mL e foram seguidas as instruções do fabricante do reagente (B6916 - Sigma-Aldrich).

3.10 Imunofluorescência indireta

Para o ensaio de imunofluorescência foram utilizadas as células HEK293T, HeLa e RPE-hTERT. As células foram semeadas em lamínulas pré-tratadas (HCl 6M/ poli-L-Lisina) até confluência. No caso da RPE-hTERT, as células foram mantidas em cultivo até a total confluência, quando foi removido o soro e assim mantidas nessas condições por mais 20 h para indução do cílio primário. Para as células HEK293 FlpIn T-Rex as células foram tratadas com tetraciclina para induzir a expressão da proteína 24 h após serem semeadas e então esperou-se por mais 48 h até a fixação. As células foram fixadas com metanol gelado por 10 min a -20°C e então incubadas com solução de bloqueio/permeabilização PBS-BT (3% de BSA, 0,1% de TRITON 100x em PBS) por 20 min. Passado esse período estas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio (Quadro 2 – anexo) por 1 h a temperatura ambiente. Após esse período

e, 4 lavagens com PBS, foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos em solução de bloqueio (Quadro 2) por 20 min a temperatura ambiente e protegidos da luz. O DNA foi marcado com DAPI (4,6- diamidino-2-phenylindole) (1 µg/mL) ou HOECHST 3342 (6 µg/mL) (Sigma). Após esse período os poços foram lavados com PBS 5 vezes e então as lâminas foram montadas com o *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) para então serem visualizadas no microscópio Nikon, ou nos confocais Laica SP8 no LNBio ou LSM780 – NLO (Zeiss) no Infabric/UNICAMP. Ainda foi utilizado o microscópio não confocal Nikon E1000 com câmera CoolSnap 7x no IRB –Barcelona. As imagens obtidas foram processadas utilizando-se o *software* Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

3.11 Silenciamento da Nek4

Para os experimentos de silenciamento utilizou-se o siRNA *Silencer Select Validated* (Ambion) para Nek4 – si13564, que corresponde a uma região codificante para o domínio regulatório da Nek4 (1091-1108pb). Nesse tipo de silenciamento a dupla fita de RNA é inserida na célula por meio de transfecção e dentro da célula constitui o complexo com RISC (do inglês, *RNA-Induced Silencing Complex*). Nesse complexo, as duas fitas de RNA serão separadas, sendo que a fita anti-sense (também denominada fita guia), que é complementar ao RNAm específico que se pretende silenciar, permanece no complexo e poderá anelar ao RNAm degradando-o e assim reduzindo os níveis de expressão da proteína alvo.

Os experimentos iniciais tinham como objetivo verificar o silenciamento através dos níveis de proteína, logo, células HEK293T foram semeadas em placas de 6 poços (3×10^5 células/poço) e, 24 h após serem plaqueadas realizou-se a transfecção do siRNA nas concentrações de 5 e 10 nM (12,5 e 20 pmol, respectivamente), incluindo controle negativo C- (*scrambled* siRNA) e controle positivo (siRNA para GAPDH). As células foram coletadas após 12, 24, 48 e 72 h de silenciamento e, após a lise e quantificação das proteínas realizou-se a separação eletroforética das proteínas e detecção por *western blotting*. A intensidade das bandas foi estimada utilizando-se o programa ImageJ e a normalização para as amostras silenciadas com Nek4 ou C- foi feita com o GAPDH e então a porcentagem de silenciamento foi obtida em relação ao controle negativo.

Ainda, procurou-se estabelecer células silenciadas estavelmente para Nek4 utilizando-se o sistema lentiviral. Os vetores lentivirais utilizados foram pMDLg/pRRE, pRSV-Rev e pMD2.G. Células HEK293T foram transfectadas com pLKO.1-puro para mRNA da Nek4 humana (Sigma-Aldrich TRC1) que foram obtidos através do *Functional Genomics Core Facility* – IRB Barcelona. Após a transfecção as células foram mantidas por 24 h a 37°C e incubadas por 24 h adicionais a 33°C para facilitar a produção lentiviral. Depois de 48 h de produção das partículas virais, o meio foi coletado, filtrado e utilizado para infectar células HeLa. Depois de 24 h de incubação das células HeLa com o meio derivado das células HEK293, esse meio foi trocado por mais meio infectado e, após 24 h adicionais de incubação iniciou-se a seleção das células infectadas com o 2 µg/ml do antibiótico puromicina.

3.12 Irradiação e tratamento com peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é normalmente formado como produto à partir de diversas reações enzimáticas e é encontrado em altas concentrações nas mitocôndrias. Representa a fonte endógena de radicais livres que contribuem para o estresse celular oxidativo basal. O H₂O₂ exógeno eleva o nível de estresse oxidativo e pode induzir à morte celular por apoptose ou necrose (para revisão Halliwell e Cross, 1994; Liu, Trimarchi e Keefe, 2000). Para verificar a participação da Nek4 na via de resposta ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂, inicialmente células HEK293T foram submetidas a diferentes concentrações, por diferentes períodos de tempo, de H₂O₂ e a viabilidade celular foi avaliada. Para tanto, 5 x 10³ células foram semeadas em placa de 96 poços e, um dia após, peróxido de hidrogênio foi adicionado nas concentrações de 1x10⁻⁴ M a 1x10⁻³ M por 30 min – 12 h para se determinar a melhor concentração e tempo de estresse. Após esse período foi avaliada a viabilidade celular.

Para avaliar o efeito do silenciamento da Nek4 na morte celular induzida por H₂O₂, células HEK293T foram semeadas e, um dia depois (segundo dia) as células que seriam silenciadas por 72 h foram transfectadas com siRNA para Nek4 ou siRNA *scrambled* – controle negativo. No terceiro dia, foram transfectadas as células que seriam silenciadas por 48 h. Para os experimentos de superexpressão, foram utilizadas as células HEK293 FlpIn (FlagØ, Flag4.1 e Flag4.2) às quais no terceiro dia foi adicionada a tetraciclina para induzir

a expressão. No quinto dia todas as células foram expostas a 150 μ M de peróxido de hidrogênio por 1 h e após esse período foi avaliada a viabilidade celular por MTS. Para comparar a morte celular, foi obtida a porcentagem de células vivas que foram expostas ao H_2O_2 em relação às que não foram expostas, e portanto representam 100% de viabilidade.

Para avaliação da Nek4 em outros tipos de estresse, células HeLa também foram irradiadas usando raios-X (200kv de energia, 4.5 mA de corrente com uma distância de 44 cm da fonte de raios-X). As células foram irradiadas com 5 Gy e coletadas nos tempos 0, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h após a irradiação. Estas células foram utilizadas para experimentos de citometria de fluxo – apenas como controle do experimento- e imunofluorescência para verificação da localização da proteína endógena. Ainda, células HeLa e HEK293 foram submetidas a radiação UV utilizando um UV *crosslinker* (Stratagene, LaJolla, CA). Para isto, o meio foi removido e as placas foram expostas a uma dose de 85 J/m² ou 60J/m² de radiação. Duas horas após a irradiação as células foram coletadas e fixadas para realização de imunofluorescência.

3.13 Viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o composto *tetrazolium* MTS [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium] que é reduzido principalmente pelas enzimas mitocondriais (desidrogenases) das células viáveis a um composto colorido, o formazan. Para esse ensaio utilizou-se o protocolo rápido sugerido pelo fabricante do reagente (*Cell Titer 96 Aqueous One solution* – Promega). Brevemente, para verificar a porcentagem de morte causada pelo peróxido de hidrogênio, após o tratamento, o meio foi substituído por meio novo contendo o reagente MTS e incubou-se a placa por 1 h a 37°C e então a absorbância foi mensurada em leitor de placa a 490 nm. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada pela quantidade de células capazes de metabolizar o composto (absorbância) em relação ao controle (células que não foram tratadas com peróxido de hidrogênio).

3.14 Fracionamento celular

Para verificar a presença da Nek4 no compartimento mitocondrial utilizou-se o kit *Qproteome Mitochondria Isolation* (Qiagen-37612) ou *cell Fractionation* kit (ABCAM -

ab109719) para separar a fração mitocondrial das frações citoplasmática e nuclear. Foram utilizadas células HEK293T para avaliação da proteína endógena e HEK293 FlpIn expressando as isoformas da Nek4 ou então o vetor vazio para avaliação da superexpressão. Basicamente, seguiu-se as recomendações do fabricante para lise celular e, após quantificação de proteínas, 10-20 µg de proteínas totais foram submetidas a separação eletroforetica e subsequente *western blotting* como descrito no item 3.7. Para controle do fracionamento utilizou-se o anticorpo anti-VDAC ou Tom20 como marcadores mitocondriais, anti-GAPDH ou tubulina beta como marcadores citosólicos e anti-lamina como marcador nuclear.

3.15 Mutagênese sítio dirigida

Os experimentos de mutação sítio-dirigida foram realizados utilizando-se o kit *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) seguindo-se as recomendações do fabricante. A sequência codificadora do DNA para a isoforma 1 da Nek4 foi utilizada como molde para gerar os mutantes *kinase dead* (K35/36M), um fosfomimético (S340E) e seu controle (S340A) no vetor pCDNA5/FRT/TO-FLAG. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são apresentados na tabela 4 e todas as mutações foram confirmadas por sequenciamento (método Sanger).

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para mutagênese

K35/36M	Forward	5' GCGGGACGGCAGCAGTATGTCATCATGATGCTGAACCTCCGAAATGCC 3'
	Reverse	5' GGCATTTCGGAGGTTTCAGCATCATGATGACATACTGCTTGCCGTCCCGC 3'
S340E	Forward	5' GCCTCTGGTCTCTTGAAGGAGCCTGCCAGTCTGAAAGCC 3'
	Reverse	5' GGCTTTCAGACTGGCAGGCTCCTTCAAGAGACCAGAGGC 3'
S340A	Forward	5' GCCTCTGGTCTCTTGAAGGACCTGCCAGTCTGAAAGCC 3'
	Reverse	5' GGCTTTCAGACTGGCAGGTGCCTTCAAGAGACCAGAGGC 3'

3.16 Quantificação de ROS

Para quantificar as espécies reativas de oxigênio produzidas após o tratamento com peróxido de hidrogênio, células HEK293 silenciadas transitoriamente para Nek4, HEK293FlpIn, expressando estavelmente as isoformas ou células HeLa, estavelmente silenciadas para Nek4 foram submetidas a tratamento com peróxido de hidrogênio (150 μ M) por 1 h quando o meio de cultura foi trocado e, após 1 h de recuperação as células foram submetidas a citometria de fluxo para quantificar os níveis de ROS. Como marcador de ROS foi utilizado *CellROX deep Red reagent* (Invitrogen) ou dihidrorodamina (DHR1,2,3) (Invitrogen). Ambos corantes não são fluorescentes antes de entrarem na célula e serem oxidados pelas ROS lá presentes. Após essa reação exibem intensa fluorescência (emissão a 665 nm e 536 nm, respectivamente).

As células foram incubadas por 30 min com o Cell ROX (5 μ M) a 37° ou com DHR 1,2,3 (5 μ M) por 10 min, sendo que após esse período as células foram lavadas com PBS e então analisadas por citometria de fluxo (utilizando-se um Citômetro de Fluxo Coulter XL no IRB –Barcelona ou FACS Canto II (BD Biosciences). Como controle negativo (*scavenger*) foi utilizado piruvato de sódio a 10 mM (Hinoi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Amplificação do DNA codificante para a Nek4

A sequência codificadora para a proteína Nek4 foi amplificada à partir das bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano (CFH), medula óssea (MO) ou leucócito (Leuc) (Figura 10). O produto da amplificação foi consideravelmente maior para a biblioteca de CFH, corroborando com as informações do *Human Protein Atlas*, que indicavam uma alta expressão desta no sistema nervoso e moderada expressão na medula óssea. Optamos então por trabalhar com este produto pois o mesmo apresentava maior rendimento após a extração do gel de agarose. Este cDNA foi clonado em pGEM-T para facilitar as clonagens posteriores, contudo, após o sequenciamento do cDNA da Nek4 completa observamos que a isoforma amplificada não era a sequência canônica, isoforma 1, descrita no NCBI ([NM_003157.4](#)) já que a sequência que amplificamos apresentava-se truncada (pb 1369 – 1506) --- (aa 457 – 502)- sendo que a proteína codificada coincidia, nesta região, com uma isoforma citada no Uniprot ([P51957-2](#)), para qual ainda não existe confirmação experimental.

Atualmente, tem-se descrito no NCBI 2 isoformas para Nek4: a canônica, citada acima, que corresponde a isoforma 1 descrita no Uniprot (P51957-1) e a isoforma 2, que perde alguns pares de bases no N-terminal, codificando uma proteína com 88 resíduos de aminoácidos no domínio quinase menor que a isoforma 1. Esta é descrita como isoforma 3 no Uniprot (P51957-3).

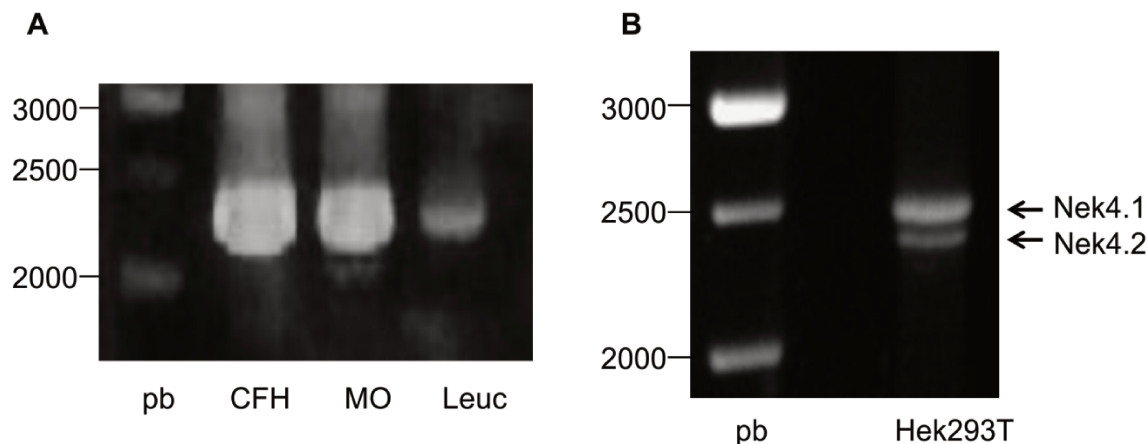


Figura 10: Amplificação do cDNA para Nek4. A sequência de DNA codificador para proteína Nek4 foi obtida através da reação de amplificação usando como molde as bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano (CFH), medula óssea (MO) e leucócito (LEUC) (A) ou ainda o RNA total de células HEK293T foi extraído e foi utilizado para síntese do cDNA da Nek4. Através da análise por eletroforese em gel de agarose é possível a visualização de duas bandas muito próximas, correspondendo ao cDNA para as isoformas 1 e 2 da Nek4 com 2526 pb e 2388 pb, respectivamente (B). Gel de agarose 1% Pb – marcador de pares de base.

Embora tenhamos amplificado essa sequência de bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos, não descartamos a possibilidade desse resultado decorrer do fato das bibliotecas utilizadas não serem normalizadas e, dessa forma, não apresentarem as sequências codificadoras de forma homogênea ou mesmo ser resultado de um artefato de clonagem. Para descartar essa possibilidade, extraímos o RNA total de células HEK293T e, a partir de RT-PCR, amplificamos o cDNA para Nek4. Curiosamente, dessa vez, conseguimos distinguir duas bandas muito próximas como produto da amplificação e, após sequenciamento, identificamos, respectivamente as isoformas 1 e, o que a partir de agora, chamaremos de isoforma 2 da Nek4 (Figura 10). Essa sequência codificadora origina uma proteína diferente da descrita pelo Uniprot como isoforma 2, pois ela difere da isoforma 1 apenas na região correspondente à sequência Alu (Figura 11). Dessa forma, a sequência codificante para essa nova isoforma para Nek4 encontrada por nós foi submetida para o banco de dados (número de acesso *GenBank* KJ592714), com o intuito de atualizar as informações existentes sobre a Nek4.

A região ausente na isoforma que amplificamos, quando analisada contra o banco de dados do NCBI através do programa BLAST, é encontrada também em outras proteínas e está ausente também em algumas isoformas para as quais não existe confirmação experimental. Essa região ausente na proteína seria codificada por uma sequência *Alu*. A

sequência *Alu* é o elemento repetitivo de DNA (~300pb) mais abundante no genoma dos primatas e é classificado como *short interspersed elements* (SINEs). Representa 11% do genoma total e surgiu há 60 milhões de anos sendo que atualmente já foram identificadas 16 subfamílias (*International Human Genome Sequencing Consortium* 2001; Li *et al.* 2001). Foi denominado *Alu* porque em sua sequência há sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *AluI* (AGCT) (Watson *et al.*, 2009). Curiosamente, a sequência que amplificamos é muito parecida com a isoforma longa da Nk4 de camundongo (Hayashi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999) e, uma vez que a sequência *Alu* é exclusiva de primatas (Kapitonov e Jurka 1996; Schmid 1996), a inserção desta região na sequência da hNk4 poderia ter proporcionado a expressão de uma proteína não-funcional ou, ao contrário, ter adicionado novas funções para essa proteína em humanos.

Transcritos normais podem conter a sequência *Alu* na região 5' e 3' não traduzida, e a presença desta em uma região de leitura poderia indicar um artefato de clonagem, uma vez que normalmente a inserção destas em regiões transcritas acarreta em parada na transcrição. Contudo, crescentes evidências apontam para a presença desses elementos em regiões que serão traduzidas. Ainda, segundo Nekrutenko e Li (2001) elementos transponíveis são encontrados em regiões codificantes para proteínas de até 4% dos genes humanos, e, os elementos *Alu* correspondem a um terço dessas inserções.

Considerando a hipótese de que esse elemento tenha sido incorporado ao genoma na região codificadora para Nk4, sua inserção pode ter gerado sítios para *splicing* alternativo atribuindo novas funções à proteína codificada. Ainda, a inserção da sequência *Alu*, pode ter gerado uma proteína com parceiros de interação, funções e localização celular diferente. Também já foi demonstrado que a sequência *Alu* pode ser importante para interação com outras proteínas. Por exemplo, no trabalho de Hoenicka e colaboradores (2002) foi realizado duplo-híbrido em levedura com a proteína neuronal Tau e foram “pescados” dois peptídeos cuja sequência de aminoácidos é derivada de uma sequência *Alu*.

A

```

Nek4I1      CCTGAAAACCTGATTCCCATGTGGTCCTCTGACATTGTCTACTGGGGAAAAGAAATGAACCA 1320
Nek42       CCTGAAAACCTGATTCCCATGTGGTCCTCTGACATTGTCTACTGGGGAAAAGAAATGAACCA 1320
Nek41       CCTGAAAACCTGATTCCCATGTGGTCCTCTGACATTGTCTACTGGGGAAAAGAAATGAACCA 1320
*****

Nek4I1      GTGAAGCCTCTGCAGCCCTAATCAAAGAACAAAAGCCAAAGGACCAGAGTCTTGCCCTG 1380
Nek42       GTGAAGCCTCTGCAGCCCTAATCAAAGAACAAAAGCCAAAG----- 1362
Nek41       GTGAAGCCTCTGCAGCCCTAATCAAAGAACAAAAGCCAAAGGACCAGAGTCTTGCCCTG 1380
*****

Nek4I1      TCGCCCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAACTTGGCTCACAGCAACCTCCGCCTCCTGGGT 1440
Nek42       -----
Nek41      TCGCCCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAACTTGGCTCACAGCAACCTCCGCCTCCTGGGT 1440

Nek4I1      TCAAGTGATTCTCCAGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACCAC 1500
Nek42       -----
Nek41      TCAAGTGATTCTCCAGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACCAC 1500

Nek4I1      GCCCAGGATCAAGTTGCTGGTGAATGTATTATAGAAAACAGGGCAGAAATCCACCCAGAT 1560
Nek42       GACCAGGATCAAGTTGCTGGTGAATGTATTATAGAAAACAGGGCAGAAATCCACCCAGAT 1422
Nek41      GCCCAGGATCAAGTTGCTGGTGAATGTATTATAGAAAACAGGGCAGAAATCCACCCAGAT 1560
* *****

Nek4I1      TTACAGCCACAACTCTGGGTCTGAACCTTCCCTGCTCTCGACAGCGACGGCAAAAGAGG 1620
Nek42       TTACAGCCACAACTCTGGGTCTGAACCTTCCCTGCTCTCGACAGCGACGGCAAAAGAGG 1482
Nek41      TTACAGCCACAACTCTGGGTCTGAACCTTCCCTGCTCTCGACAGCGACGGCAAAAGAGG 1620
*****

Nek4I1      AGAGAACAGACTGAGCACAGAGGGGAAAAGAGACAGGTCCGCAGAGATCTCTTTGCTTTC 1680
Nek42       AGAGAACAGACTGAGCACAGAGGGGAAAAGAGACAGGTCCGCAGAGATCTCTTTGCTTTC 1542
Nek41      AGAGAACAGACTGAGCACAGAGGGGAAAAGAGACAGGTCCGCAGAGATCTCTTTGCTTTC 1680
*****

```

B

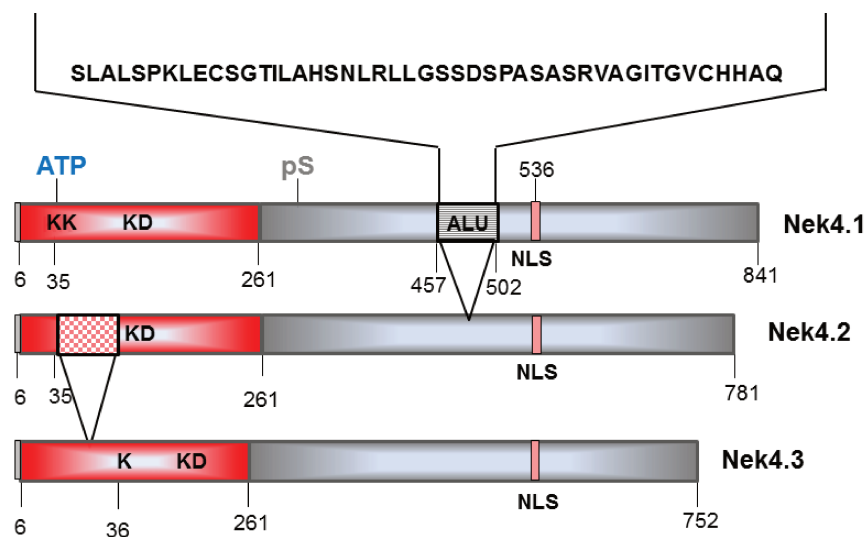


Figura 11. Comparação entre as isoformas da Nek4. A) Alinhamento da sequência codificante para a isoforma 1 da Nek4 (Nek4I1) descrita no NCBI e, as duas isoformas amplificadas a partir de extratos de células HEK293T (Nek41 e Nek42), apresentando a diferença na região correspondente à sequência Alu, que não está presente na isoforma Nek42. B) Representação esquemática das isoformas da Nek4. Em vermelho está representado o domínio quinase, em cinza, o domínio regulatório com uma sequência consenso para localização nuclear - NLS (rosa). Ainda estão assinaladas a lisina que seria responsável pela ligação ao ATP

(K36), a serina na posição 340 (pS) que foi encontrada fosforilada em experimentos de espectrometria de massas. Nas regiões chanfradas, estão destacadas a região ausente na Nek4.2 (sequência ALU) e a sequência ausente na Nek4.3 (Uniprot) no domínio quinase. Em destaque os aminoácidos codificados pela sequência ALU.

4.2 Análise em bancos de dados do padrão de expressão e características estruturais da Nek4

4.2.1 Localização celular

Em relação à expressão da proteína Nek4, no banco de dados *The human Protein Atlas*, consta que esta apresentaria forte padrão de expressão em tecidos normais do sistema nervoso central, como córtex cerebral e cerebelo, nos testículos, placenta, na glândula adrenal e células da nasofaringe. A expressão da Nek4 seria moderada na medula óssea (células hematopoiéticas). Já em tecidos tumorais, a marcação nuclear foi moderada em glioma maligno (67% das amostras) e em câncer colo-retal (42%). Curiosamente, em tecidos de câncer de próstata o nível de expressão foi muito baixo. Nos dados relacionados à sublocalização celular através de dados de fluorescência, em células A431 e U251 MG, a Nek4 está presente no núcleo.

Como o *The human Protein Atlas* sugere localização nuclear para Nek4, utilizamos preditores para localização celular e especificamente nuclear da Nek4. As predições foram realizadas para as isoformas descritas no NCBI e a que amplificamos e não foram encontradas diferenças. A localização nuclear foi apontada pelo preditor BaCelLO enquanto o preditor iPSORT indica a presença de um peptídeo para localização mitocondrial, que é confirmada pelo TargetP, mas com baixo score.

Utilizando os preditores de localização nuclear é possível identificar o peptídeo responsável, bem como inferir se a proteína está em algum lugar específico do núcleo. Para verificar a possibilidade da Nek4 ser direcionada para o núcleo, utilizou-se preditores para sinal de localização nuclear (NLS) e, foi encontrado um potencial peptídeo monopartite: **RRQKRREQTE** no domínio regulatório pelo preditor NLS *mapper*, esta sequência já havia sido apontada por Hayashi e colaboradores (1999) (Figura 12). A proteína apresentou alto score (0.94) para localização nuclear segundo o preditor Nuc-Pred, mas nenhum peptídeo sinal de exportação nuclear (NES) foi encontrado.

A

Predicted NLSs in query sequence		
MPLAAYCYLRVVVGKGSYGEVTLVKHRRDQYVIKKLNLRNASSRERRAA	50	
EQEAQLLSQLKHPNIVTYKESWEGGDGLLYIVMGFCEGGDLYRKLKEQKG	100	
QLLPENQVVEWFVQIAMALQYLHEKHILHRDLKTQNVFLTRTNI IKVGD	150	
GIARVLENHCDMASTLIGTPYYMSPELFSNKPYNKSDVWALGCCVYEMA	200	
TLKHAFNAKDMNSLVYRIIEGKLPPMPRDYSPELAELIRTMLSKRPEERP	250	
SVRSILRQPYIKRQISFFLEATKIKTSKN	300	
SNHEVIHPQPLSSEGSQTYIMGEGKCLSQEKPRASGLLKSPASLKAHTCK	350	
QDLSNTTELATISSVNIDILPAKGRDSVSDGFVQENQPRYLDASNELGGI	400	
CSISQVEEEMLQDNTKSSAQPENLIPMWSSDIVTGEKNEPVKPLQPLIKE	450	
QKPKDQSLALSPKLECSGTILAHSNLRLLGSSDSPASASRVAGITGVCHH	500	
AQDQVAGECIIIEKQGRIHPDLQPHNSGSEPSLSRQRRQKRREQTE	550	
RQVRRDLFAFQESPPRFLPSHPIVGKVDVTSTQKEAENQRRVVTGSVSSS	600	
RSSEMSSSKDRPLSARERRRLKQSQEEMSSSGPSVRKASLSVAGPGKPQE	650	
EDQPLPARRLSSDCSVTQERKQIHCLSEDELSSSTSSTDKSDGDYGEKG	700	
QTNEINALVQLMTQTLKLDSEKSCEDVPVANPVSEFKLHRKYRDTLILHG	750	
KVAEEAEIIEHFKELPSAIMPGSEKIRRLVEVLRTDVIRGLGVQLLEQVYD	800	
LLEEEDEFDREVRLREHMGEKYTTYSVKARQLKFFEENMNF	841	

B

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
536	RRQKRREQTE	7

Figura 12: Predição de sinal para localização nuclear (NLS) na sequência de resíduos de aminoácidos da Nek4. Segundo o preditor NLS mapper, a Nek4 apresenta 3 sequências de localização nuclear, sendo que uma sequência (apresentada em B) no domínio regulatório da Nek4 apresenta um alto escore 7 para reconhecimento da importina α .

O núcleo é um compartimento celular altamente complexo, e, além dos ácidos nucléicos, também comporta várias estruturas identificadas através de microscopia eletrônica (de, T. H. E., Reviere e Bernhard; 1960) que foram denominados corpos nucleares. São bem estabelecidas as seguintes estruturas: *speckles nucleares*, corpos de Cajal/GEMS, corpos PML, o nucléolo, compartimento perinuclear e corpos de clivagem. Quando avaliou-se se a Nek4 apresentava alguma localização nuclear específica, o preditor

Subnuclear Compartments Prediction System indica localização nos corpos nucleares PML (Proteína de leucemia promielocítica), mas o NucPloc indica localização nucleolar.

Nossos resultados obtidos através de ensaios de imunofluorescência apresentam uma marcação pontual (*dot like*) no núcleo de células HEK293T (Figura 13 A e B) e HeLa (Figura 13 C e D) e ainda uma marcação mais difusa no citoplasma dessas células. A marcação nuclear pontual poderia ser condizente com os preditores que apontam para a localização da Nek4 é uma estrutura nuclear específica. Detalhes sobre essa localização serão discutidos posteriormente.

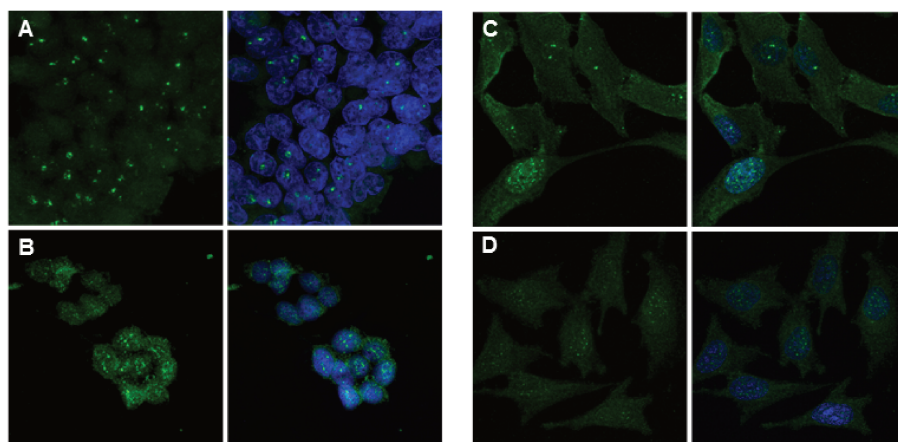


Figura 13: Localização nuclear da Nek4. Células HEK293T (A e B) e HeLa (C e D) foram fixadas com metanol gelado e submetidas a imunofluorescência indireta utilizando dois anticorpos primários diferentes contra Nek4: mouse anti Nek4 (A e C) e goat anti Nek4 (B e D) marcado em verde. Pode-se observar uma marcação pontual no núcleo das duas linhagens celulares. O DNA está marcado em azul (HOECHST 3342). As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Aumento de 600X. Marcação em verde, fluoróforo do secundário Alexa Fluor[®]488.

4.2.2 Predições estruturais

Para obtenção das características físico-químicas das proteínas, utilizou-se o servidor *ProtParam*, que indica que a sequência codificante para a isoforma dita canônica da Nek4 codifica para uma proteína de 841 resíduos de aminoácidos, com peso molecular aproximado de 95 kDa e pI teórico de 8.04. Seu domínio quinase consiste em 265 resíduos de aminoácidos (6-261), com peso molecular de aproximadamente 30 kDa e pI teórico de 9.34.

Utilizando o programa PSIPRED, verificou-se que a proteína Nek4 é composta de alfa-hélice, folha beta e regiões preditas randômicas, sendo que a região regulatória é principalmente composta por estrutura randômica (Figura 14).

As predições de enovelamento foram realizadas utilizando-se o programa FoldIndex©. Observa-se que o domínio quinase é a região mais ordenada da Nek4 e o domínio regulatório apresenta-se quase totalmente desordenado, sendo que, entre os resíduos 450 à 500 da Nek4, há predição de uma região enovelada, bem como na porção final desse domínio (Figura 15). Essa região, coincidentemente, é a correspondente a codificada pela sequência Alu (457 – 502aa) e, dessa forma, a isoforma que amplificamos (Nek4.2) não apresentaria essa região. A inserção de uma região que codificará para uma sequência de aminoácidos originando uma região mais ordenada indica que novas interações podem ocorrer por essa região.

Por fim, para avaliar se as proteínas em estudo apresentavam predição para regiões *coiled coil*, utilizou-se o programa SMART. O *coiled-coil* é um padrão de enovelamento proteico ubíquo que tem sido identificado em pelo menos 10% de todas as sequências de proteínas (McFarlane, Orriss e Stetefeld, 2009). É mostrado que a sequência primária dos *coiled-coils* determina a estrutura secundária, e é relevante para características como estabilidade da proteína, oligomirização e especificidade. A presença dessas regiões já foi identificada em proteínas que participam de diferentes processos como regulação gênica, divisão celular e fusão de membranas, entre outras (Yu, 2002; McFarlane, Orriss e Stetefeld, 2009; Apostolovic, Danial e Klok, 2010). Para a Nek4, como já comentado na literatura, não foi encontrada predição de *coiled coil* através do programa SMART.

Figura 14: Predição da estrutura secundária da Nek4. Através da predição do programa PSIPRED pode-se observar que a Nek4.1 é predominantemente constituída por hélice alfa, mas apresenta muitas regiões sem estrutura secundária definida. O domínio quinase é o que apresenta maior quantidade de elementos de estrutura secundária. A região ausente na Nek4.2 (457-502aa) é uma região que não possui estrutura secundária

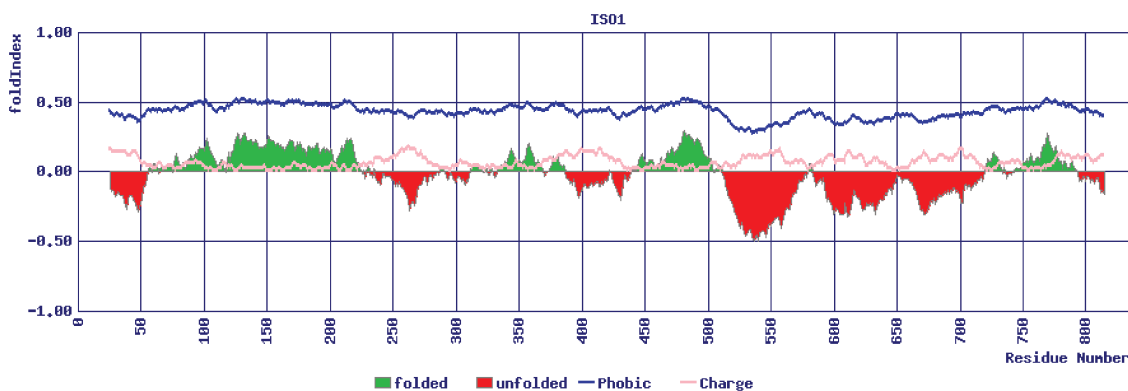


Figura 15: Predição de regiões enoveladas da Nek4.1. O Programa FoldIndex atribui um escore para as regiões enoveladas (verde), desenoveladas (vermelho), carregadas e apolares da proteína. Pode-se observar que todo o domínio regulatório (a partir do aa 261) é desenovelado, com exceção dos resíduos entre 450 e 500, que correspondem a região codificada pela sequência Alu..

Como também não é descrita na literatura a existência de outro motivo na região regulatória da Nek4, para auxiliar na sua caracterização, procuramos por modificações pós-traducionais para as quais existem preditores disponíveis, como de SUMOilação e fosforilação. Curiosamente, encontramos sítios de sumoilação, bem como de ligação ao SUMO par a Nek4 (Figura 16).

A modificação pós-traducional de lisinas, por adição de SUMO (*Small ubiquitin-like modifiers*) é denominada sumoilação. Essa modificação é fundamental para vários processos biológicos, como reparo de DNA danificado, expressão gênica, montagem cromossômica, entre outros, mas, o principal efeito dessa reação é regular a interação entre proteínas. A região de reconhecimento para ligação de SUMO é Ψ -Lys-X-Glu (sendo Ψ um aminoácido hidrofóbico, normalmente isoleucina ou valina e X um aminoácido qualquer). Embora a ligação covalente de SUMO com a proteína que interage seja um processo comum, recentemente tem sido relatado que muitas vezes SUMO pode não interagir diretamente com essas proteínas no sítio de sumoilação. Ainda, muitas vezes ocorre a interação com SUMO, mas não a sumoilação (para revisão Müller, Ledl e Schmidt, 2004). O preditor utilizado apontou para a existência de sequências alvo para

ligação de SUMO bem como da sumoilação. Esse resultado é muito interessante, uma vez que um dos preditores de sublocalização nuclear indicou a presença de Nek4 nos corpos PML. PML é uma proteína que interage com SUMO e sofre sumoilação. Esse processo é fundamental para a formação dos corpos PML e a maioria das proteínas associadas aos corpos PML também é sumoilada (Para revisão Lallemand-Breitenbach e Thé, 2010). Ainda, chama atenção o fato que um dos resíduos de lisina ao qual SUMO pode se ligar (K463) está na região ausente na isoforma 2 e, dessa forma, é possível que algumas interações sejam exclusivas para a isoforma 1 por exigirem a interação de SUMO com essa lisina.

A

Posição	Peptídeo	Escore	"Cutoff"	Tipo
24	YGEVTLV K HRRDGKQ	40.59	36.625	Sumoilação
463	QSLALSPKLECSGTI	19.17	16	Sumoilação
476-480	TILAHSN L RLL GSSDSPAS	59.66	59.29	Ligação SUMO
717	QLMTQTLKLDSKESC	37.08	36.625	Sumoilação
798-802	GVQLLEQ VYD LLLEEDEFD	63.94	59.29	Ligação SUMO

B

Posição	Peptídeo	Escore
K717	LMTQTLKLDS KES	0.91
K339	RASGL LK SPASLKA	0.80
K282	TSKNN IK NGDSQSK	0.77
K146	TRTN IK VGDLGIA	0.77
K576	SHPIVG K VDVTSTQ	0.67
K463	SLALSPKLECSGTI	0.61

Figura 16: Predição de sumoilação da Nek4.1. O preditor GPS SUMO indica a existência de sequências consenso tanto para sumoilação quanto para ligação a SUMO (A) e, aponta uma lisina com alto escore para sumoilação (B).

A fosforilação é uma modificação pós traducional muito comum e capaz de regular a maioria das funções celulares. Através dela são induzidas alterações conformacionais, e, na maioria das enzimas, conseqüentemente, sua atividade ainda pode modular sítios para interação com várias proteínas formando complexos (para revisão Huse e Kuryian, 2002).

As proteínas quinases apresentam, de forma geral, um domínio catalítico constituído por dois domínios ou lobos, um menor, N-terminal, constituído por 5 folhas beta e uma alfa hélice e um lobo maior C-terminal que é basicamente constituído por alfa hélice. É no C-terminal que se localiza a alça catalítica, ou *loop* de ativação, que contém os resíduos que intermedeiam a transferência de um fosfato do ATP para o substrato. O ATP liga na fenda entre os dois lobos e é coordenado por uma região ligadora de fosfato rica em glicina. O substrato é então posicionado centralmente na alça catalítica, a qual é geralmente fosforilada. A transição das quinases entre um estado ativo e inativo é controlada por diversos fatores, incluindo a interação com outras proteínas, efeitos alostéricos e fosforilação. A forma mais comum de regulação da atividade de quinases é a fosforilação no *loop* de ativação. Nas quinases que são reguladas dessa forma, a ausência da fosforilação proporciona uma conformação auto inibitória, na qual a alça de ativação se dobra sobre a fenda, bloqueando interação com substrato e ligação do ATP (para revisão Nolen, Taylor e Ghosh, 2004; Taylor e Kornev, 2011).

A sequência primária na alça de ativação é definida como uma região entre dois segmentos de 3 resíduos de aminoácidos (DFG ou DLG APE ou SPE) no lobo maior (para revisão Nolen, Taylor e Ghosh, 2004). As Neks, como as demais quinases, seguem esse padrão (Figura 17 A) e, é nessa região que as Neks que tem a capacidade de autoativação se autofosforilam. Esse é o caso das Neks 2, 8 e 9 (Rellos *et al.*, 2007; Zalli *et al.*, 2012; Roig *et al.*, 2005). As Neks 6 e 7, que não são autoativadas, são fosforiladas para a sua ativação também nessa região pela Nek9 (Roig *et al.*, 2002; 2005 e Belham *et al.* 2003). A Nek4 apresenta um resíduo de serina (S164) e de treonina (T165) (conservado) no *loop* de ativação como possíveis sítios para ativação (Figura 17 B).

A capacidade de autoativação já foi relacionada à interação entre motivos *coiled coils* e conseqüente dimerização. Esta teoria se aplica para Nek2 e Nek9, e, justifica a incapacidade das Neks 6 e 7 de se autoativarem, uma vez que as mesmas não dimerizam (Quarmby e Mahjoub, 2005). Embora não tenha sido encontrada região *coiled coils* em

nossas análises de predição, a possibilidade de dimerização e auto-ativação da Nek4 não pode ser descartada. Outra análise interessante é a conservação de um resíduo de tirosina na região catalítica pela Nek4 (Y68). Segundo Richards e colaboradores (2009), a Nek4 conserva esse resíduo que está relacionado ao estado auto-inibido para Nek7 (Figura 18).

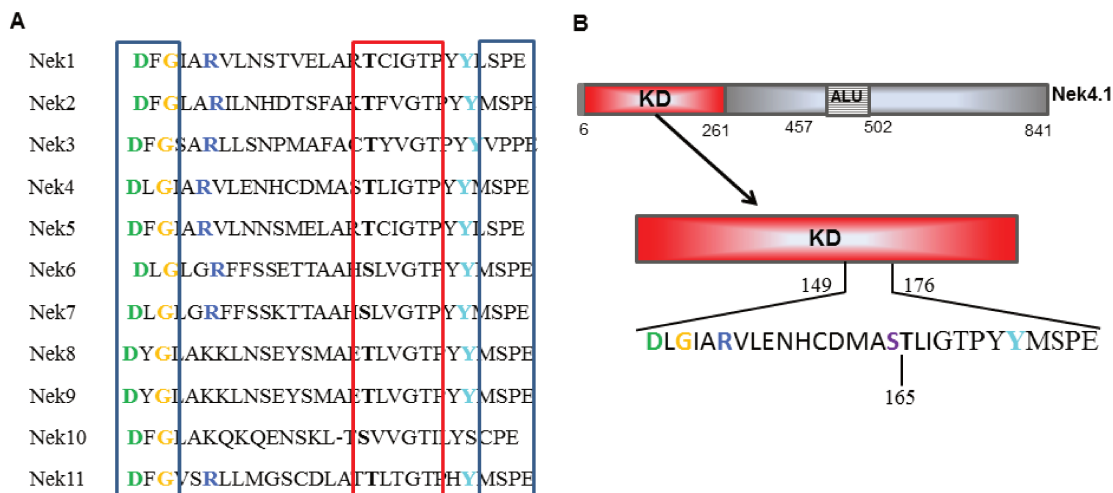


Figura 17: Alinhamento do *loop* de ativação das hNeks. O *loop* de ativação da maioria das proteínas quinases consiste em aproximadamente 30 resíduos que são separados por uma sequência DFG ou DLG (primeiro destaque em A) e a sequência SPE (último destaque em A), no caso das Neks. Nesse *loop* catalítico encontra-se o resíduo que será fosforilado para a ativação (destaque em vermelho em A). No caso das Neks, principalmente uma treonina. A Nek4 apresenta o resíduo de treonina 165 conservada no *loop* de ativação, mas também uma serina precedente que poderia ser fosforilada (B).

Os preditores de fosforilação, *NetPhosK* e *Scansite* apontam para vários resíduos, incluindo serina, treoninas e tirosinas, com razoável escore para fosforilação.

Segundo *NetPhosK*, a Nek4 apresenta 121 resíduos passíveis de fosforilação (dados não apresentados), dentre esses, 2 estão no *loop* catalítico, os resíduos de treonina 165 e de serina 174. O preditor aponta como possíveis quinases para o resíduo de treonina a PKC e a cdc2. Para o resíduo de serina, p38 e CDK5. Segundo esse preditor, o maior escore (0-1.0) é atribuído para a fosforilação do resíduo de serina 826 pela PKC (0.9). Já segundo o preditor *Scansite*, ajustando para média estringência 29 resíduos passíveis de fosforilação são apontados. Dentre esses, nenhum se encontra no *loop* de ativação e o resíduo de serina

826 apresenta um escore médio. Reduzindo-se a estringência, o preditor aponta para dois resíduos de tirosinas (Y171, Y172) e o de serina 174 como passíveis de fosforilação, mas não o resíduo de treonina 165. O resíduo de serina 174 seria alvo da fosforilação de proteínas serina/treoninas dependentes de prolina, que inclui quinases como Cdc2, Cdk5, Erk1 e p38. O resultado do preditor PHOSIDA, não apresenta predição de fosforilação de nenhum resíduo de serina no *loop* catalítico, mas, o resíduo de treonina 165 também é apontado como passível de fosforilação, e, nesse caso, a quinase responsável seria a CHK2. Frequentemente, as predições podem não ser confiáveis devido à falta de informações nos bancos de dados em relação a interações ou mesmo estruturas de proteínas, dessa forma, para concluir algo a respeito dos resíduos fosforilados para Nek4 devem ser realizados experimentos de espectrometria de massas apropriados para identificar peptídeos fosforilados e ainda experimentos de mutação sítio-dirigida.

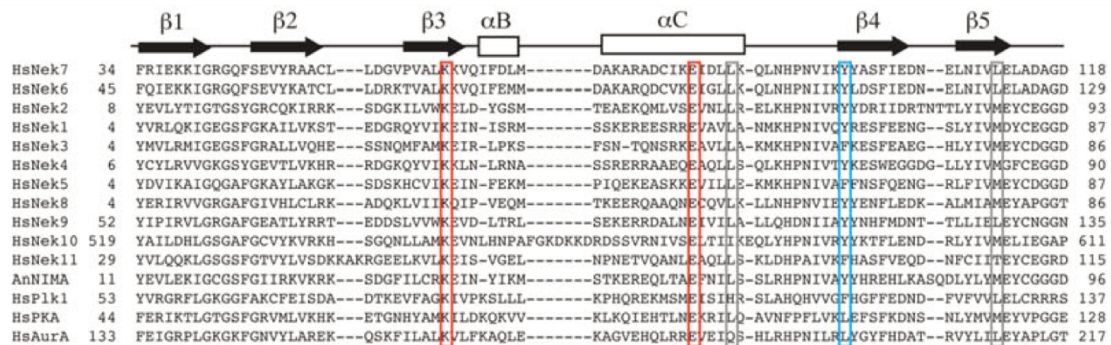


Figura 18: Alinhamento domínio quinase (lobo N-terminal) das Neks. Lobo N-terminal da estrutura básica do domínio catalítico das proteínas quinases, incluindo NIMA (AnNIMA), Plk1 humana (HsPlk1), Aurora A humana (HsAurA) e as onze hNeks. Esse alinhamento apresenta os resíduos catalíticos conservados e equivalentes para Nek7. Em vermelho as lisinas e ácidos glutâmicos equivalentes a lisina 63 e ácido glutâmico 82 da Nek7. Em azul, a tirosina que é conservada e responsável pelo estado auto-inibitório da Nek7. Em cinza, as leucinas 111 e 86 da Nek7. Suplementar Richards *et al.*, 2009.

4.3 Localização endógena da Nek4 e ciclo celular

Como a Nek4 é um membro da família Neks e a participação no controle do ciclo celular, especialmente na mitose, já foi demonstrada para as Neks 2, 6, 7 e 9 (Fry *et al.* 1995 e 1999; Belham *et al.* 2003; Roig *et al.*, 2002), decidimos, inicialmente, caracterizar o perfil de localização da Nek4 durante a divisão celular através de imunofluorescência indireta. Através dos nossos resultados, pudemos observar, em duas linhagens de célula,

HeLa (Figura 19) e HEK293T (Figura 20), que a Nek4 apresenta uma marcação citoplasmática difusa e alguns pontos no núcleo das células em interfase. Durante a prófase e prometafase a Nek4 apresenta uma localização mais específica, principalmente nos centrossomos e no que dará origem ao fuso mitótico. Ainda, apresenta uma fraca localização na zona média, possivelmente nos microtúbulos polares. Durante a metáfase, a Nek4 se acumula nas regiões nas quais os pólos mitóticos estão presentes. Quando as células entram em anáfase, a Nek4 se concentra na região central do fuso. Ao final da anáfase e na telófase a Nek4 localiza-se principalmente na zona média, onde o anel de clivagem será formado. Durante a citocinese a Nek4 se acumula no *midbody*, a região no centro das pontes que conectam as duas células filhas.

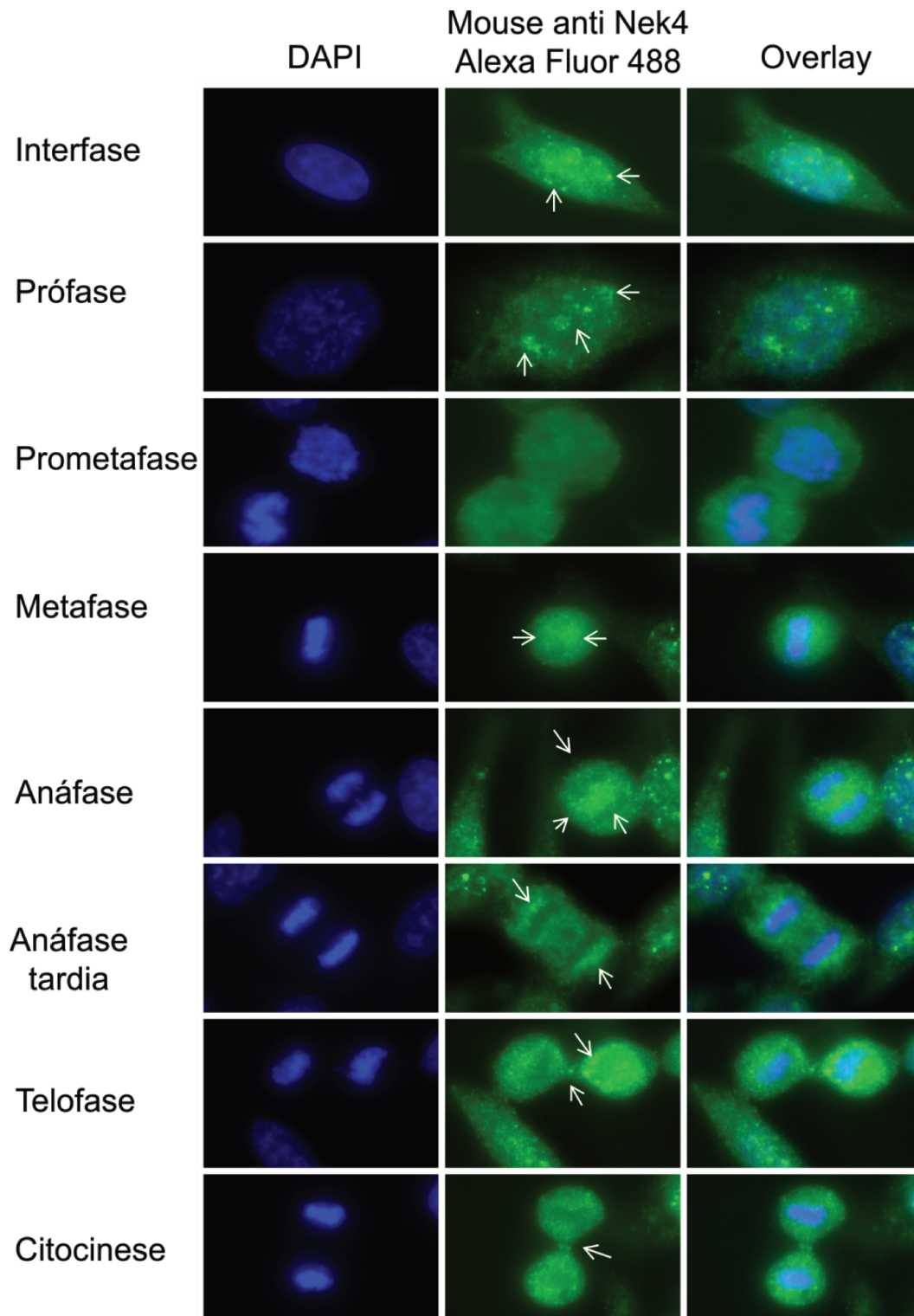


Figura 19: Marcação da Nek4 endógena durante a divisão celular em HeLa. Células em intérfase apresentam marcação para a Nek4 difusa no citosol e uma marcação pontual no núcleo (setas). Durante a prófase pode se observar um acúmulo de Nek4 nos centríolos e placa média. (setas). Em prometáfase a marcação da Nek4 parece estar distribuída homogeneamente. Já em metáfase há um aumento da marcação nas regiões correspondentes aos pólos do fuso mitótico (setas). Em anáfase, a marcação ainda é mais acentuada

nos pólos, contudo também se observa uma marcação intensa na placa (setas). Na telófase ocorre um aumento da marcação na região onde ocorrerá a formação do anel de clivagem, sendo que na citocinese pode-se observar que a Nek4 marca a região remanescente, correspondente ao *midbody*. As imagens foram obtidas em microscópio não confocal em aumento de 600X. O DNA foi marcado com DAPI. Marcação em verde – secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor[®] 488.

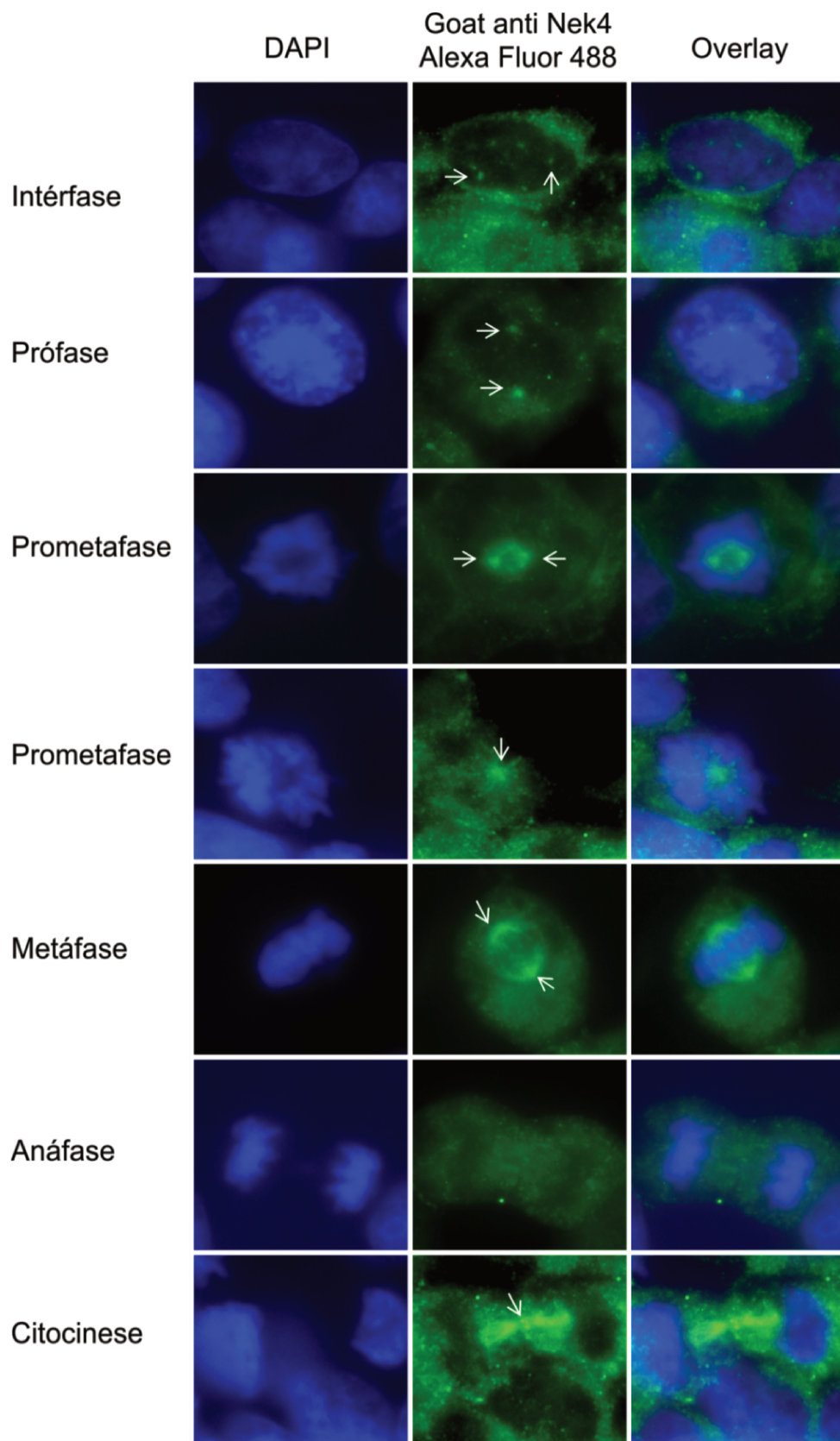


Figura 20: Marcação da Nek4 endógena durante a divisão celular em HEK293. Em células HEK293 T o padrão de marcação da Nek4 é muito similar à HeLa. Em intérfase observa-se a marcação pontual no núcleo (setas) e em prófase o acúmulo nos centrossomos (setas), observado também em prometáfase (seta). Já em metáfase nitidamente a Nek4 está concentrada nos pólos do fuso mitótico, enquanto que em anáfase também aparece na placa medial. Na citocinese mais uma vez observa-se a marcação da Nek4 nas pontes que unem as células filhas e no corpo remanescente, o *midbody*. As imagens foram obtidas em microscópio não confocal com aumento de 1000x. O DNA foi marcado com HOECHST 3342. Marcação em verde – secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor® 488.

O *midbody* é uma estrutura complexa que aparece entre as células em divisão durante a citocinese e é o local onde ocorrerá a separação entre as células (*abscission*) (Canman e Wells, 2004) (Figura 21). É uma região mais densa e central das pontes intercelulares que basicamente é composta por feixes de microtúbulos acetilados antiparalelos que se sobrepõem (Steigemann e Gerlich, 2009). A presença marcante da Nek4 nessa região é interessante, pois, para Nek9 já foi demonstrada localização no *midbody* (Roig *et al.* 2005), contudo, ainda é necessário esclarecer se essa localização é fundamental para que ocorra a separação dessas células.

Como foi observada uma marcação diferencial para Nek4 conforme a fase do ciclo celular, principalmente nas células em divisão, utilizou-se o marcador de divisão celular histona 3 fosforilada. A histona 3 é fosforilada no início da mitose e, células positivamente marcadas para essa forma da proteína estão em divisão celular. Mais uma vez podemos observar (Figura 22) que a marcação da Nek4 não é exclusiva de alguma fase do ciclo celular (não é ausente em algumas fases e presente em outras, como ocorre com alguns membros da família Nek). Ainda, pode-se observar que a marcação mais acentuada para Nek4 em células em divisão se dá principalmente na citocinese, na ponte que une ainda as células filhas. Observa-se também uma marcação mais característica durante a metáfase e anáfase, quando a Nek4 parece se localizar no fuso e zona média, respectivamente. Diante desse resultado, esperar-se-ia que a Nek4 fosse importante para a citocinese, ou correta formação do fuso e separação dos cromossomos, contudo, nos estudos já publicados (Coene *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012), a importância da Nek4 para o controle do ciclo celular em condições normais foi excluída. Nos dois casos, foi realizada citometria de fluxo para determinar o perfil populacional após silenciamento da Nek4 e, em ambos, não houve qualquer alteração do ciclo celular dessas células. Esses resultados sugerem que, embora a Nek4 participe da divisão celular em condições fisiológicas, provavelmente compartilhe

funções com outras Neks e, por esse motivo, na sua ausência não é detectada alteração do perfil de células em divisão. Contudo, isso não exclui sua importância para o controle do ciclo celular em condições específicas, como por exemplo, após estímulos danosos ao DNA.

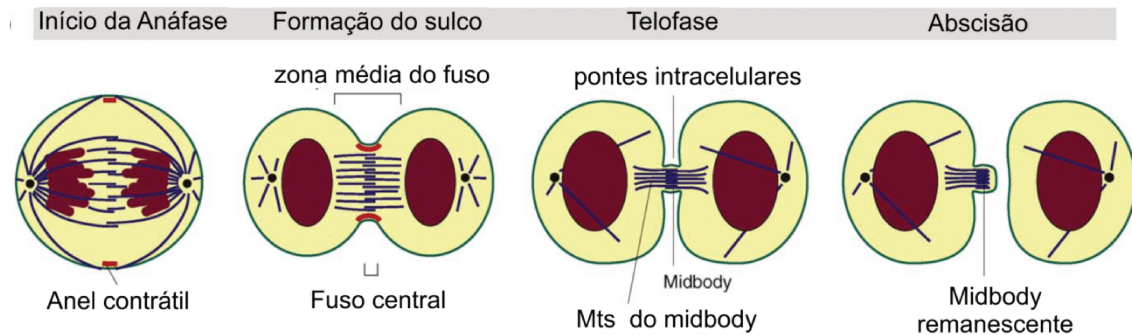


Figura 21: Citocinese e formação do *midbody*. Em animais, a citocinese se inicia com a formação do fuso central durante a anáfase. Será o fuso central e os ásteres mitóticos que determinarão a posição do sítio de clivagem por dirigir a localização e ativação de RHO-GTPases que irão promover a formação do anel contrátil de miosina-actina. Azul: microtúbulos. Preto, centrossomo e vermelho, anel contrátil (Steigemann e Gerlich, 2009).

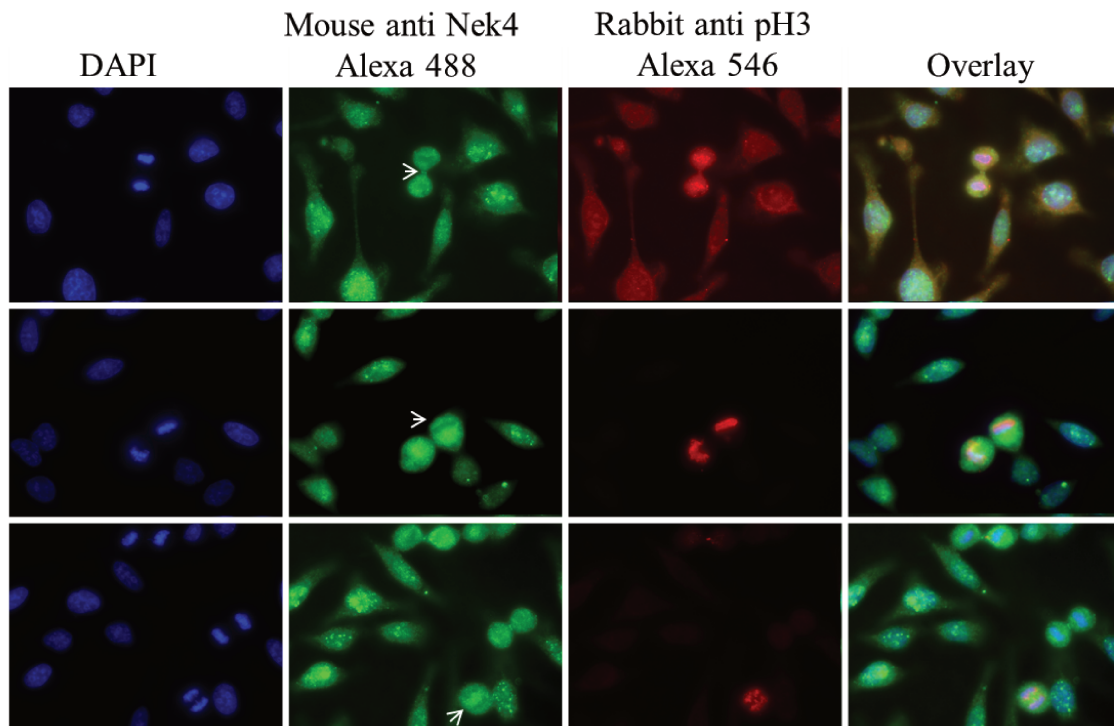


Figura 22: Localização da Nek4 endógena em células em divisão. Células HeLa foram fixadas com metanol gelado e submetidas à imunofluorescência indireta, com marcação do anticorpo anti-histona 3 fosforilada (anti pH3) e Nek4 (produzido em camundongo) endógena. A marcação da Nek4 é acentuada no *midbody* e fuso mitótico (setas). As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio não confocal. O DNA foi marcado com DAPI. Aumento de 600x.

4.3.1 Nek4 e mitose

Para aprofundar os estudos sobre a participação da Nek4 no processo mitótico e devido sua intensa marcação na região que une as duas células filhas, foram utilizados os anticorpos contra Eg5 ou KIF 11 (conhecido interator da Nek6 e importante para separação dos centrossomos (vide introdução)), e o anticorpo contra tubulina acetilada (modificação de tubulinas que está relacionada à estabilidade de microtúbulos) (Figura 23).

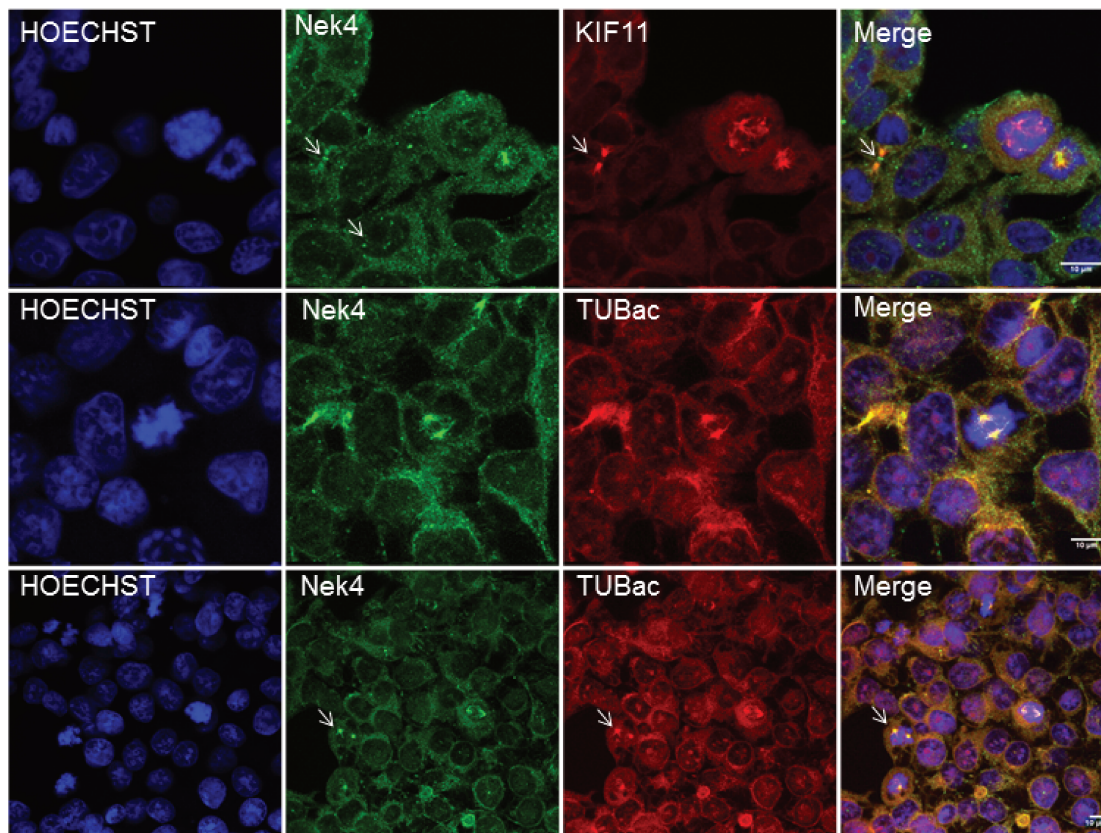


Figura 23: Colocalização da Nek4 endógena com a Tubulina acetilada e KIF11. Células HEK293 foram fixadas com metanol gelado e submetidas à imunofluorescência indireta. A marcação com tubulina acetilada, e KIF11 (Eg5) indica a presença da Nek4 no fuso mitótico, centrossomo e *midibody* (setas). Ainda é possível observar a marcação nuclear pontual (seta primeiro painel). Anticorpo contra Nek4 produzido em cabra. Microscopia confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546.

Pode-se observar (Figura 23 e 24) que a Nek4 colocaliza com a tubulina acetilada no centrossomo, pólos do fuso mitótico e fuso mitótico durante a metáfase. A localização centrossomal também é observada quando utilizamos o anticorpo anti tubulina gama (TUBG) (figura 24). Já a KIF 11 marca as pontes de separação entre as células na citocinese enquanto a Nek4 marca o *midbody* (Figura 23 e 24).

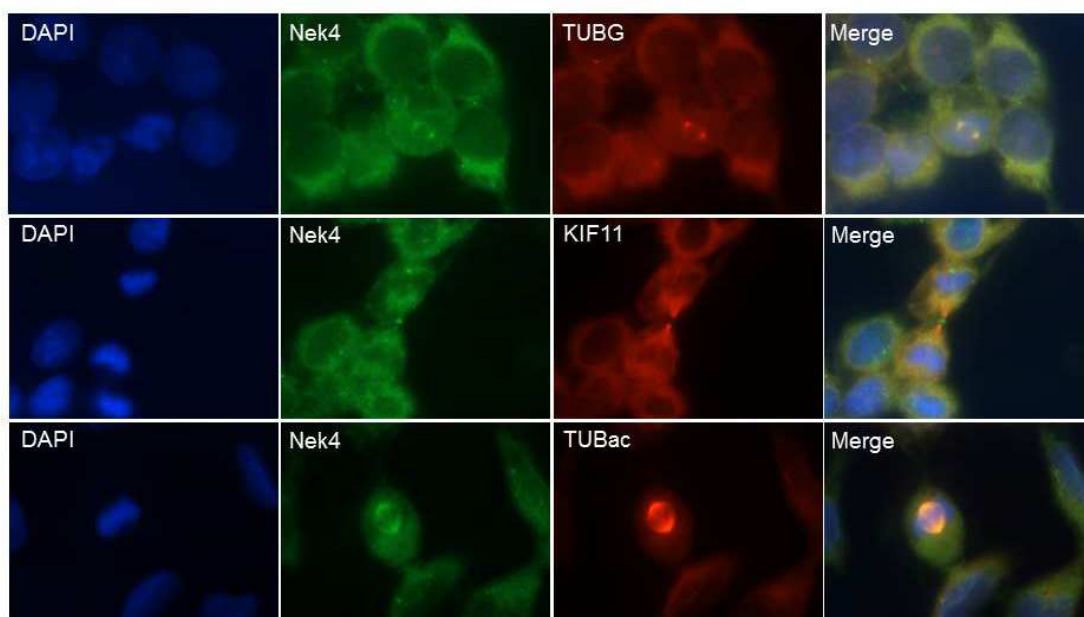


Figura 24: Nek4 localiza-se em diferentes estruturas relacionadas à divisão celular. Células HEK293T foram fixadas com metanol gelado e submetidas à imunofluorescência indireta. Nek4 (anticorpo produzido em cabra) endógena colocaliza com tubulina acetilada (TUBac) no fuso mitótico na metáfase, no *midibody* e no centróssomo (colocalização com TUBG). As imagens foram adquiridas em microscópio não confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Aumento de 1000x.

A superfamília de proteínas motoras kinesinas está relacionada com diversas funções celulares incluindo transporte intracelular, mitose e meiose, transdução de sinal e, principalmente dinâmica dos microtúbulos. As kinesinas são divididas em subfamílias, sendo que a KIF11 ou Eg5 pertence à subfamília KIF5 (Valentine e Gilbert, 2007). Várias kinesinas já foram implicadas na citocinese, como formação do anel contrátil e abscisão (Gruneberg *et al.*, 2006; Kurasawa *et al.*, 2004). Para a KIF11 é bem estabelecido o papel na separação dos centróssomos, e, embora não exista uma relação clara do seu papel na citocinese e *midbody*, nossos resultados indicam que esta pode ser importante também para a finalização da divisão celular.

Já foi descrita a relação da KIF11 com tubulinas e que a resposta ao tratamento quimioterápico pode variar conforme os níveis de expressão dessa proteína em tumores de pulmão de células não pequenas (NSCLC) (Saijo *et al.*, 2006, Stewart, 2010). No trabalho de Marcus e colaboradores (2005) foi observado que KIF11 é necessária para formação dos ásteres dos microtúbulos induzida por paclitaxel. Além disso, os autores levantam a hipótese de que alguma interação ainda desconhecida entre tubulina e KIF11 poderia ser

modificada por quimioterápicos como alcaloides da vinca. Os dados relacionando tubulinas, quinesinas e resistência ao tratamento quimioterápico, principalmente em células de câncer de pulmão, são muito relevantes para o estudo da Nek4, uma vez que esta já foi relacionada à homeostasia dos microtúbulos quando as células são submetidas a agentes quimioterápicos (Doles e Hemann, 2010). Na ausência de Nek4 as células são resistentes ao tratamento com taxol e sensíveis ao tratamento com vincristina, e, ainda mais interessante, a região onde está localizado o gene para Nek4 está frequentemente mutada em câncer de pulmão (Doles *et al.*, Hemann, 2010). Essas informações sugerem uma relação entre Nek4, KIF11 e tubulinas, onde Nek4 juntamente com KIF11 atua na polimerização dos microtúbulos e, dessa forma, para a atividade do taxol as duas devem estar ativas para estabilizar “permanentemente” os microtúbulos, atuando, mais especificamente sobre tubulina alfa. No caso da vincristina, é possível que a interação KIF11/Nek4/TUB seja comprometida e, a estabilidade do microtúbulos perdida, levando a morte celular.

4.4 Nek4 localiza-se em diferentes estruturas celulares

Devido ao padrão de marcação pontual e bem característico da Nek4 no núcleo da observado anteriormente, foram utilizados marcadores específicos para as sub estruturas nucleares: PML (Figura 25) e *speckles nucleares* (Figura 26).

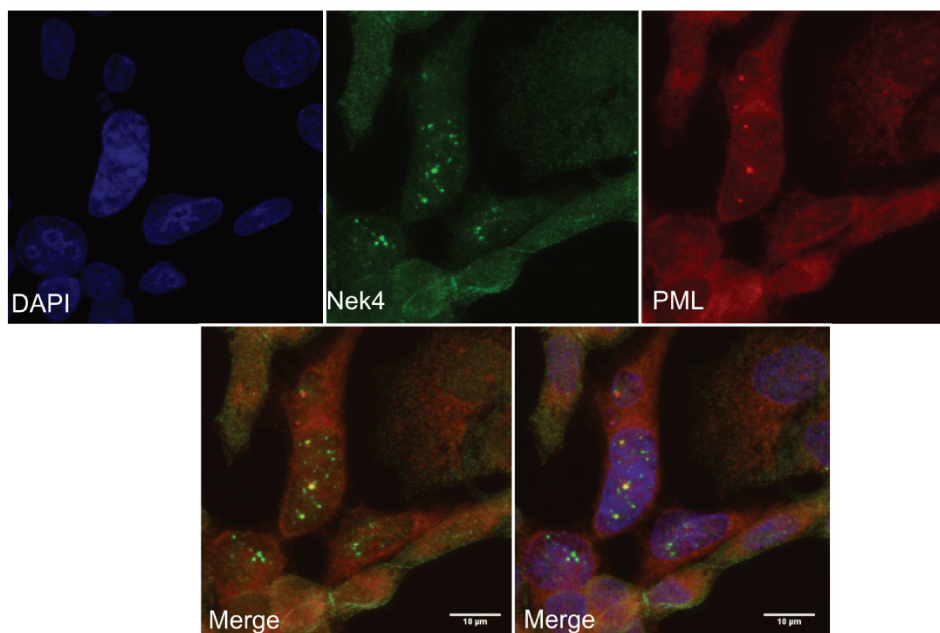


Figura 25: Localização subnuclear da Nek4 – corpos PML. Células HEK293 foram fixadas com metanol gelado e marcadas com o marcador de corpos PML e Nek4 (anticorpo produzido em cabra). Alguns pontos correspondentes à marcação da Nek4 nuclear colocalizam com a proteína PML, indicando que Nek4 pode estar presente nos corpos PMLs e também em outras estruturas nucleares. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Microscopia confocal.

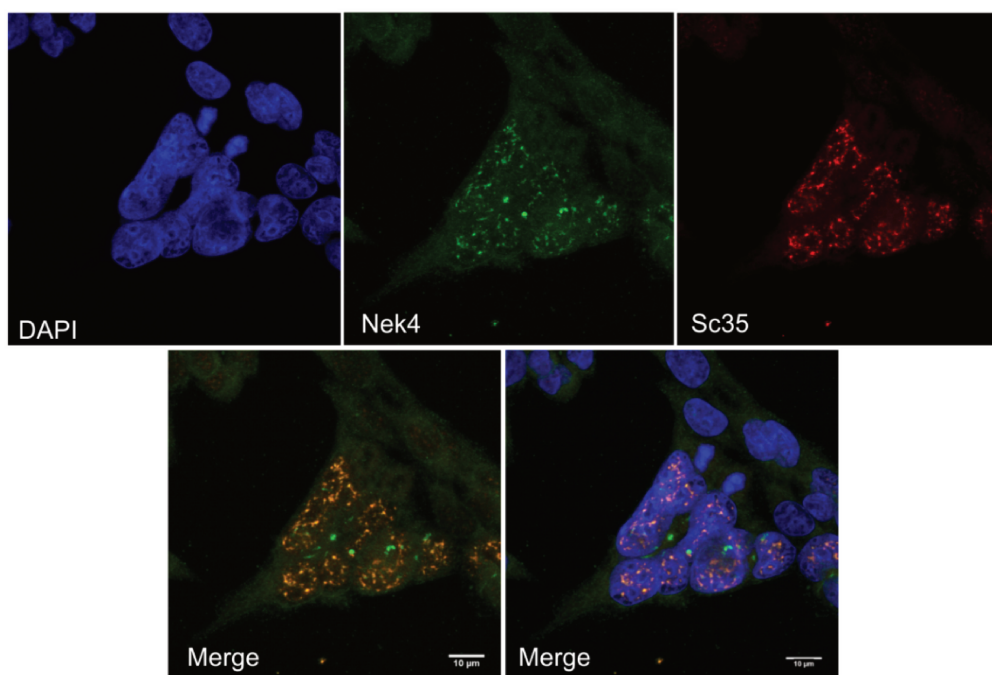


Figura 26: Localização subnuclear da Nek4 – *speckles* nucleares. Células HEK293 foram fixadas com metanol gelado e marcadas com o marcador de *speckle* nuclear, SC-35 e Nek4 (anticorpo produzido em cabra). As marcações pontuais da Nek4 colocalizam com a maioria das marcações correspondentes a *speckles* nucleares. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Microscopia confocal

Os corpos nucleares de proteína mielocítica (PML) foram considerados inicialmente apenas como espaço para armazenamento de proteínas mas, atualmente, tem sido implicados em diversas funções como reparo de DNA, regulação transcricional, senescência e apoptose. Essas estruturas, com cerca de 0,1 – 1,0 µm de diâmetro e cuja presença pode ser de 10-30 por núcleo, são basicamente formadas pela proteína PML e dois outros componentes: Sp100 e Daxx. A PML encontra-se difusa no núcleo até que algum estímulo induza sua dimerização, nucleação, sumoilação e por fim a formação da esfera que recrutará outras proteínas. Após o estímulo, PMLs são fosforiladas por várias quinases ativadas por dano ao DNA e então ocorre um aumento do número dos corpos de PMLs, que sofrem uma fissão, gerando vários micro corpos (Lallemant-Breitenbach e de Thé, 2010).

A relação dos corpos PML com o reparo de DNA foi estabelecida a partir de resultados de Deltair e colaboradores (2006) que demonstraram aumento no número dessas estruturas após dano ao DNA induzido por IR. Células irradiadas com baixas doses de IR retornam ao número normal de PMLs 24h após a exposição, enquanto que células submetidas a altas doses de radiação (5Gy) não apresentam o mesmo resultado. Além disso, PML colocaliza com várias proteínas envolvidas com o reparo após o dano, como γ -H2AX, Nbs1, RPA e KAP-1 (Kepkay *et al.*, 2011). Segundo um dos preditores utilizados, a Nek4 apresentaria localização nos corpos PML. Além disso, através dos ensaios de imunofluorescência foi possível observar colocalização parcial da Nek4 com a proteína PML (Figura 25), sugerindo que a Nek4 pode se concentrar nesses corpos nucleares em momentos muito específicos, por exemplo, após algum estímulo que danifique o DNA.

O termo *nuclear speckle* (do inglês, manchas nucleares) se refere a estruturas localizadas no núcleo com pouco ou nenhum DNA. Através de experimentos de imunofluorescência, vários fatores de *splicing* como ribonucleoproteínas (snRPNs) e os fatores de *splicing* (proteínas SR), têm sido identificados nos *speckles* nucleares. Além dessas proteínas, o fator de inibição da tradução EIF4E também foi encontrado no *speckle*. Estudos com células vivas apresentaram que durante o processo de transcrição ou processamento de RNA, os fatores de *splicing* abandonam os *speckles* e quando esses processos são inibidos ocorre um aumento no tamanho dos *speckles* (para revisão Lamond e Spector, 2003). Nós pudemos observar completa colocalização da Nek4 com o marcador de *speckle* nuclear SC-35 tanto em células HEK293 (Figura 26) quanto em HeLa (Figura

27). Este resultado foi surpreendente, uma vez que não havia sido reportado até o momento a localização de uma Nek nestes compartimentos. Ainda, devido à relação dos *speckles* nucleares com processamento de RNAm, isso sugere que a Nek4 poderia estar envolvida com esse processo.

Como os preditores também faziam referência à localização mitocondrial da Nek4, foi realizada a co-marcação com VDAC, um marcador mitocondrial e, confirmou-se então que a Nek4 apresenta uma forte marcação citoplasmática em regiões onde há também marcação mitocondrial (Figura 28).

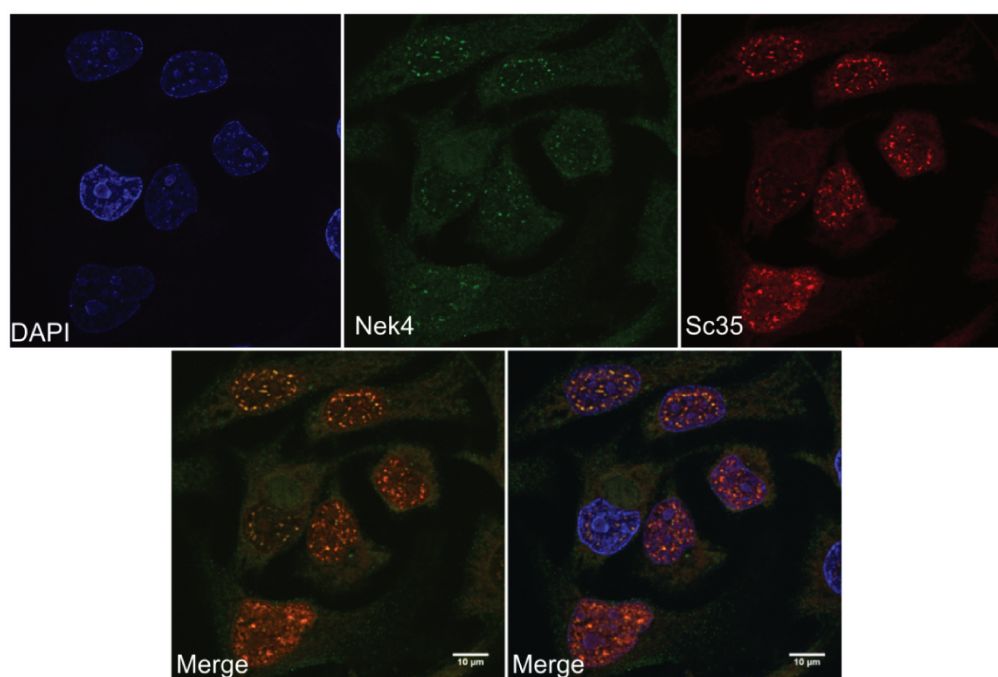


Figura 27: Localização subnuclear da Nek4 em HeLa. Células HeLa foram fixadas com metanol gelado e marcadas com o marcador de *speckle* nuclear, SC-35 e Nek4 (anticorpo produzido em cabra). Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Aumento de 1000x

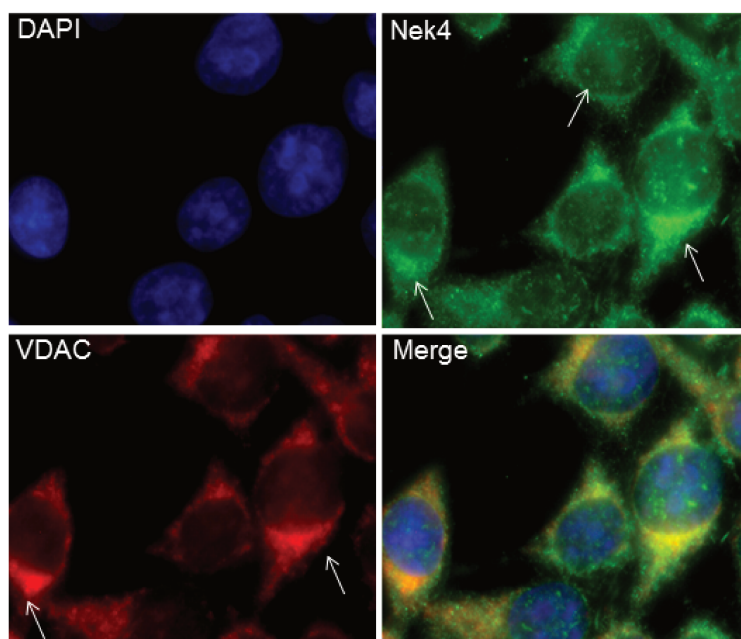


Figura 28: Localização mitocondrial da Nek4. Células HEK293 foram submetidas à imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos anti –Nek4 (produzido em cabra) e anti –VDAC, um marcador mitocondrial. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Microscopia não confocal. Aumento de 1000x.

Para confirmar esses resultados, que apontam para uma distribuição da Nek4 entre vários compartimentos citosólicos, foi realizado ainda, o fracionamento celular, para separar proteínas citosólicas, mitocondriais e nucleares. Os resultados desse fracionamento se mostraram muito interessantes, uma vez que quando se observa a expressão da proteína endógena, uma grande quantidade de Nek4 é encontrada no citosol e uma pequena quantidade nas frações mitocondriais e nucleares (Primeira linha de A e B na figura 29). Faz-se necessário comentar que o GAPDH, marcador citosólico, apareceu também na fração mitocondrial, sugerindo que pode ter ocorrido uma pequena contaminação da fração mitocondrial com a citosólica durante o fracionamento. Contudo, quando se observa o fracionamento da célula FlpIn, expressando o vetor vazio, Flag Ø, e, portanto avalia-se a expressão da Nek4 endógena, novamente há marcação para essa proteína nas frações mitocondriais e nucleares e, embora também tenha ocorrido contaminação da fração citosólica, essa é bem menor, e, a quantidade de proteína nas frações mitocondriais e nucleares é consideravelmente maior.

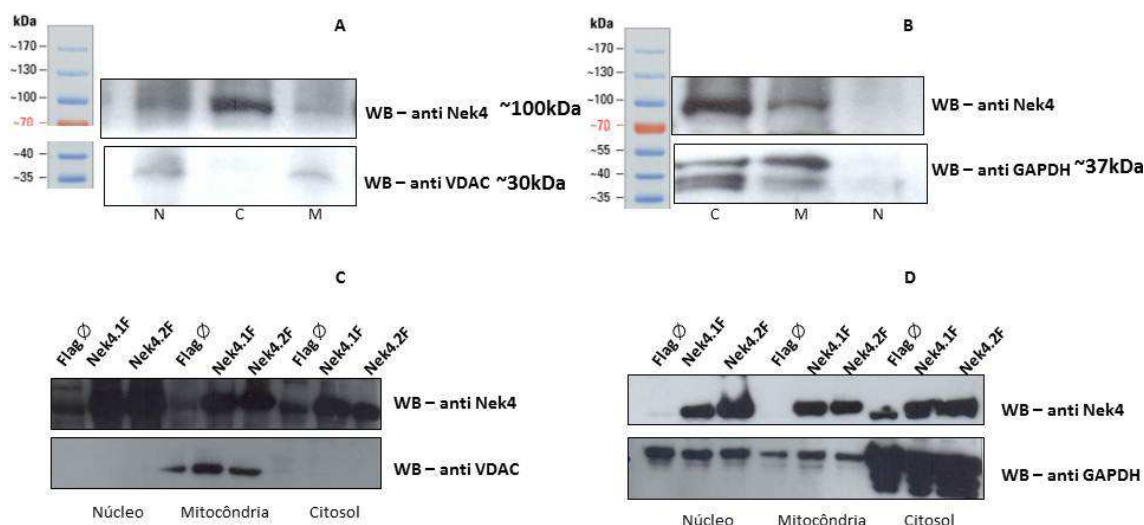


Figura 29: Fracionamento da HEK293T e HEK293 FlpIn. Foram separadas as frações citosólica, nuclear e mitocondrial de células HEK293T (A e B) e HEK293 FlpIn, expressando as isoformas 1 e 2 da Nek4 (Nek4.1F e Nek4.2F) ou apenas o peptídeo Flag (Flag vazio) (C e D) e estas após quantificação de proteína total foram submetidas a separação eletroforética, seguida de *western blotting* com os anticorpos contra Nek4 (anticorpo produzido em cabra), VDAC e GAPDH, sendo o primeiro marcador mitocondrial e o segundo marcador citosólico. Foram aplicadas quantidades equivalentes de proteína (20 µg). C: citosol, M: mitocôndria e N: núcleo.

Curiosamente, quando avaliamos a localização celular das células HEK293 FlpIn expressando as isoformas da Nek4, as duas isoformas distribuem-se igualmente entre as frações. Este resultado é surpreendente porque acreditávamos que a ausência de 46 resíduos no domínio regulatório da isoforma 2, poderia implicar, entre outras coisas, em uma localização celular diferente. Isso já foi relatado para Nek2, que apresenta 3 isoformas e estas apresentam localização celular diferente devido a diferenças na sequência. A Nek2A, a maior isoforma e a sequência considerada canônica, apresenta dois sítios de localização nuclear separados por 18aa e pode ser encontrada tanto no citosol, quanto no núcleo. Já a Nek2C, perde os resíduos dessa região de 18aa, deixando o *linker* mais curto, com apenas 10aa separando as sequências de localização nuclear e assim, com as duas NLS mais próximas, o seu reconhecimento é favorecido. Outra diferença na Nek2C é que ela perde uma sequência de exportação nuclear e por isso ela é predominantemente nuclear. Já a Nek2B perde uma das sequências de localização nuclear e, é encontrada somente no citosol (Wu *et al.*, 2007).

Quando, através do uso de preditores, avaliamos a presença de NLS e NES na sequência da Nek4, observamos que essa proteína apresenta um NLS, mas esse não é perdido na isoforma 2. Diante disso, a localização celular similar dessas duas isoformas, em condições celulares normais, é justificada e, sugere que a diferença no domínio regulatório está relacionada apenas com diferenças de interação e não localização.

4.5 Silenciamento da Nek4

Uma ferramenta importante para avaliar a função de uma proteína é depletar sua expressão e observar as consequências funcionais. Para silenciar a Nek4 foram utilizados dois sistemas, o silenciamento transiente e o estável através do sistema lentiviral. No primeiro caso, realizou-se a transfecção do siRNA e avaliou-se a expressão da proteína 48 e 72h após a transfecção, com duas diferentes concentrações do siRNA. Através do ensaio de *western blotting*, que apresenta o nível de expressão da proteína, observou-se que 72h após a transfecção com o siRNA há uma menor expressão da proteína (70% de silenciamento) com 10nM de siRNA para Nek4 (Figura 30 A). Devido à baixa reprodutibilidade (uma vez que essa é dependente das condições de transfecção) essa ferramenta foi utilizada apenas para realização dos experimentos para determinar a viabilidade celular e quantificação de ROS. Durante o Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), devido à disponibilidade de bibliotecas de shRNAs, procurou-se obter células estavelmente silenciadas utilizando-se o sistema lentiviral. Foram utilizadas, diferente do sistema transiente, três sequências que alinhavam em diferentes regiões do RNAm da Nek4 shRNA1, shRNA2 e shRNA3. Como pode ser observado na figura 30 B, o shRNA 2 (1697) apresentou a maior redução no nível de expressão da proteína (90%) em relação ao controle (pLKO *scramble*). Ainda não foi observado completo silenciamento, mas estas células também foram utilizadas para quantificação de ROS.

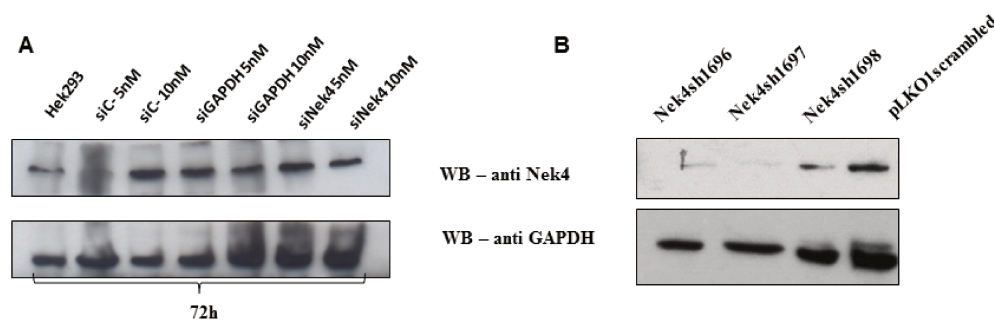


Figura 30: Silenciamento da Nek4. A Nek4 foi silenciada utilizando-se o sistema transiente de silenciamento (A) e o sistema lentiviral (B). No sistema transiente, foram utilizadas as concentrações de 5 nM e 10 nM de siRNA para o controle negativo (SiC-), controle positivo (siGHAPDH), e para a Nek4 (siNek4) para transfecção de células HEK293T e a expressão da proteína foi avaliada 72h após a transfecção. No sistema lentiviral células HeLa foram infectadas com shRNA para reconhecimento de 3 diferentes regiões do RNAm da Nek4. A expressão da Nek4 foi avaliada e, após normalização com os níveis de GAPDH, comparada com o controle (pLKO *scrambled*).

4.6 Estabelecimento de linhagens estáveis para expressão induzível da Nek4

Utilizando-se o sistema FlpIn, com a colaboração do aluno de mestrado, Deivid Lucas Migueleti, conseguiu-se obter clones para a expressão das isoformas 1 e 2 da Nek4 (Figura 31).

O estabelecimento das linhagens que expressam as proteínas de interesse é uma tarefa difícil e foram necessárias diferentes estratégias de transfecção e seleção de vários clones. Na figura 31 é possível observar que há uma expressão mínima da Nek4 fusionada ao Flag nas células que não foram expostas a tetraciclina, o que pode ser atribuído à presença de baixas concentrações desse antibiótico no soro, e que já podem desencadear a expressão. Contudo, nas células que foram expostas a tetraciclina por 48h a expressão da Nek4 é nitidamente maior. Foram identificados dois clones positivos para expressão da isoforma 1 e um clone para a isoforma 2 da Nek4. Infelizmente não foi possível identificar nenhum clone que expressasse a isoforma 3 da Nek4, nos diferentes métodos de transfecção utilizados (dados não apresentados). Esse fato pode ser explicado pela perda de uma região importante no domínio quinase dessa isoforma. Essa região poderia ser relacionada, por exemplo, a estabilidade da proteína e, dessa forma, a isoforma 3 poderia estar sendo degradada logo após sua produção nessas células.

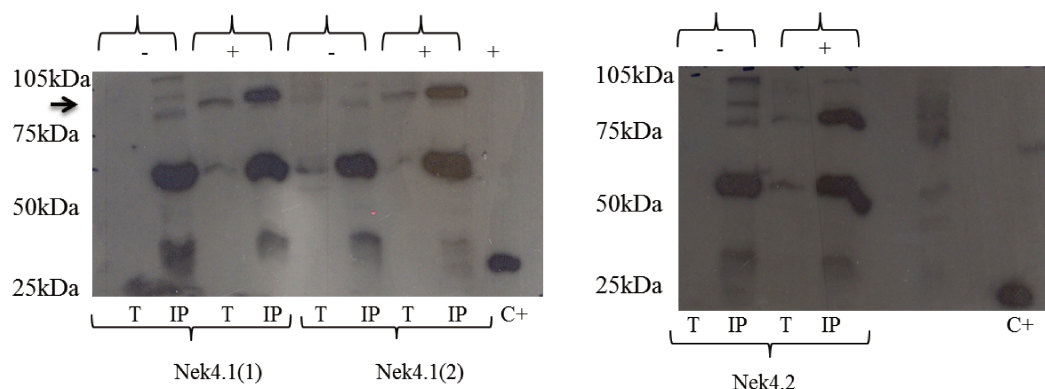


Figura 31: Estabelecimento das linhagens estáveis para expressão das Neks 4.1 e 4.2. Células HEK293 FlpIn foram transfectadas com as sequências codificantes para as isoformas 1 (Nek4.1) e 2 (Nek4.2) da Nek4 fusionadas ao FLAG. A expressão da proteína foi induzida com tetraciclina e, após 48h as células foram coletadas e submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-Flag. Após foi realizado *western blotting* com anticorpo anti-Flag. T: extrato total. IP imunoprecipitado. (-) sem indução da expressão com tetraciclina. (+) com tetraciclina. A seta aponta a banda equivalente ao MW da Nek4.

4.6.1 IP/MS

Uma vez estabelecidas as linhagens estáveis, foi realizada IP em grande escala a fim de identificar os parceiros de interação da Nek4 (Figura 32). O sistema de expressão estável (FlpIn) apresenta como aspecto positivo uma expressão menor, mais parecida com a endógena, de todas as células simultaneamente, quando comparado ao sistema de expressão transiente e, dessa forma, previne a identificação de interações falso positivas induzidas pela superexpressão.

A partir desse experimento foram identificadas 474 proteínas como possíveis parceiros de interação exclusivos para a isoforma 1, número 3 vezes maior do que o encontrado para a isoforma 2 (150 proteínas). Dentre as proteínas que foram identificadas no experimento para as duas isoformas, foram encontradas 102 proteínas (Tabela 5, anexo e Figura 33). Esse resultado sugere que a Nek4.1 pode apresentar novas interações mediando então novas funções em relação a isoforma 2 e, ainda, que essas funções foram provavelmente adquiridas por conta da inserção Alu.

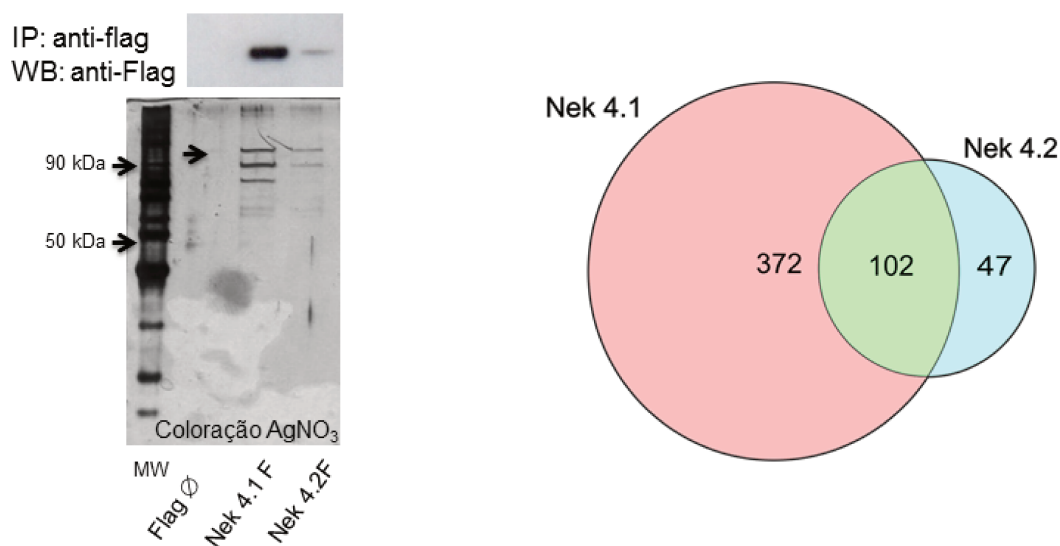


Figura 32: Imunoprecipitação da Nek4 e seus parceiros de interação. Após imunoprecipitação as amostras contendo a Nek4 e seus parceiros de identificação foram resolvidas em SDS-PAGE e o gel foi corado com nitrato de prata para visualização da expressão da Nek4 e da quantidade de proteínas presentes nas amostras das isoformas da Nek4 em relação ao controle (Flag Ø). Ainda, o *Western blotting* confirma a presença da Nek4 nas amostras. Após a IP/MS foram identificadas proteínas únicas para a isoforma 1, únicas para a isoforma 2 e comum para as duas proteínas, como apresentado no diagrama de Venn.

A partir dos dados de identificação por espectrometria de massas após a imunoprecipitação, foi possível estabelecer uma rede de interações para Nek4 e pontuar os principais processos biológicos com os quais ela poderia estar envolvida (Figura 33).

A isoforma 1 apresenta 14 processos biológicos enriquecidos enquanto a isoforma 2, por nós amplificada, apresenta apenas 9. Dentre esses, *splicing* de RNAm, apoptose e ponto de checagem do ciclo celular também foram encontrados para a isoforma 1. A diferença entre as duas proteínas se concentra em funções como reparo de DNA, proliferação celular (com proteínas identificadas no mínimo em dois experimentos), função ciliar (anotação manual), tradução, adesão celular e organização dos microtúbulos do citoesqueleto.

Algumas dessas funções (reparo do DNA, função ciliar, organização dos microtúbulos) já foram atribuídas a outras Neks e à própria Nek4, sugerindo que essa isoforma pode ter adquirido funções novas para a Nek4 que já são desempenhadas por outros membros da família Nek. Surpreendentemente, as funções relacionadas ao processamento de RNAm, nunca antes descritas para algum membro da família Nek, foram encontrados para as duas isoformas, sendo consideravelmente enriquecido na análise de

ambas. Este resultado corrobora a localização nos *speckles* nucleares observados para Nek4 e apresentados anteriormente.

Como validação do experimento foram identificadas as proteínas, Nek4, confirmando que a expressão e a IP funcionaram, XRCC6 ou Ku70, DNA-PKcs e a proteína Fanton ou RPGRIP1L, parceiros de interação da Nek4 já descritos na literatura. Contudo, essas proteínas não foram encontradas em todos os experimentos e ainda foram identificados poucos peptídeos únicos para elas, atribuindo então um baixo escore para as mesmas. Devido a essa constatação e, suspeitando que uma análise mais estrigente nos levaria a perda de interações reais, nós incluímos na análise proteínas que apareceram apenas em uma das réplicas mas não no controle. A frequência de identificação para cada proteína é apresentada na tabela 5 (anexo).

Para confirmar as interações, algumas proteínas foram selecionadas e foi realizado *western blotting* com o eluato da imunoprecipitação utilizando anticorpo específico contra a proteína identificada (Figura 34). Foi realizado *western blotting* contra Eg5, que, embora tenha sido encontrada no controle negativo (e por isso não conste na tabela 5 e rede de interação – Figura 33) é um parceiro de interação conhecido para Nek6 e nossos experimentos prévios de imunofluorescência apontavam para uma relação com a Nek4. Ainda foram selecionadas SERBP1, 14-3-3 ϵ , Ku70, TRAP1 e PCNA. Surpreendentemente não foi possível identificar nenhuma das proteínas no imunoprecipitado das isoformas, inclusive a Ku70, já descrita na literatura. A única proteína identificada no imunoprecipitado foi a Eg5, mas, como interage inespecificamente com a resina, apareceu também no controle negativo. A Eg5 aparece como contaminante comum em um estudo descrevendo os contaminantes mais comumente encontrados em técnicas como essa (Chen e Gingras, 2007) e, dessa forma, é difícil excluir a possibilidade de interação real, uma vez que nossos resultados de imunofluorescência indicavam colocalização em algumas fases da divisão celular.

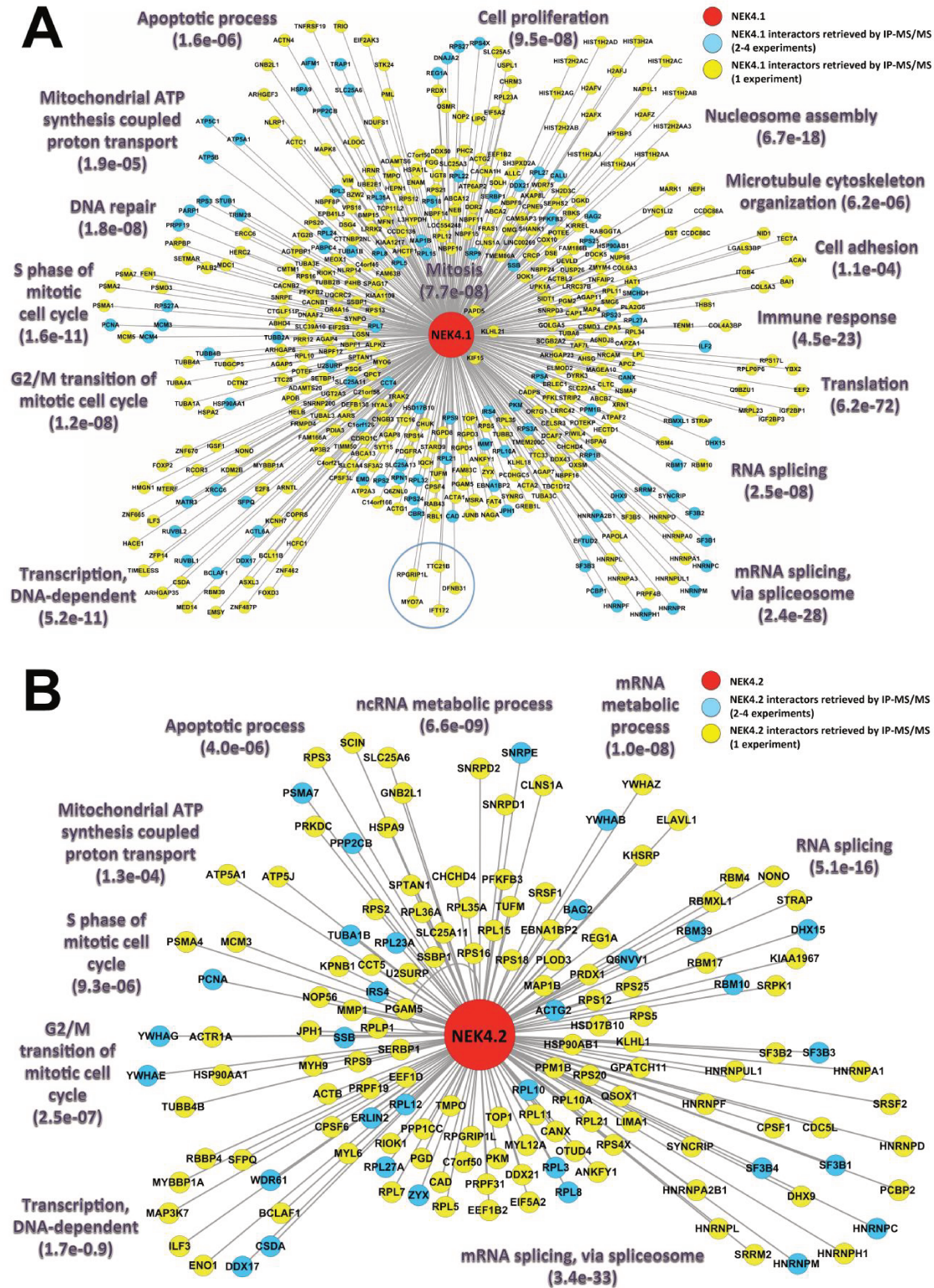


Figura 33: Rede de interação de proteínas identificadas por IP/MS para as isoformas Nek4.1 e Nek4.2. As interações mais relevantes nos processos biológicos do GO são apresentadas nas redes de interações da Nek4.1 (A) e Nek4.2 (B). As proteínas envolvidas em cada processo foram agrupadas em círculos. Esses agrupamentos foram formados quando o processo biológico apresentava, no mínimo, 2 proteínas. As

proteínas envolvidas em mais de um processo biológico foram agrupadas naquele que apresentava o melhor *p-value*. Os processos biológicos mais específicos são apresentados somente para as proteínas com especificações melhor definidas no banco de dados. Os círculos vermelhos correspondem às isoformas da Nek4, os círculos em ciano correspondem a proteínas identificadas em mais de 2 réplicas biológicas (2 de 4 experimentos) e, em amarelo estão representadas as proteínas que foram identificadas em apenas uma réplica biológica. Na rede de interações da Nek4.1 (A), TRAP1 foi manualmente agrupada em “Apoptose” de acordo com Gesualdi e col. (2007) e, 5 proteínas (DFNB31, IFT172, MYO7A, RPGRIP1L e TTC21B) envolvidas em diferentes funções ciliares foram agrupadas no círculo azul, de acordo com Yang *et al.*, 2010; Halbritter *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 1997; Coene *et al.*, 2011; Liu, Zhang e Pierce, 2010. As redes de interações proteína-proteína foram construídas utilizando-se a plataforma IIS e visualizadas através do programa Cytoscape.

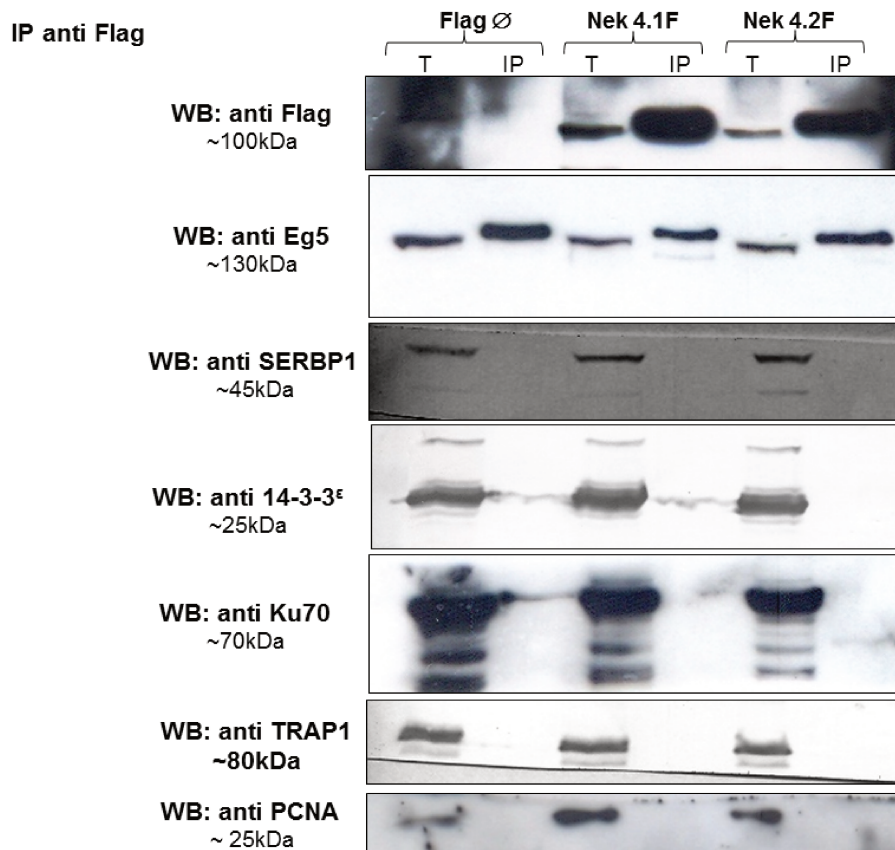


Figura 34: Verificação da presença das proteínas identificadas após espectrometria de massas nos imunoprecipitados. Extratos de HEK293 expressando as isoformas de Nek4 fusionadas a flag (Nek4.1 F e Nek4.2 F) foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-flag e, após a eluição do imunoprecipitado estas foram submetidas a *western blotting* e identificação com anticorpo específico. T: extrato total. IP imunoprecipitado.

Este resultado pode indicar que a interação com esses parceiros é muito pontual e específica. A Nek4 é uma quinase e, dessa forma, espera-se que suas interações sejam transientes e fracas, mas, apesar disso, esperar-se-ia que uma vez que foram identificadas pelo espectrômetro de massas seriam também identificadas pelo *western blotting*. Porém, é

necessário ressaltar que embora a imunoprecipitação seja uma forma de concentrar as proteínas, o espectrômetro de massas é muito mais sensível do que o *western blotting* e, se as interações entre a Nek4 e essas proteínas ocorram em algumas células e em momentos específicos, estas proteínas não serão tão abundantes no eluato para detecção no *western blotting*.

Para melhor contextualizar as interações encontradas e as possíveis funções biológicas, os próximos resultados serão distribuídos em quatro sessões: DDR, Função ciliar, Apoptose e Processamento de RNAm.

4.7 Nek4 e DDR

Foi descrita a importância da Nek4 para a resposta a quebras de fita dupla causada por agentes como etoposídeo e radiação ionizante, mas não a agentes *crosslinker* como a Mitomicina C (Nguyen *et al.*, 2012). Seria a Nek4 responsiva a danos de DNA causados por estímulos específicos? Na tentativa de melhor compreender o papel da Nek4 nesse contexto, um dos objetivos do Projeto de Pesquisa (BEPE) realizado durante o doutorado no IRB - Barcelona, sob orientação do Prof. Joan Roig, foi observar a resposta da Nek4 a diferentes tipos de agentes causadores de dano. Os agentes escolhidos foram radiação ionizante, cujos danos causados são comumente reparados por NHEJ, radiação ultravioleta que causa danos classicamente reparados por NER ou HR e peróxido de hidrogênio, reparados por BER ou NHEJ. Para testar o sistema, inicialmente irradiamos as células com 5Gy de radiação ionizante (IR) e, avaliamos o padrão de expressão da Nek4 após o dano em diferentes tempos de recuperação. As figuras 35 e 36 apresentam que, como esperado, a radiação causou quebra de fita dupla (ativação de γ H2AX) e parada no ciclo celular (expressão de CENP-F e citometria).

Células não sincronizadas, em crescimento exponencial encontram-se predominantemente em G0-G1, contudo, após IR as células que entram em mitose são impedidas de progredir no ciclo celular e são mantidas em G2/M. Pode-se observar que 6 horas após a irradiação a maioria da população se encontra em G2/M e, nesse momento, pode-se também observar maior marcação da proteína CENP-F. A CENP-F é um marcador de divisão celular, pois se acumula nos cinetocoros em prófase e permanece aí até a

anáfase, quando migra para a zona média do fuso. O reparo do DNA pode levar de alguns minutos até algumas horas, dependendo da extensão da lesão. Como pode se observar, após 5Gy de irradiação, o dano provocado é moderado, sendo que 24h após a exposição à radiação as células se recuperam e o perfil da população tende a se normalizar.

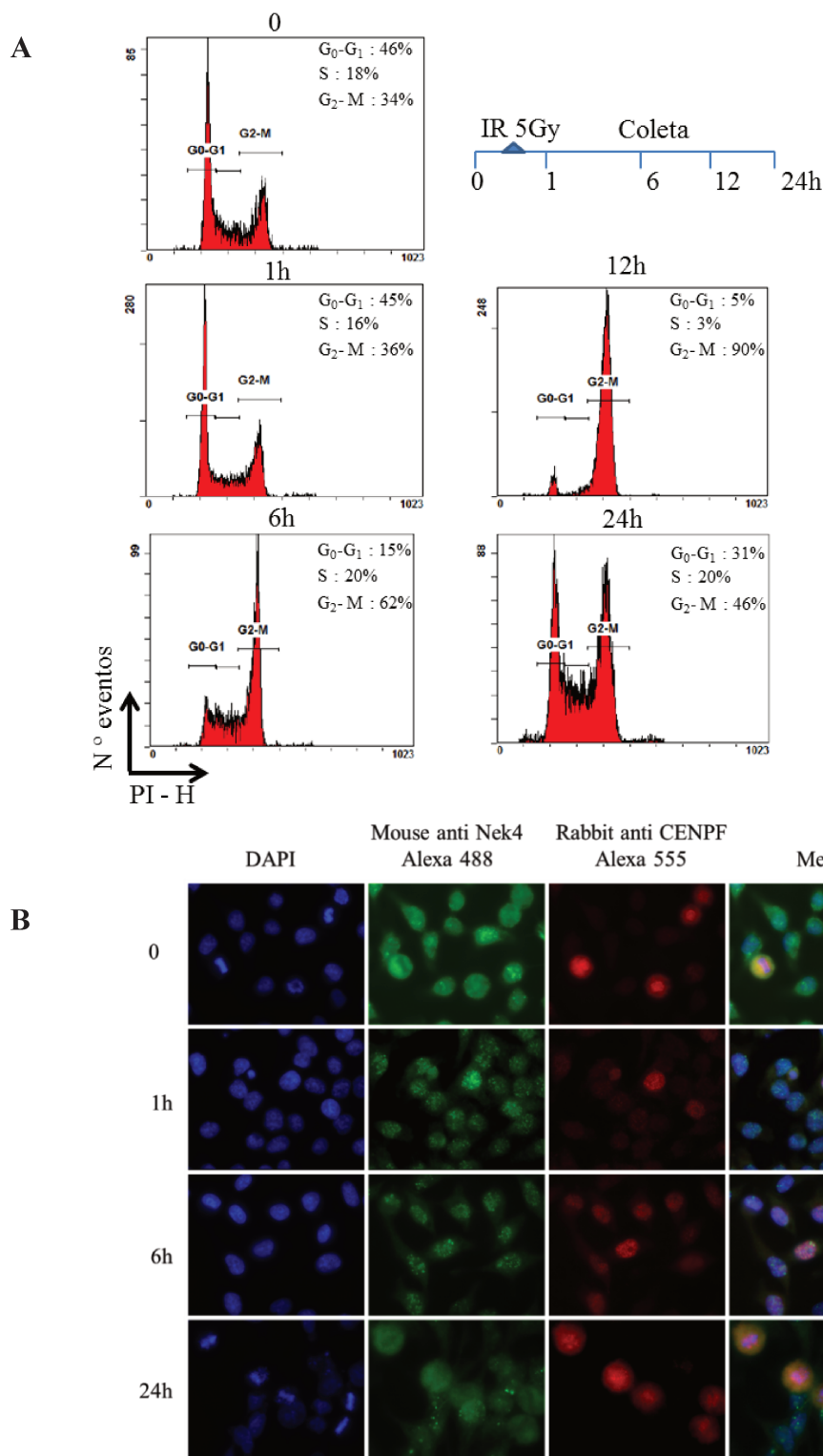


Figura 35: Perfil da população celular após IR. Células HeLa foram submetidas ou não (0) a 5Gy de IR e foram coletadas 1, 6, 12 e 24 horas após a irradiação. As células foram submetidas à análise por citometria de fluxo (A), utilizando-se o marcador iodeto de propídeo (PI) para marcar o conteúdo nuclear, ou foram fixadas com metanol gelado e submetidas à imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos anti-Nek4 e anti-CENPF (B). Os dados de citometria de fluxo apresentam que após a irradiação ocorre parada no ciclo celular

com acúmulo de células em G2/M (6 e 12 h após a indução do dano). O acúmulo de células em divisão celular é também demonstrado pelo aumento de células marcadas com CENPF (B). Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546. Aumento de 600x em microscópio não confocal.

A histona H2AX, uma das variantes da histona H2A do nucleossomo, é fosforilada na serina 139 em resposta quebras de fita dupla no DNA. Como a H2AX fosforilada (γ -H2AX) é um sensor de quebras de fita dupla, é geralmente utilizada como marcador desse tipo de dano. Após a exposição à radiação ionizante ocorre a formação de focos induzidos por irradiação (IRIF). Nesses focos são concentradas, próximas às lesões de DNA, proteínas importantes para o reparo (Caleste *et al.*, 2003). Pode ser observado na figura 36 que 1h após a irradiação a fosforilação de H2AX no núcleo das células irradiadas já ocorreu. Curiosamente, a marcação da Nek4 também é aumentada no núcleo, aparentemente no mesmo lugar da γ H2AX. Seis horas após a irradiação, os níveis de γ H2AX diminuem, assim como a forte expressão da Nek4 no núcleo.

Nguyen e colaboradores (2012) demonstraram que em células depletadas da Nek4, após tratamento com etoposídeo, a ativação da H2AX é menor quando comparado às células nas quais a Nek4 está presente. Ainda, como a Nek4 interage com DNA-PKcs, uma quinase que fosforila a H2AX, a Nek4 poderia estar envolvida na resposta inicial ao dano. Como a Nek4 interage também com Ku70 e Ku80 o recrutamento das proteínas para o foco do dano e então ativação das proteínas necessárias para o reparo poderia estar comprometido. Esse resultado indica que após dano ao DNA induzido por IR a localização da Nek4 no núcleo é alterada e, parece ficar mais concentrada nos focos de dano.

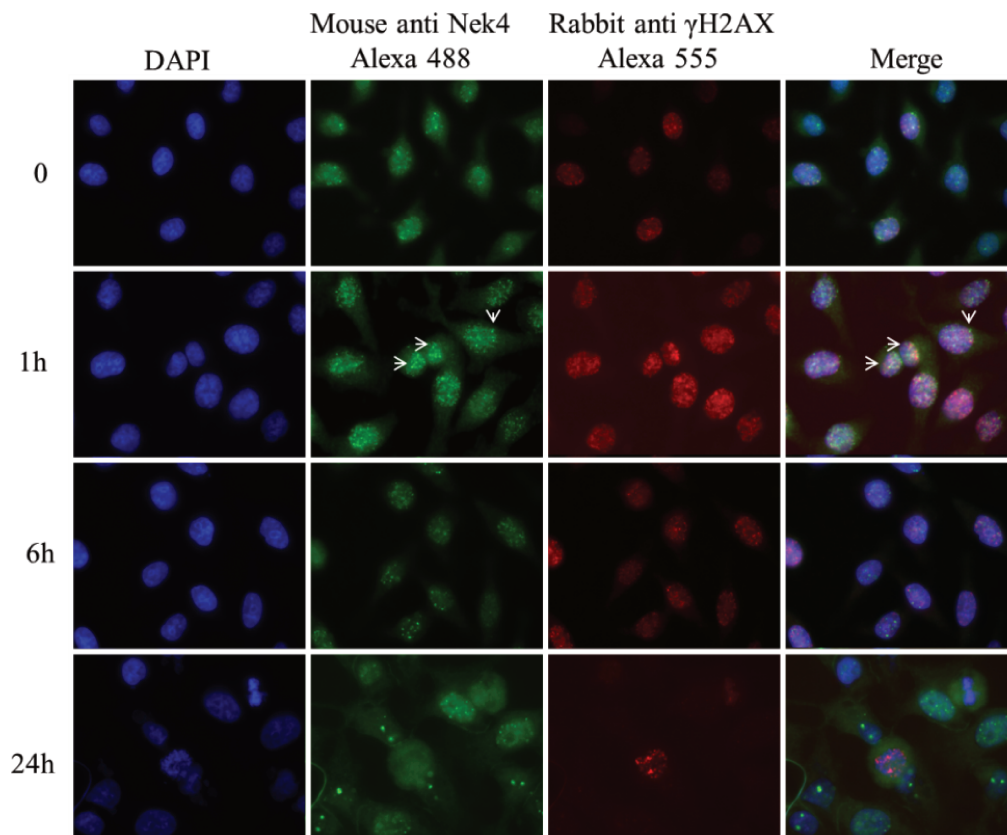


Figura 36: Marcação da Nek4 e γ H2AX após IR. Células HeLa foram irradiadas com 5Gy e foram submetidas à imunofluorescência indireta com os anticorpos contra Nek4 e γ H2AX endógenas. São apresentadas as células não irradiadas (0) e as fixadas 1, 6 e 24 h após a irradiação. As setas indicam marcações coincidentes para Nek4 e γ H2AX 1 h após a irradiação. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Aumento de 600x.

Após verificar que a Nek4 respondia a IR, foram utilizados então outros estímulos, UV e peróxido de hidrogênio. Avaliamos então a ativação da H2AX e, marcamos também a mitocôndria com o marcador Tom20, a fim de verificar se esses estímulos poderiam induzir a translocação da Nek4 para mitocôndria.

Após exposição à UVC, ocorre ativação de H2AX assim como após IR ou peróxido de hidrogênio, contudo, o padrão de distribuição dos focos é diferente. Enquanto os estímulos H_2O_2 e IR induzem uma marcação mais pontual para γ H2AX e todas as células apresentam marcação, em células expostas a UVC a ativação da γ H2AX é mais acentuada, mas também mais difusa pelo núcleo e nem todas as células são marcadas (Figura 37).

A marcação da Nek4, aparentemente, colocaliza com γ H2AX em células expostas a radiação ionizante e H_2O_2 , mas essa colocalização é parcial. Em células irradiadas com UVC a forte marcação da γ H2AX não colocaliza com a marcação mais acentuada para Nek4, sugerindo que Nek4 também participa da resposta ao DNA danificado após a exposição a UV, mas, provavelmente de forma diferente e em tempos diferentes (Figura 37).

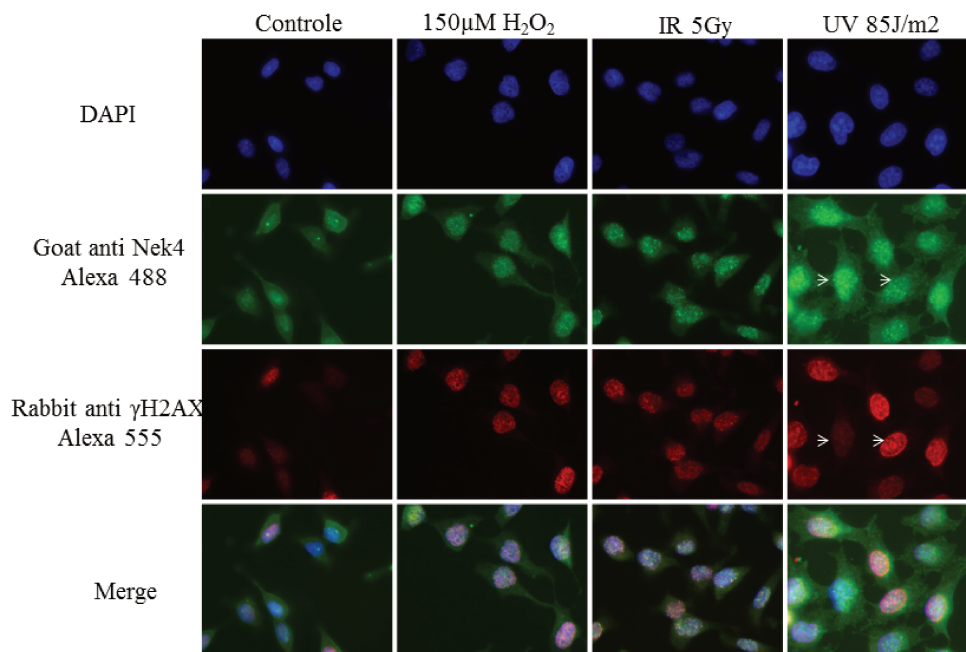


Figura 37: Marcação da Nek4 e γ H2AX após estímulo com diferentes agentes. Células HeLa foram submetidas a tratamento com H_2O_2 por 1h, 5Gy de IR ou 85J/m² de UV e, 1 h após o estímulo as células foram fixadas e avaliadas quanto à expressão de Nek4 e γ H2AX. Todos os estímulos levam a ativação da H2AX, inclusive UV (setas) e a marcação nuclear da Nek4 (anticorpo produzido em cabra) também é mais acentuada após os estímulos. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Aumento de 600x.

Como a ativação da H2AX é geralmente associada à via de reparo NHEJ é curioso a observação de uma ativação intensa dessa proteína após a irradiação UVC (Figure 37), uma vez que este estímulo não induz DSBs diretamente. As lesões primárias induzidas por UV são os dímeros de pirimidina que são, inicialmente, reparados por NER. A via de reparo NER envolve etapas sequenciais de excisão dos segmentos do DNA danificado, síntese de uma nova fita de DNA e finalmente a ligação da nova fita a fita parental (Friedberg *et al.*, 2006). Então, acredita-se que quando são formados os dímeros de pirimidina a forquilha de

replicação é interrompida e durante o reparo são originados *gaps* e intermediários que ativariam a γ H2AX. No estudo de Oh e colaboradores (2011) foi demonstrado que em células deficientes de proteínas da via de reparo NER, ocorre a ativação de γ H2AX 6 horas após a exposição à UV.

O H_2O_2 produz ROS resultando em sítios apurínicos e apirimidínicos que são reparados por BER, mas, produz também quebras de fita simples e fita dupla, as quais podem recrutar vários mecanismos de reparo como HR, NHEJ, MMR, entre outros (Barnes e Lindahl, 2004).

Vários artigos já apresentaram que após o tratamento com H_2O_2 ocorre a ativação da H2AX, e esta ativação ocorre nos primeiros minutos após o dano e pode ser observada em até 24h (Zhao *et al.*, 2008; Banáth e Olive, 2003; Sfikas *et al.*, 2012), corroborando dessa forma com o nosso resultado. Contudo, como todos os agentes que utilizamos produzem ROS e, sabe-se que ROS pode induzir morte celular, avaliamos também a resposta mitocondrial a esses agentes, que foi igualmente interessante (Figura 38).

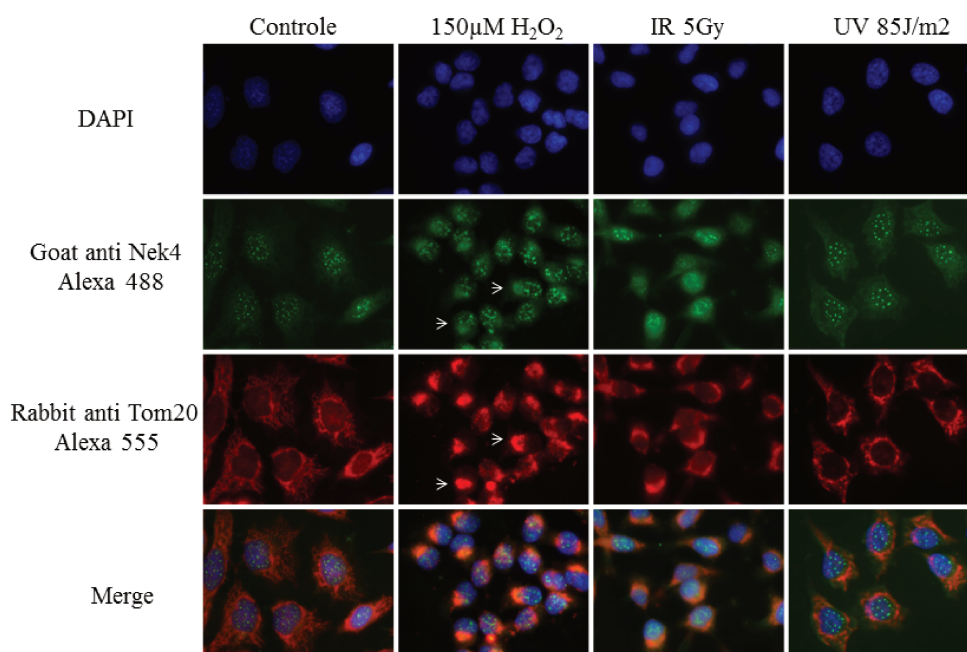


Figura 38: Translocação da Nek4 para mitocôndria após dano ao DNA. Células HeLa foram submetidas a H_2O_2 por 1 h, 5Gy de IR ou 85 J/m² de UV e, 1 h após o estímulo as células foram fixadas e avaliadas quanto à expressão de Nek4. A mitocôndria foi marcada com a proteína Tom20. Após o dano induzido por IR e H_2O_2 a morfologia da mitocôndria é alterada e a marcação da Nek4 citoplasmática parece se acumular nas regiões correspondentes a marcação mitocondrial. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Aumento de 600x.

Após a exposição a IR e H₂O₂ observa-se uma intensa fragmentação da mitocôndria, mas este perfil não foi observado em células expostas a UV. A fragmentação da mitocôndria é característica do processo de fissão que ocorre após um estímulo apoptótico. A mitocôndria normalmente exibe uma morfologia tubular e filamentosa e, após um dano celular essa morfologia muda, apresentando encurtamento dos filamentos e fragmentação dessa organela (Youle e van der Bliek, 2012; Westermann, 2010). As células tratadas com H₂O₂ ou submetidas a IR apresentam um aumento na expressão da Nek4 no citosol quando comparado ao controle. Ainda, esta localização parece mais intensa onde há marcação para mitocôndria com Tom20. Nas células irradiadas com UV, a expressão citoplasmática da Nek4 não é alterada bem como a morfologia mitocondrial, sugerindo que após esse tipo de estresse o comportamento da Nek4 não é o mesmo.

No nosso estudo de interactoma, encontramos várias proteínas relacionadas ao reparo de DNA danificado. Além da Ku70, já descrita na literatura, encontramos PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), RUVBL2, 14-3-3ε ou YWAHE, KAP-1 ou TRIM28 (*Transcription intermediary factor 1-beta*), PARP1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*), E3 ubiquitin protein ligase CHIP (STUB1), MCM (DNA replication licensing factor) 3, 4, 5 e 7, RUVBL1, NONO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*), DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*), TOP1 (Topoisomerase 1) e MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*), entre outras (Tabela 5).

Algumas dessas não são exclusivamente relacionadas ao processo de reparo do DNA danificado ou ainda, sua função clássica não é o reparo em si e sim funções relacionadas à replicação e ciclo celular e por isso foram agrupadas em outros processos biológicos (Figura 33). É o caso da PCNA e topoisomerase 1. O processo biológico resposta ao dano ao DNA aparece apenas na rede de interações da isoforma 1, embora as proteínas PCNA, Topoisomerase1 e MCM3 tenham também sido identificadas como parceiros da Nek4.2 mas, como mencionado anteriormente essas proteínas desempenham na célula outras funções em condições fisiológicas como a replicação do DNA. A única proteína que, curiosamente, foi encontrada apenas para isoforma 2 e em um experimento apenas, que é efetivamente relacionada ao reparo do DNA danificado, mas também a apoptose é a DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) ou PRKDC,

que já foi descrita na literatura como interactor da Nek4 (Nguyen *et al.*, 2012). DNA-PK é um heterodímero composto por DNA-PKcs ou PRKDC e Ku70 e Ku80.

Dentre as proteínas identificadas, KAP-1 chama atenção. A KAP-1 é responsável pelo relaxamento da cromatina após DSB induzida por IR. Tomimatsu e colaboradores (2009) observaram que a fosforilação da KAP-1 ocorre nos primeiros 5 min após dano causado por IR e é restrita aos locais de quebra, sendo que em 60 min observa-se uma localização pan-nuclear de KAP-1 fosforilada. Nesse trabalho eles observaram que DNA-PKcs é a principal responsável por essa fosforilação para esse tipo de dano. Essa conexão é interessante uma vez que já foi relatada a interação da Nek4 com DNA-PKcs (Nguyen *et al.*, 2012) e, a interação encontrada com KAP-1 poderia indicar que a Nek4 faz parte de um complexo de proteínas que responde inicialmente ao dano.

PARP-1 e PCNA são principalmente envolvidas na via de reparo BER (para revisão Hassa e Hottiger, 2008; Dantzer *et al.*, 2000; Karmakar *et al.*, 2001), assim como a proteína ERCC6 (DNA *excision repair protein* ERCC-6 ou *Cockayne syndrome protein*) que participa também da via de apoptose induzida após dano ao DNA por UV (Balajee *et al.*, 2000). Já MDC1 é envolvida no recrutamento das proteínas para os focos de dano e da γ H2AX, sugerindo que além da via NHEJ, a Nek4 poderia participar da via de reparo BER, a utilizada para reparar, por exemplo, danos causados por ROS.

Aliado ao papel da Nek4 no complexo DNA-PKcs/Ku70 e Ku80 (que ainda precisa ser melhor esclarecido) nós acreditamos que a Nek4 poderia interligar a resposta ao DNA danificado e a sinalização de morte celular. Isso porque, além do resultado apresentado acima, mostrando expressão da Nek4 no citosol, possivelmente na mitocôndria após IR e tratamento com H₂O₂, foram encontradas em nosso experimento as proteínas BCLAF, PARP e 14-3-3 ϵ .

O papel da BCLAF1 na decisão celular entre reparo e morte já foi apresentada no trabalho de Lee e colaboradores (2012). A expressão de BCLAF é aumentada no núcleo em associação com γ H2AX após altas doses de irradiação. Após o dano ao DNA a DNA-PKcs fosforila BCLAF1 induzindo sua translocação para o foco de γ H2AX. A interação de BCLAF1 com DNA-PKcs é importante para a estabilização do complexo com Ku70. No núcleo, em associação com γ H2AX, BCLAF induz parada no ciclo celular em G2/M via p53. E, no citosol induz a dissociação do complexo Ku70/Bax, promovendo

consequentemente ativação de Bax e apoptose (Lee *et al.*, 2012). Considerando a interação da Nek4 com todas essas proteínas envolvidas com reparo de DNA, é possível que essa interação possa estar relacionada com a fosforilação destas pela Nek4 e, consequentemente sua ativação ou inativação. Quando analisa-se os sítios de fosforilação preditos para essas proteínas, considerando a sequência consenso para Nek6, LxxS/T, são identificados sítios de fosforilação na PCNA, PARP1, KAP-1 e BCLAF (Tabela 6).

Tabela 6: Predição dos sítios de fosforilação para os parceiros da Nek4

Proteína	Resíduos
PCNA	T185, T224, S230
PARP1	T189, T422, S542, S733, T954,
BCLAF	T464, S559, S573, T574, S578
TRAP1	T61, S362, T374, S401, S408, T641, S660
KAP-1	S258, S273, T498, S624, T741
14-3-3ε	-

Preditor PHOSIDA

Foi realizado ensaio de imunofluorescência com intuito de verificar a interação da Nek4 endógena e algumas das proteínas identificadas e, podemos observar que a Nek4 não apresenta colocalização com a PCNA em condições fisiológicas (Figura 39 A). Contudo, quando as células são expostas a radiação ultravioleta uma intensa colocalização da Nek4 e da PCNA é observada (Figura 39 B). A PCNA é descrita por participar da via de reparo de danos induzidos por UV, assim, esse resultado sugere que a Nek4 interage com a PCNA ou participa da via de reparo juntamente com a PCNA após exposição a esse tipo de estímulo.

A relação da Nek4 com outras proteínas que podem também estão relacionadas à morte celular será explorada na próxima seção.

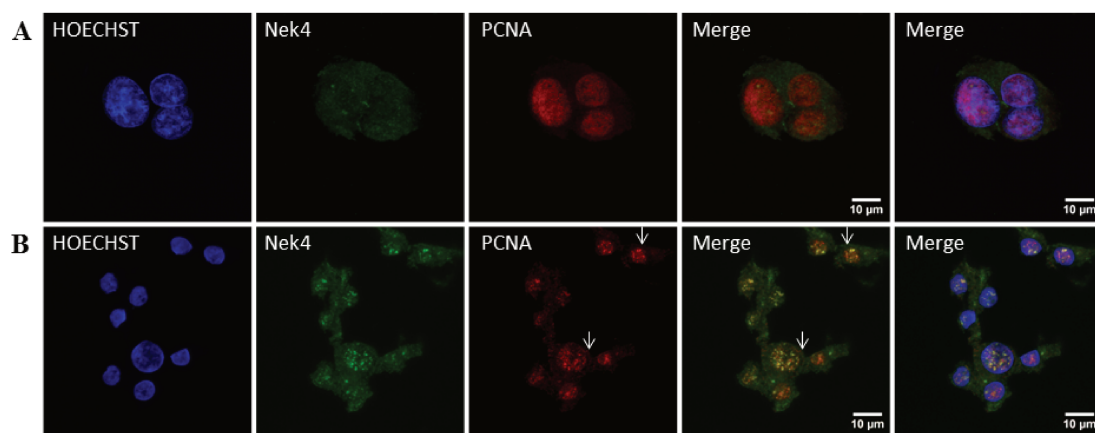


Figura 39: Localização da Nek4 endógena e PCNA. Células HEK293, expostas (B) ou não (A) a radiação ultravioleta, foram submetidas à imunofluorescência indireta para as proteínas Nek4 (anticorpo produzido em cabra) e PCNA. PCNA apresenta marcação predominantemente nuclear enquanto Nek4 aparece localizada difusamente no citosol com alguns pontos no núcleo, não colocalizando com PCNA em condições fisiológicas (A). Após a radiação ultravioleta, PCNA apresenta acúmulo nos focos de dano que correspondem a marcação da Nek4 (B). Microscopia confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546.

4.8 Nek4, mitocôndria e morte celular

A maioria das lesões primárias de DNA não leva a apoptose diretamente e sim por bloqueio da transcrição que leva a depleção de proteínas essenciais ou por danos secundários maiores causados pela tentativa de reparo (Roos e Kaina, 2006).

Quando em baixos níveis de DSBs, apenas uma pequena fração de p53 é ativada, mas, com altos níveis de lesão, p53 se acumula e pode ativar uma série de proteínas pró-apoptóticas, como BAX, PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) e o receptor FAZ. Além da apoptose via p53, E2F1 também pode levar a apoptose após dano induzido por etoposídeo. Após o dano, ATM ou ATR ativam Chk2 e Chk1, que então ativam E2F1 que estimula a transcrição do gene da p73, aumentando os níveis dessa proteína. P73, ao contrário da p53, que precisa da atividade de p63 e p73 para levar a apoptose, já é pró-apoptótica através do aumento da expressão de PUMA que provoca a translocação de BAX para a mitocôndria e liberação do citocromo c. Outra via de morte induzida por dano ao DNA independente da p53, que é ativada após UV, etoposídeo e cisplatina, é a da caspase-2, uma pró-caspase presente no núcleo, cujo exato mecanismo não é conhecido (Roos e

Kaina, 2006). Diante disso, a Nek4 poderia estar atuar regulando vias de morte ativadas após dano ao DNA, do núcleo para o citosol ou mesmo na mitocôndria.

Considerando o resultado de um dos preditores, que indicava que a Nek4 apresentava uma sequência de localização mitocondrial e os resultados do ensaio de imunofluorescência e fracionamento celular obtidos por nós, não surpreende ter identificado em nosso experimento de IP/MS várias proteínas mitocondriais, dentre elas TRAP1 (*Heat shock protein 75 kDa*), SLC25A6 (*ADP/ATP translocase 3*), MFN1 (*mitofusin 1*) e AIFM1 (*Apoptosis-inducing factor 1*), entre outras. Para as duas isoformas da Nek4 foram identificadas as proteínas PGAM5 (*Serine/threonine-protein phosphatase*) e SLC25A6. Apenas a isoforma 2 identificou a CCAR2 (*Cell cycle and apoptosis regulator protein 2*), envolvida além do processamento, na resposta a estresse induzido por UV e na ativação de p53/TP53 e apoptose. A isoforma 1 identificou TRAP1, MFN1, AIFM1 e IMMT (*Mitochondrial inner membrane protein*) ou Mitofilin. Ainda, em relação a apoptose, mas não estritamente a mitocôndria, foram identificadas TNFRSF19 (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19*) que se associa com TRAF e medeia a morte independente de caspase, Peroxiredoxin 1 e, as já mencionadas anteriormente, BCLAF e PARP1.

A permeabilização da mitocôndria é crítica para a morte celular induzida por estresse genotóxico uma vez que nessa condição ocorre a liberação de várias proteínas, como o citocromo c, da mitocôndria para o citoplasma celular. A forma como ocorre a resposta mitocondrial ao estresse, alterando a permeabilidade da sua membrana externa, com consequente liberação de proteínas e morte celular ainda é muito discutida e existem dois principais modelos descritos: um deles infere que em condições de acidose intracelular, redução nos níveis de ATP, aumento nos níveis de cálcio e, possivelmente, alterações no balanço de membros apoptóticos da família Bcl-2, ocorre o aumento da permeabilidade transitória mitocondria (MPT), que leva ao tumecimento da membrana mitocondrial interna e ruptura da membrana externa com consequente liberação do citocromo C para o citosol. O outro modelo propõem que após os mesmos estímulos ocorre a formação de um poro de MPT, constituído por diferentes proteínas que permitem a passagem do citocromo C do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol (Gogvadzea, Orreniusa e Zhivotovskya, 2006; Shoshan-Barmatz et al., 2010; Shoshan-

Barmatz, Mizrahi e Keinan, 2013). Acredita-se, até o momento, que esse poro seja constituído por 3 proteínas principais: na membrana mitocondrial externa estaria presente a proteína VDAC-1, na membrana interna, a proteína ANT (*adenine nucleotide translocator*) e a proteína associada à membrana ciclofilina D (CyPD) (Kumarswamy e Chandna, 2009; Brenner e Grimm, 2006).

Em 2009 Chen, Craigen e Riley publicaram um trabalho que mostrou a Nek1 como principal quinase que fosforila o VDAC (no resíduo de serina 193 que fica em uma região do VDAC voltada para o citoplasma). No modelo defendido pelos autores, a fosforilação nesse sítio protege a célula da morte causada por dano ao DNA por manter o potencial da membrana mitocondrial. No estado basal a Nek1 mantém o canal fechado (Chen, Craigen e Riley, 2009) e inibe a saída de citocromo c, prevenindo a morte celular por apoptose (Chen *et al.*, 2010).

Dentre as proteínas identificadas em nosso experimento está a SLC25A6, também conhecida com ANT3, ou seja, uma proteína que constitui o poro de permeabilidade transitoria da membrana mitocondrial. A SLC25A6 é responsável pela resposta ao aumento de ROS gerado por TNF-alfa, sendo que em células MCF7 com mutações nesta proteína não é observada apoptose após o tratamento com TNF-alfa (Yang *et al.*, 2007).

A apoptose pode ser induzida por uma via dita intrínseca ou uma via denominada extrínseca (Danial e Korsmeyer, 2004). A via extrínseca é ativada pela ligação de TNF ao seu receptor, que, culminará na ativação da caspase-8 e formação do apoptossomo, com ativação das caspases 9 e 3. A via intrínseca está relacionada com a liberação de citocromo c pela mitocôndria após algum estímulo estressante. O citocromo c é então incorporado ao apoptossomo onde interage com Apaf1 e leva a ativação da caspase 9 (Kluck *et al.*, 1997; Ow *et al.*, 2008). Ainda, a apoptose pode ocorrer em uma via independente de caspase, que envolve a ativação da proteína identificada em nosso experimento, a AIFM1.

AIFM1 é uma proteína com atividade de NAD(P)H oxidase e atividade de monodehidroascorbato redutase. Apresenta um domínio carregado positivamente que pode se ligar ao DNA e é essencial para promover a morte celular por fragmentação do DNA. Primariamente, sabe-se que estímulos como peróxido de hidrogênio podem induzir a translocação de AIFM da mitocôndria para o núcleo, onde AIFM1 induz morte na via independente de caspase, promovendo exposição de fosfatidilserina, condensação parcial

da cromatina e condensação nuclear (Jozsa *et al.*, 2001; Lipton e Bossy-Wetzel, 2002; Cregan *et al.*, 2002). Embora saiba-se que após o tratamento com peróxido de hidrogênio AIFM promova alteração no potencial da membrana mitocondrial, seu papel nessa organela é ainda controverso. Acredita-se que possa atuar no transporte de elétrons e como sensor de ROS, sendo um *scavenger* para radicais livres e, nesse caso, prevenindo a apoptose.

A liberação de AIFM da mitocôndria também pode ser induzida por ativação de caspases, ativação e oligomerização de Bax e Bak, perda do potencial de membrana mitocondrial ou mesmo fissão da mitocôndria. No entanto, esses processos parecem relacionados a ativação de PARP-1, uma vez que anticorpos bloqueando a atividade de AIFM, bloqueiam também os efeitos induzidos pela ativação de PARP, indicando que um importante participante na ligação entre dano ao DNA e apoptose é PARP-1 (Hong, Dawson e Dawson, 2004).

PARP-1 é uma proteína nuclear abundante (em média, para cada 1000pb de DNA há uma molécula de PARP-1). A PARP-1 atua como um sensor de quebra de fita de DNA, como mencionado anteriormente. Após o dano sua atividade aumenta em até 500x e ela transfere PAR (polímeros de ADP ribose) para ela mesma, histonas, DNA polimerases, DNA-ligase-2, proteínas do grupo de alta mobilidade e fatores de transcrição. Acredita-se que a intensidade da ativação de PARP-1 esteja relacionada à decisão de reparo ou morte celular. Quando o dano é muito extenso, são geradas extensas cadeias ramificadas dos polímeros PAR, os quais sinalizariam para morte celular. O domínio de ligação ao DNA (dois motivos de dedos de zinco) pode reconhecer tanto quebras de dupla como de simples fita. Não são bem estabelecidas as consequências da poli-ADP-ribosilação na célula, sabe-se apenas que ela pode induzir a dissociação do nucleossomo e descondensação da cromatina, permitindo então um acesso mais fácil dos fatores de transcrição. Pode ainda interagir com centrômeros e regular sua função (Hong, Dawson e Dawson, 2004).

Não se sabe exatamente de que forma o acúmulo de PAR leva a morte celular. Uma das principais hipóteses é que o processo de poli-ADP-ribosilação leva a depleção de NAD^+ e ATP. Outra hipótese é que o polímero em si atue como molécula de sinalização, uma vez que proteínas como p53, p21 e algumas caspases, interagem com PAR de forma não covalente (Hong, Dawson e Dawson, 2004). Quando avaliamos a localização celular, observamos que como esperado, PARP1 apresenta forte marcação nuclear, mas esta, não é

coincidente com a marcação para Nek4, sugerindo que estas podem interagir em momentos celulares muito específicos, possivelmente após dano exacerbado ao DNA (Figura 40).

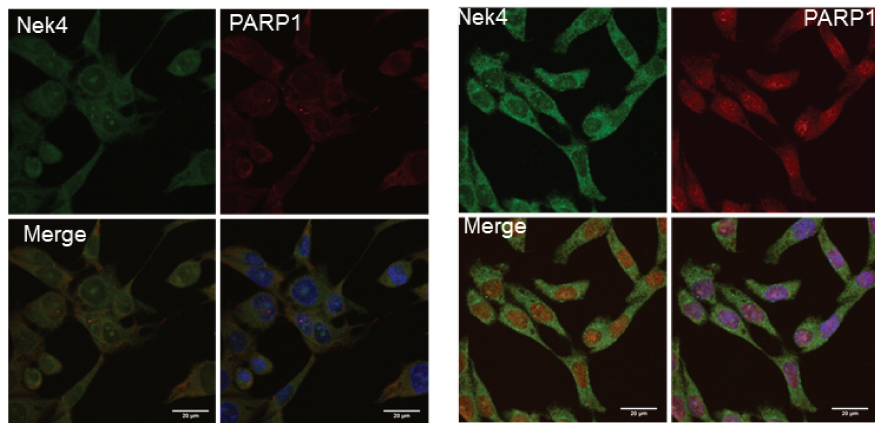


Figura 40: Localização endógena das proteínas Nek4 e PARP1. Células HEK293 foram submetidas a imunofluorescência indireta com os anticorpos contra Nek4 (anticorpo produzido em cabra) e PARP1. PARP1 apresenta marcação nuclear e citoplasmática, mas não apresenta colocalização com a Nek4 em condições normais/fisiológicas. Microscopia confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546.

A TRAP1 também foi encontrada no nosso experimento de IP/MS TRAP1 - *tumor necrosis factor receptor-associated protein*. TRAP1 apresenta alta similaridade sequencial com a HSP90 e por isso também é denominada HSP75. Contudo desempenha algumas funções clássicas de chaperonas como formação do complexo esteroide-receptor e não apresenta atividade de reenovelamento da luciferase, como o faz a HSP90 (Felts *et al.*, 2000). Ainda, quando no citoplasma, ela apresenta uma sequência na extremidade N-terminal que a dirige para mitocôndria onde é clivada. O papel da TRAP1 na mitocôndria já foi relacionado a diversas funções, e, de interesse para nosso trabalho, protegendo a célula da morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio. Ela poderia atuar indiretamente, reduzindo os níveis de ROS ou, diretamente por atuar no enovelamento/ alteração da conformação da proteína ciclofilina D, que interage com o VDAC e o torna menos seletivo, levando assim à morte celular (Figura 41). Ao interagir com ciclofilina D, TRAP1 inibiria a sua atividade e protegeria a célula da morte celular (Kang, 2012).

A resistência a apoptose e redução na produção de espécies reativas de oxigênio são características de células tumorais, bem como resistência aos tratamentos, uma vez que a maioria dos tratamentos contra o câncer leva à morte das células tumorais por geração de ROS e apoptose. Já foi demonstrado o aumento da expressão de TRAP-1 em vários tipos de câncer (ovariano, osteossarcoma, próstata) e, seu papel antioxidante e anti-apoptótico torna TRAP1 um importante alvo para inibição nas terapias anticâncer (Landriscina *et al.*, 2010; Costantino *et al.*, 2009; Leav *et al.*, 2010). Ainda, no trabalho de Gesualdi e colaboradores (2007), a superexpressão de TRAP-1 foi relacionada à resistência a diferentes tipos de estresse como peróxido de hidrogênio, cisplatina e DME. Ainda, eles observaram que em células que expressavam altos níveis de TRAP-1 não apresentavam aumento dos níveis de AIFM no núcleo, e, conseqüentemente fragmentação de DNA e morte celular. Assim, além de proteger a célula da morte por redução nos níveis de ROS a TRAP1 impediria a sinalização de morte para o núcleo.

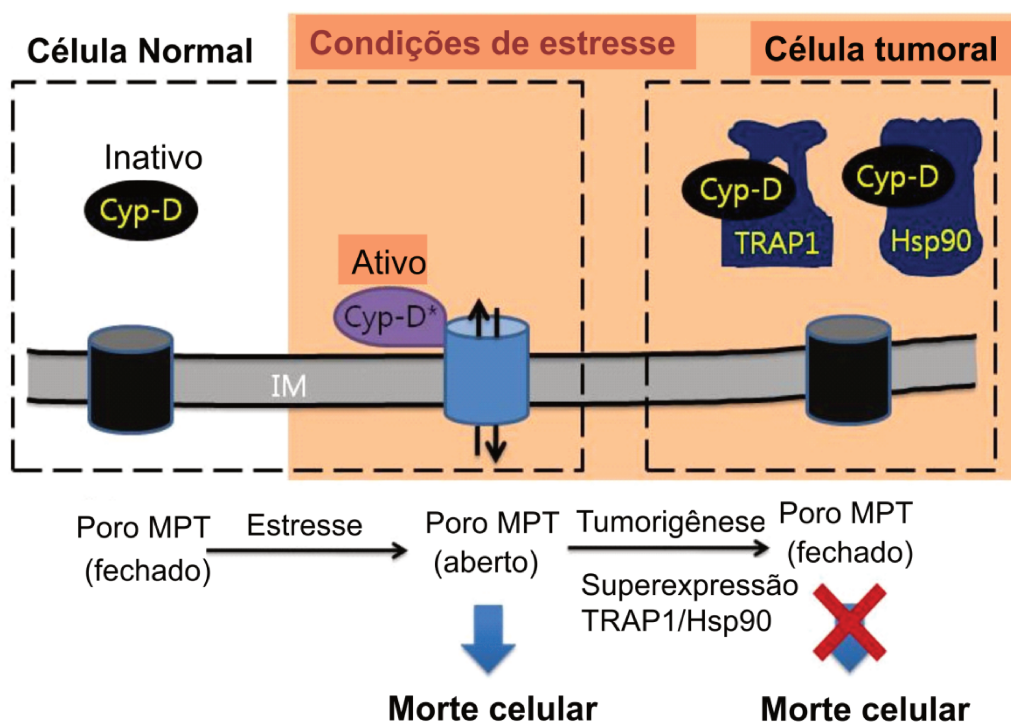


Figura 41: Regulação do poro de transição na membrana interna da mitocôndria (IM). Em condições fisiológicas, Cyp-D presente na matriz mitocondrial é inativa (em preto). Em condições de stress ela é ativada (em lilás) e interage com os componentes do poro, aumentando sua abertura e tornando-o menos seletivo, levando a morte celular. Em células tumorais, na presença de TRAP1 e da Hsp90, que apresentam elevada expressão nessas condições, o poro permanecerá fechado devido a interações diretas dessas chaperonas com Cyp-D e não ocorrerá a morte celular (Adaptado de Kang, 2012).

Takemoto e colaboradores (2011) apresentaram a relação de TRAP-1 também com a resposta a proteínas desenoveladas (UPR) no RE. Amoroso e colaboradores (2012) apresentaram a interação da TRAP-1 com a proteína TBP7/Rpt3, uma S6 ATPase, proteína da subunidade regulatória do proteassoma. Essa interação ocorreria nos sítios de contato entre o retículo endoplasmático e mitocôndria e, nessa região ambas as proteínas controlariam a qualidade das proteínas destinadas à mitocôndria, permitindo sua entrada nessa organela ou, em caso de proteínas com enovelamento ou com sinal de localização incorretos, sinalizariam para degradação proteossomal. Nesse sentido, vale ressaltar que também identificamos várias proteínas relacionadas ao RE, inclusive a calnexina, considerada importante para o controle da qualidade das proteínas no RE (Groenendyk e Michalak, 2005), foi encontrada para as duas isoformas da Nek4 (Tabela 5).

Células com redução da expressão da TRAP1 apresentam alteração na morfologia mitocondrial e, nessas células, os níveis de expressão das proteínas envolvidas com o processo de fissão mitocondrial, *dynamamin-related protein* (Drp1) e fator de fissão mitocondrial (Mff) também apresentaram redução, indicando que TRAP1 regula o processo de fissão mitocondrial por controlar os níveis de expressão dessas proteínas possivelmente através da regulação da degradação proteossomal, ubiquitinação ou sumoilação (Takamura *et al.*, 2012). Curiosamente, o silenciamento de TRAP1 afeta exclusivamente as proteínas relacionadas ao processo de fissão, não alterando os níveis das proteínas envolvidas com a fusão, Mitofusina (Mfn) e OPA-I (*optic atrophy 1*). Nós identificamos a proteína Mitofusina 1 como interactor da isoforma 1 da Nek4 e ainda a mitofilina, que, embora não participe do processo de fissão/fusão mitocondrial é importante também para manutenção da arquitetura mitocondrial, sendo que células depletadas de mitofilina apresentam aumento nos níveis de ROS e do potencial de membrana (John *et al.*, 2005). Ainda, essas células apresentam fragmentação mitocondrial e aumento da apoptose via liberação de citocromo c (Yang *et al.*, 2012). Essa relação com a morfologia mitocondrial ainda agrega outra proteína encontrada em nosso IP/MS, a PGAM5. PGAM5 é uma fosfatase mitocondrial que quando fosforilada, após ativação e sinalização dos receptores de TNF α , é ativada. A ativação de PGAM5 promove a defosforilação da Drp1 levando a sua ativação e consequentemente fissão mitocondrial (Kanamaru *et al.*, 2012). A fosforilação é muito importante para o controle da fissão/fusão mitocondrial e, diante disso, é possível que a

Nek4 participe da regulação desse processo através, por exemplo, da fosforilação da Mitofusina 1 e assim sinalizando-a para degradação (Leboucher, *et al.*, 2012; Chen e Dorn, 2013). A fusão contribui para fosforilação oxidativa e manutenção do potencial de membrana, sendo que a perda desse processo leva a fragmentação mitocondrial, redução do potencial de membrana, consumo de oxigênio, aumento de ROS e apoptose (Para revisão Zorzano *et al.*, 2010).

Os ensaios de imunofluorescência realizados para avaliar a relação de TRAP-1 com a Nek4, demonstraram que essas proteínas colocalizam no citosol (Figura 42) e, algumas células apresentam marcação pontual em uma região próxima ao núcleo.

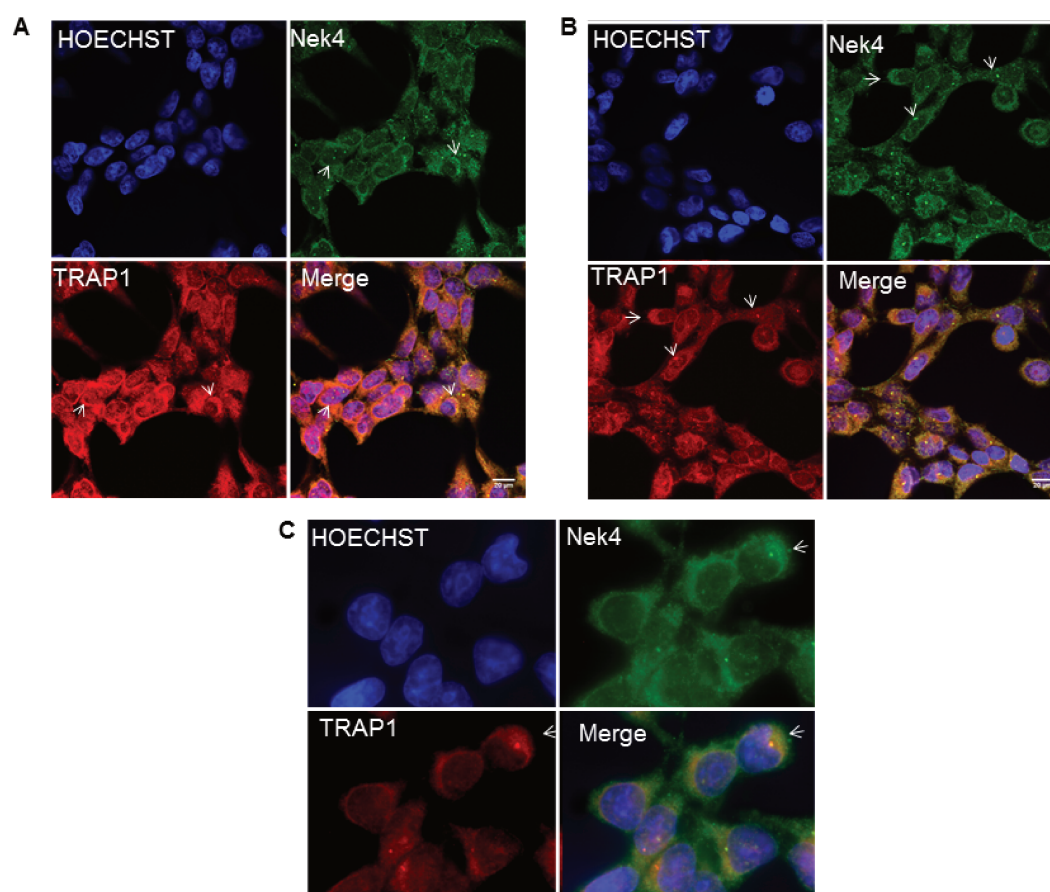


Figura 42: Colocalização da Nek4 e TRAP1 endógenas. Células HEK293 foram submetidas à imunofluorescência indireta com anticorpos contra Nek4 (anticorpo produzido em cabra) e TRAP1. Imagens de microscopia confocal (painel superior A e B) e não confocal (C) aumento de 1000x. Nek4 e TRAP1 colocalizam no citosol em regiões próximas ao núcleo, frequentemente de forma pontual. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546.

Outra proteína identificada como interactor das duas isoformas da Nek4 foi a 14-3-3 ϵ , e a isoforma 2 ainda parece interagir com a 14-3-3 α/β , 14-3-3 γ e 14-3-3 ζ/δ . Na nossa rede de interações (Figura 33) 14-3-3 ϵ não está agrupada no processo de apoptose, contudo, já existem muitos relatos da relação dessa proteína com apoptose e até resposta ao DNA danificado.

A família de proteínas 14-3-3 é constituída por 7 subtipos (α , β , δ , ϵ , γ , η , σ , τ , ζ) e é altamente conservada entre todos os eucariotos, dos fungos aos mamíferos. Elas estão envolvidas em diversos processos ao se ligarem geralmente a proteínas fosforiladas nos resíduos de serina ou treonina próximos a uma arginina (RSXpSXP ou RXXXpSXP). Em geral a associação com essas proteínas leva a várias alterações nos seus ligantes, como aumento ou redução na atividade catalítica, modificação das interações entre as proteínas e na localização celular de seus parceiros (por obstruir os sítios de localização nuclear ou exportação nuclear). Por exemplo, Bax interage com 14,3,3 ϵ , σ e ζ no citosol que a retém nesse compartimento até que ocorra algum tipo de estresse, como alteração nos níveis de cálcio intracelulares, alteração do pH e função da p53 independente de transcrição, que leva a dissociação dessa interação e translocação de Bax para mitocôndria para ativar vias de morte celular. No estudo de Won e colaboradores (2003), foi demonstrado que a 14-3-3 é clivada pela caspase 3 após estímulos pró-apoptóticos como estaurosporina ou UVC. Nessas condições 14-3-3 libera BAD que pode interagir com Bcl-X(L) e levar a apoptose.

A 14-3-3 é importante também para regulação do *checkpoint* G2/M após dano ao DNA. Isto ocorre porque após dano as Chk1 e Chk2 fosforilam as fosfatases CDC25B e C, inibindo então sua atividade. Quando a CDC25C está fosforilada, 14-3-3 interage com ela, reduzindo ainda mais sua atividade, e a sequestra do núcleo afastando então a possibilidade do ciclo celular progredir (Chan, Ng e Manser, 2011). A relação com a DDR já foi demonstrada também para quebra de fita dupla induzida por bleomicina, nesse caso 14-3-3 ϵ transloca para o núcleo e interage com HDAC1, NONO, e DDB1 (Tang *et al.*, 2013). Além disso, 14-3-3 ϵ também é importante para realocização da HSF1 (fator de transcrição de *heat shock*) no citoplasma para recuperação do estresse gerado por choque térmico (Wang *et al.*, 2004).

Em vista do exposto, realizamos imunofluorescência para 14-3-3 ϵ e Nek4, e, observamos uma intensa colocalização (Figura 43), indicando que essa interação

possivelmente ocorre em condições normais na célula e não depende de algum estímulo. Quando analisamos a presença de sítios preditos de fosforilação para 14-3-3 ϵ , não encontramos consenso para Nek6, sugerindo que na verdade 14-3-3 ϵ pode não ser substrato da Nek4, mas pode interagir com ela após que a mesma esteja fosforilada e alterar sua localização celular entre os 3 compartimentos, citosol, mitocôndria e núcleo.

Aliado ao resultado já apresentado, que mostrava forte marcação da Nek4 em regiões nas quais também havia marcação para VDAC, a colocalização da Nek4 com a SLC25A6 ou ANT3 também foi observada (Figura 43), mais uma vez confirmando a localização mitocondrial da Nek4 e ainda sugerindo que esta pode estar na membrana mitocondrial.

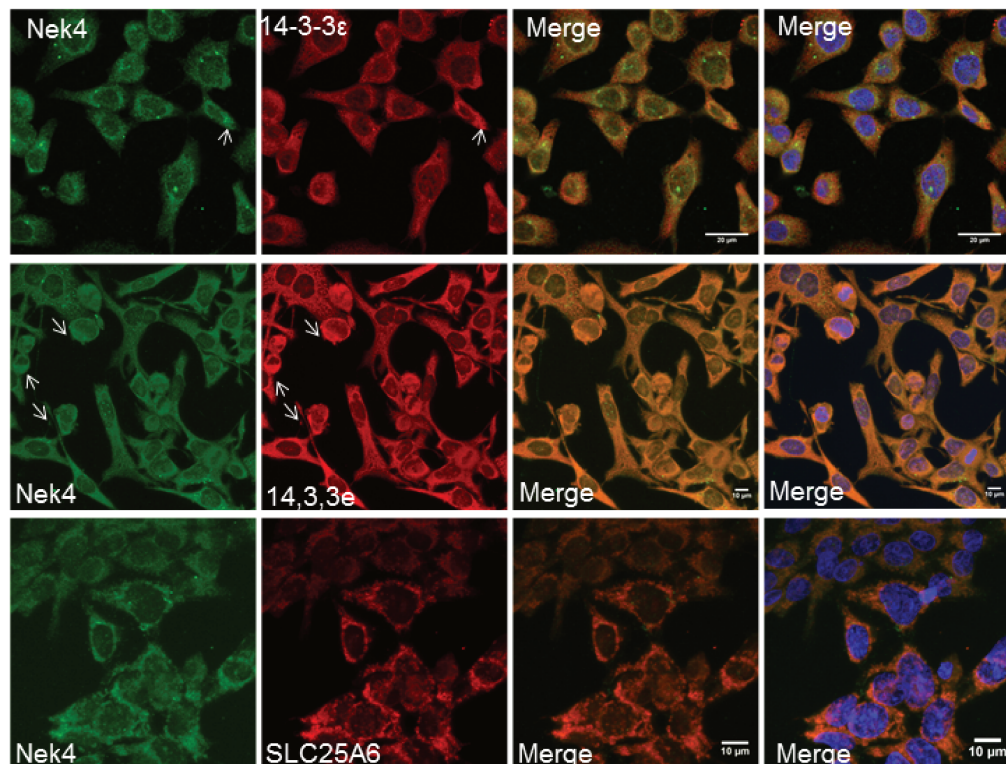


Figura 43: Colocalização da Nek4 e as proteínas 14-3-3 ϵ e SLC25A6. Células HEK293T (painel superior e inferior) e HeLa (painel do meio) foram submetidas à imunofluorescência indireta. 14-3-3 ϵ distribui-se difusamente no citosol e apresenta forte colocalização com a Nek4 (setas) tanto em células HEK293T quanto HeLa. SLC25A6 localiza-se na mitocôndria e apresenta parcial colocalização com a Nek4 (painel inferior). Microscopia confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor®488 e em vermelho – Alexa Fluor®546.

A BCLAF, também denominada Btf, foi identificada num *screening* de duplo-híbrido com a proteína de adenovírus E1B19K. Nesse estudo foi apresentada a colocalização das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-X(L) (Kasof, Goyal e White, 1999). Posteriormente, foi demonstrada a associação de BCLAF com γ -H2AX, sendo essa associação especialmente aumentada em caso de altas doses de irradiação (10Gy) (Lee *et al.*, 2012), sendo que nesse caso, a reparação do dano, via NHEJ ocorre mais efetivamente na presença de BCLAF. Além disso, células resistentes à radiação apresentam fenótipo parecido com as células onde a BCLAF é silenciada e, células tumorais apresentam expressão reduzida de BCLAF. Curiosamente, quando avaliamos a localização endógena da BCLAF, observamos que em células em condições normais, Nek4 e BCLAF colocalizam em pontos específicos próximos ou no interior do núcleo (Figura 44).

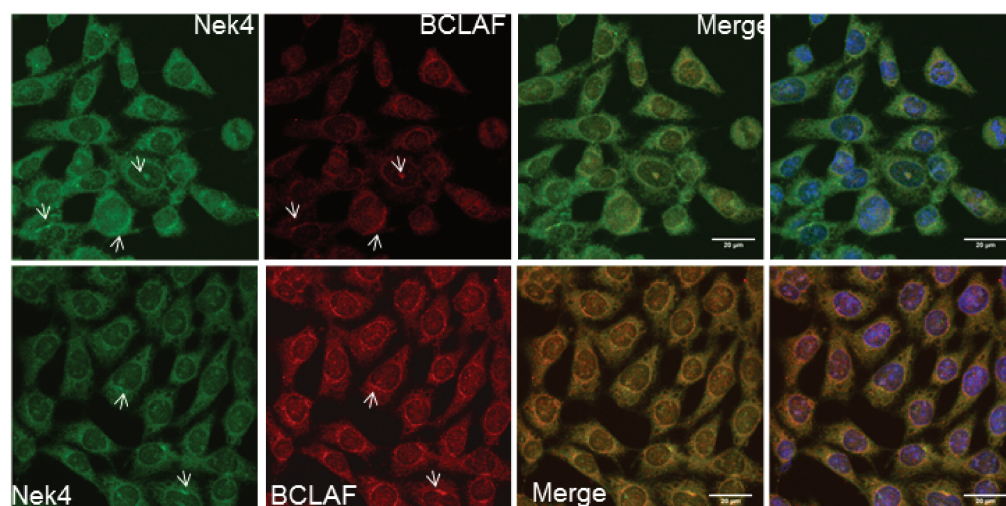


Figura 44: Colocalização da Nek4 e BCLAF. Células Hek293T foram submetidas à imunofluorescência indireta utilizando anticorpos contra Nek4 (produzido em cabra) e BCLAF. As setas indicam colocalização em pontos próximos ao núcleo. Microscopia confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor ®488 e em vermelho – Alexa Fluor ®546.

Diante dos resultados obtidos após o experimento de IP/MS, que apontavam uma significativa relação entre a Nek4 e resposta ao estresse oxidativo, com o intuito de confirmar essa relação funcionalmente, nós utilizamos H_2O_2 como agente estressor para avaliar a produção de ROS e viabilidade celular em células depletadas de Nek4 e com superexpressão de Nek4. Para isso, inicialmente procurou-se estimar a concentração ideal de peróxido de

hidrogênio bem como o tempo de exposição para que obtivéssemos uma morte de aproximadamente 50% das células. Com base na literatura (Xiong *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012), foram testadas concentrações de 1.10^{-5} M a 3.10^{-3} M e 0.5 a 12 h (dados não apresentados). Com base nesses dados foi escolhida a concentração de 150 μ M de peróxido de hidrogênio e exposição por 1 h. Após a determinação desses parâmetros avaliou-se a morte celular causada por peróxido de hidrogênio em células silenciadas transientemente para Nek4 e para as linhagens estáveis que expressam as isoformas 1 ou 2 da Nek4 (Figura 45). Curiosamente, observamos que quando a Nek4 é silenciada parece ocorrer uma leve redução na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (Figura 45) ao passo que quando a isoforma 1 da Nek4 é expressa (Nek4.1F), a morte celular aumenta em relação ao Flag vazio e, ainda mais interessante, quando a isoforma 2 (Nek4.2F) é expressa, parece ocorrer uma proteção em relação à morte induzida por peróxido de hidrogênio. Os dados apresentados correspondem a um experimento e as barras de erro correspondem às réplicas biológicas. O experimento foi repetido por, no mínimo, mais duas vezes e, embora sempre tenha se observado a mesma resposta, devido às diferenças experimentais do método para medida de absorbância, o erro entre os experimentos reduziu muito as diferenças, mas, como a tendência se manteve sempre entre os experimentos, acreditamos que a resposta indique para a participação, embora modesta da Nek4 na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio. E, ao contrário do esperado e da ação da Nek1, a Nek4 parece participar da via de morte induzida por peróxido de hidrogênio. Ainda mais interessante foi a diferença observada entre as isoformas. A isoforma 2 aparentemente protegeu a célula da morte celular induzida por ROS. Uma possível explicação para esse resultado seria a de que a isoforma 2 é expressa em baixos níveis nas células HEK293T e nesse caso está associada a outras funções. No caso da superexpressão dessa isoforma, a expressão endógena da isoforma 1 é reduzida, assim atenuando seu papel na indução da morte celular.

Apesar do nosso silenciamento não ser de 100%, é interessante observar que os resultados de silenciamento corroboram com os dados de expressão estável e são forte indicativo que seja realmente este o papel da Nek4 no caso de morte induzida por peróxido de hidrogênio.

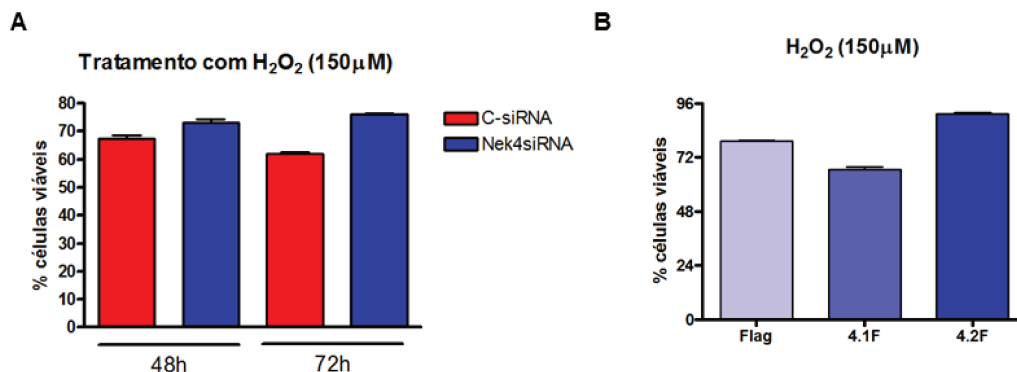


Figura 45: Envolvimento da Nek4 na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio. (A) Células HEK293T, que tiveram a expressão de Nek4 silenciada por 48 ou 72h foram submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio por 1h e a viabilidade celular foi avaliada através do método de MTS. (B) Células HEK293FlpIn, expressando isoforma 1 (4.1F), isoforma 2 (4.2F) da Nek4 ou Flag vazio (Flag) foram expostas por 1h à 150 μM de peróxido de hidrogênio e a viabilidade celular avaliada. A viabilidade celular nos dois experimentos foi avaliada através do teste de MTS 1 hora após a remoção do peróxido de hidrogênio. A porcentagem de células vivas foi calculada com base na porcentagem do mesmo tipo celular sem ser exposto ao peróxido de hidrogênio. Os gráficos representam resultado de um experimento e as barras de erro são relativas às réplicas biológicas (no mínimo 3).

Para nos certificarmos de que a morte celular observada estava relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio e não simplesmente à superexpressão ou silenciamento da Nek4 nessas células, avaliamos a quantidade de ROS produzida após o tratamento com peróxido de hidrogênio. E, como pode ser observado na figura 46, o resultado foi condizente com o de morte celular. Primeiramente, as células superexpressando a Nek4 apresentam basalmente maiores níveis de ROS em comparação com o controle e, após o tratamento com peróxido de hidrogênio os níveis aumentam igualmente quando se compara isoforma 1 e o controle. Contudo, mais uma vez a resposta nas células que superexpressam a isoforma 2 o efeito foi o inverso, como se nessas células ocorresse uma inibição na produção de ROS, sendo que após o tratamento com peróxido de hidrogênio os níveis de ROS foram reduzidos. No caso do silenciamento, basalmente as células silenciadas para Nek4 apresentam menos ROS do que as células controle e, após o tratamento com peróxido de hidrogênio o aumento foi bem menor. Esse resultado foi confirmado em células HeLa estavelmente silenciadas para Nek4. Novamente observou-se níveis reduzidos de ROS nas células silenciadas para Nek4 em condições basais (Figura 47) e, igualmente, após a exposição a peróxido de hidrogênio, apesar de os níveis de ROS aumentarem foram ainda menores do que no controle.

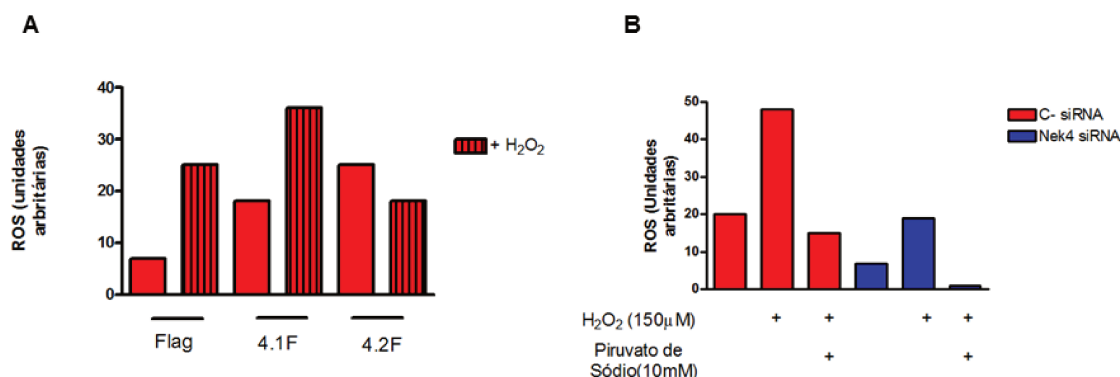


Figura 46: Envolvimento da Nek4 na produção de ROS induzida por peróxido de hidrogênio. (A) Células HEK293FlpIn, expressando isoforma 1 (4.1F), isoforma 2 (4.2F) da Nek4 ou Flag vazio (Flag) foram expostas por 1h à 150μM de peróxido de hidrogênio. Após esse período a quantidade de ROS produzida foi avaliada por citometria de fluxo utilizando como corante o reagente CellRox DeepRed (Invitrogen). Os resultados são expressos como unidades arbitrárias. (B) Células HEK293 silenciadas por 72h para Nek4 foram submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio por 1h quando a produção de ROS foi avaliada por citometria de fluxo. O piruvato de sódio foi utilizado como *scavenger* de ROS. Os gráficos são representativos de um experimento.

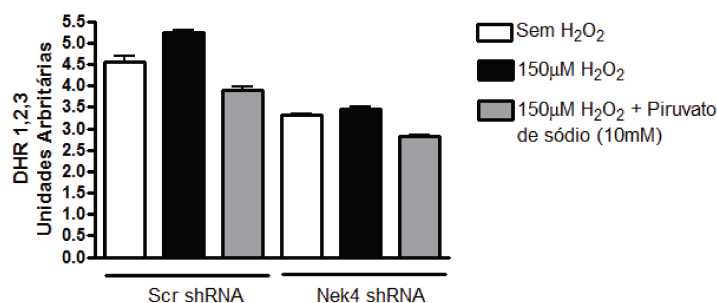


Figura 47: Envolvimento da Nek4 na produção de ROS induzida por peróxido de hidrogênio em células estavelmente silenciadas. (A) Células HeLa estavelmente silenciadas para Nek4 foram expostas por 1h à 150μM de peróxido de hidrogênio. Após esse período a quantidade de ROS produzida foi avaliada por citometria de fluxo utilizando como corante o DHR 1,2,3 (Invitrogen). Os resultados são expressos como unidades arbitrárias e são representativos de um experimento realizado com réplicas experimentais. O piruvato de sódio foi utilizado como *scavenger* de ROS.

Esses resultados apontam para um papel da Nek4 na produção de ROS, provavelmente de forma positiva, inibindo enzimas como a Peroxiredoxina 1 por fosforilação, AIFM ou mesmo TRAP1. Vale ressaltar que a Peroxiredoxina foi identificada nos experimentos das duas isoformas, mas em 3 réplicas da isoforma 2 e apenas 1 da isoforma 1. Enquanto a TRAP1 e AIFM foram identificadas apenas no experimento da isoforma 1.

4.9 Função ciliar

A primeira indicação do papel da Nek4 na função ciliar surgiu com o trabalho de Coene e colaboradores (2011) que sugeriram que a Nek4 poderia participar de uma rede de proteínas importante para estabilidade ciliar dos fotorreceptores. Essa rede seria sustentada pelas proteínas RPGRIP1 e RPGRIP1L, duas proteínas homólogas envolvidas em ciliopatias. RPGRIP1 é uma proteína que interage com a RPGR (*retinites pigmentosa GTP-ase regulator*) e defeitos nesta causam retinite pigmentosa associada a X. A retinite pigmentosa é uma das mais severos tipos de degeneração da retina promovendo cegueira noturna, perda de campos visuais que levam a morte do fotorreceptor e acúmulo de pigmentos intraretinais.

A função ciliar é um processo biológico para o qual a participação das Neks já foi relatada (Nek1 e Nek8) e, está obrigatoriamente relacionado ao ciclo celular, uma vez que o cílio primário origina-se a partir do centrosomo na interfase, como já discutido anteriormente (item 1.2.3). Além da RPGRIP1L, nós também encontramos outras proteínas relacionadas a função ciliar em nosso experimento de IP/MS. Curiosamente a RPGRIP1L foi encontrada em apenas uma réplica de cada isoforma e com baixo escore. Enquanto para a isoforma 2 (Nek4.2) RPGRIP1L tenha sido a única proteína relacionada a função ciliar encontrada, para a isoforma 1 (Nek4.1) ainda foram encontradas as proteínas whirlin (DFNB31), TTC21B (*Tetratricopeptide repeat protein 21B*), IFT172 (proteína intraflagelar 172) e miosina VIIa (Myo7a). Essas proteínas não foram agrupadas automaticamente no processo de função ciliar, contudo, devido a dados na literatura, que estabelecem a participação na formação/ sinalização ciliar para estas proteínas, agrupou-se manualmente estas nessa função. Primeiramente, nós verificamos a presença da Nek4 nessa estrutura, para tal, foram utilizadas células RPE-hTERT, células de retina que, em condições de alta confluência ou privação de nutrientes não se dividem mais e formam cílio primário. Como pode ser observado na figura 48 a Nek4 apresenta uma marcação pontual nessas células que, coincide com a base do cílio (marcação pela tubulina acetilada). Ainda, nessas células verificamos a co-localização da Nek4 com whirlin (Figura 48B).

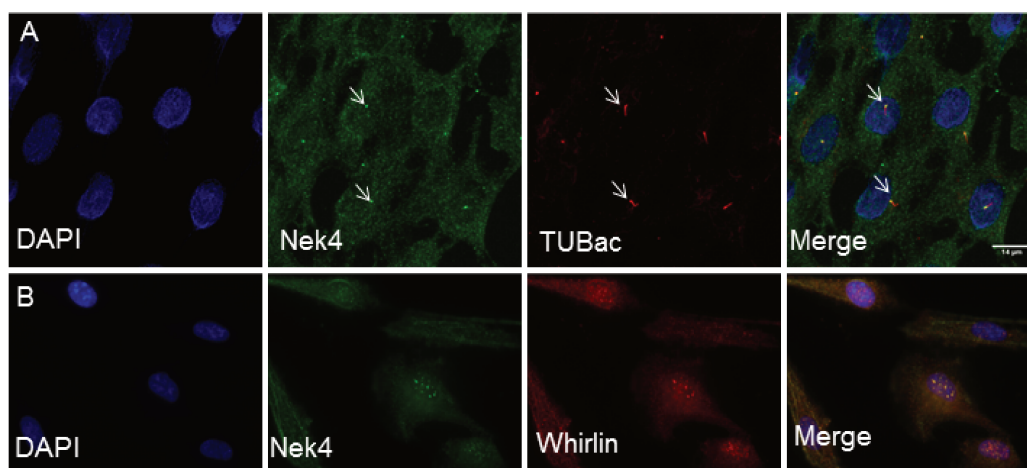


Figura 48: Localização da Nek4 no cílio primário. Células RPE-hTERT confluentes foram privadas de soro por 20h então fixadas com metanol gelado. A imunofluorescência foi realizada utilizando os anticorpos contra Nek4 (anticorpo produzido em cabra) e tubulina acetilada e as imagens obtidas em microscópio confocal (A). Ainda foi realizada imunofluorescência utilizando anticorpo contra whirlin, sendo as imagens obtidas em microscópio não confocal (B) Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Aumento de 600x.

Whirlin é membro da rede Usher, um complexo de proteínas que inclui proteínas motoras, adaptadoras, moléculas de adesão celular e receptores transmembrana importantes para o desenvolvimento e manutenção de células sensoriais. Mutações nos genes codificadores para essas proteínas levam a síndrome de Usher, uma condição autossômica recessiva que causa surdez congênita e retinite pigmentosa. Até o momento já foram identificados até 12 genes afetados no *locus* Usher, entre eles, MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15 e DFNB31 (Pan e Zhang, 2012).

Whirlin é uma proteína que está relacionada com a síndrome de Usher do tipo 2 (USH2), o tipo mais comum de síndrome de Usher e que está relacionada a perda auditiva moderada e não progressiva sem comprometimento vestibular (Kremer *et al.*, 2006). Três genes estão especialmente envolvidos no desenvolvimento dessa síndrome, USH2A, que codifica a proteína usherina, USH2C, que codifica um receptor acoplado a proteína G muito grande (VLGR1) e por fim USH2D, que codifica a Whirlin. Ainda, defeitos no gene da whirlin também podem ocasionar surdez não síndrômica, o que originou a denominação DFNB31. A whirlin localizar-se-ia no cílio conector do fotorreceptor e circundaria a base

formada por microtúbulos e a proteína RPGR, sendo que a proteína usherina (USH2A) se ligaria a RPGR e VLGR1 e whirlin interagiriam com usherina (Yang *et al.*, 2010).

São encontrados 2 grupos de proteína whirlin, isoforma longa ou 1, que contém 2 domínios PDZ na extremidade N-terminal, um domínio rico em prolina e um domínio PDZ na carboxi-terminal e, a isoforma menor, que não contém os domínios PDZ no N-terminal. Tanto o PDZ quanto a região rica em prolina são regiões de interação. Os domínios PDZ seriam importantes, por exemplo, para a interação da whirlin com uma isoforma da proteína RPGR (isoforma Rpgr^{ORF15}) (Wright, Hong e Perkins, 2012).

A isoforma identificada em nosso experimento foi a longa e, os peptídeos correspondentes a um dos domínios PDZ presente nessa extremidade.

Recentemente, Wright, Hong e Perkins (2012) apresentaram a colocalização da whirlin e rpgr ORF15 no cílio conector do fotorreceptor e ainda que a localização de rpgr ORF15 não depende de whirlin. Eles demonstraram também que as isoformas de whirlin, curta (isoforma 2) e longa (isoforma 1) apresentam localização diferente, sendo que a isoforma longa localiza-se na raiz ciliar e a curta não se restringe ao cílio conector, colocalizando com rodopsina. Esse resultado é interessante, uma vez que a localização da Nek4 em fotorreceptores descrita por Coene e colaboradores (2011) foi exatamente na raiz ciliar, corroborando para a interação com a isoforma 1.

Ainda whirlin pode estar relacionada ao processo de fusão da membrana dos fotorreceptores através da interação com o canal de cálcio do tipo L nas células da retina (Kersten *et al.*, 2010). No complexo de membrana periciliar, whirlin juntamente com USH2 e VLGR1, formam uma estrutura importante para manter a relação espacial entre cílio conector e PMC (Yang *et al.*, 2010).

Além da presença em células da retina, whirlin está presente no estereocílio na orelha interna. Os estereocílios são projeções celulares, similares a microvilos que, diferente do cílio, que é constituído basicamente por filamentos de microtúbulos, é uma estrutura baseada em filamentos de actina. Cada estereocílio é constituído por centenas de filamentos de actina cruzados. Nos estereocílios, estruturas responsáveis pela conversão do estímulo mecânico (som) em estímulo elétrico, a whirlin pode estar presente ao longo de toda a estrutura. Essa localização difusa está relacionada com o envolvimento da whirlin no crescimento do estereocílio através da polimerização da actina (Kikkawa *et al.*, 2005).

Whirlin, juntamente com as miosinas VIIa e XV controlam o tamanho do estereocílio (Prosser *et al.*, 2008; Delprat *et al.*, 2004, Mogensen, Rzadzinska e Steel, 2007). Para alcançar sua localização no topo do cílio, whirlin precisa ser transportada pela miosina XVa e, mutações no gene dessa miosina apresentam fenótipo similar aos camundongos whirler, que apresentam encurtamento do estereocílio (Probst *et al.*, 1998; Belyantseva *et al.*, 2005). Além do envolvimento no alongamento do estereocílio, whirlin está relacionada à espessura do mesmo através da interação na base do estereocílio com a espina, proteína que normalmente está ligada à monômeros de actina. Ao se ligar a espina, whirlin aumenta a disponibilidade de actina livre para se associar ao filamento de actina necessária para o espessamento do estereocílio (Wang *et al.*, 2012).

Como o experimento de IP/MS foi realizado com células HEK293T, foi necessário avaliar a presença da whirlin nessas células bem como se a localização celular dessa condizia com a localização da Nek4 endógena. A célula HEK293T é uma célula de epitélio renal, e, como outras linhagens celulares, mesmo sendo imortalizada, é capaz de formar cílio primário quando em alta confluência ou privação de nutrientes e, como pode ser observado na figura 49 estruturas similares a cílios podem ser visualizadas nessas células, e, nessas condições, aparentemente, Nek4 e Whirlin localizam-se, de forma pontual, na mesma região, que poderia ser a base do cílio (Figura 50).

Considerando a interação citada na literatura, e também identificada por nós, da Nek4 com RPGRIP1 e RPGRIP1L e, ainda que estas não sejam substratos da Nek4, podemos supor que as mesmas poderiam sustentar ou promover a interação da Nek4 com whirlin e, whirlin poderia ser substrato da Nek4. Utilizando preditores para fosforilação (Phosida e NetPhos) e a sequência consenso no sítio para fosforilação pela Nek6, já conhecido, identificamos 13 sítios de fosforilação que apresentam a sequência reconhecida pela Nek6 LxxS/T, indicando que essa hipótese pode ser verdadeira.

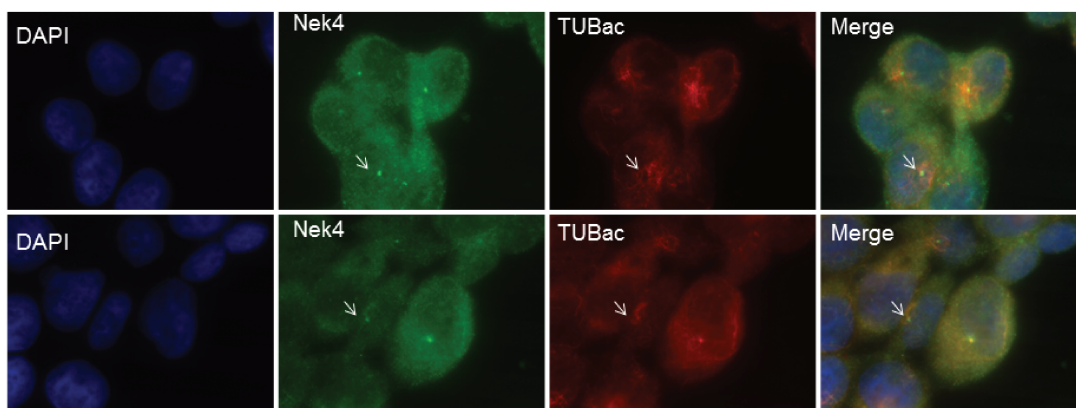


Figura 49: Localização da Nek4 e Tubulina acetilada em células HEK293T. Células HEK293T foram submetidas a privação de soro por 20h para indução da formação do cílio primário e então submetidas a imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-Nek4 (produzido em cabra) e anti-Tubac. As setas indicam locais de possível colocalização. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Imagens obtidas em microscópio convencional, não confocal. Aumento de 1000x

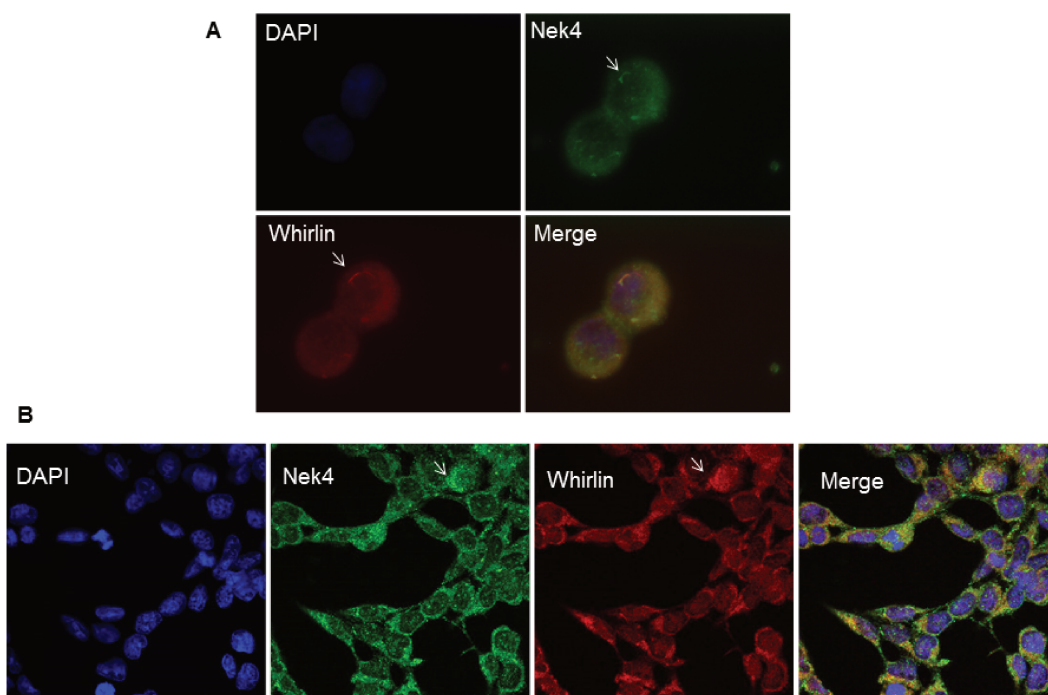


Figura 50: Localização da Nek4 e whirlin em células HEK293T. Células HEK293T foram submetidas a privação de soro por 20h para indução da formação do cílio primário e então submetidas a imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-Nek4 (produzido em cabra) e anti-whirlin. (A) Imagens obtidas em microscópio convencional. Aumento de 1000x. (B) Imagens adquiridas com microscópio confocal. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546.

A proteína TPR21B, do gene TTC21B, também está relacionada a função ciliar e ciliopatias. Ela contém o motivo TPR – *tetratrico Peptide repeat*, que consiste em 34 resíduos de aminoácidos estruturado em alfa-hélice. Ocorrem repetições em *tandem* de 3-16 desses resíduos de aminoácidos. Essas repetições são envolvidas com interações proteína-proteína em complexos de muitas proteínas (D’Andrea e Regan, 2003).

TPR21B é importante para o transporte retrógrado intraflagelar e estudos funcionais demonstraram que ela é essencial para a estrutura dos cílios sensoriais dos fotoreceptores normais e ainda a formação do cílio renal. Ela, assim como a whirlin e a Nek4, localiza-se na base do cílio primário, principalmente na zona de transição com uma pequena extensão para o axonema (Liu, Zhang e Pierce, 2010). Não há muitas informações na literatura sobre essa proteína, mas, sem dúvida, a identificação dela só vem a confirmar que a Nek4 está envolvida com formação/manutenção ciliar.

Os cílios e flagelos na maioria dos eucariotos são mantidos pelo transporte intraflagelar (IFT). Esse transporte é responsável pelo carregamento de proteínas necessárias para a montagem do cílio desde o seu local de síntese para o corpo celular. As proteínas são transportadas dentro de partículas através dos microtúbulos que formam o cílio com o auxílio da kinesina motora 2 (transporte anterógrado - B) ou da dineína 2 (transporte retrogrado - A). As partículas do IFT propriamente ditas são compostas por 20 subunidades únicas altamente conservadas entre os eucariotos. Elas podem ser divididas nos dois complexos A (IFT144, 140, 139, 122, 121, 122) e B (IFT172, 88, 81, 80, 74/72, 57/55, 52, 46, 27, 20) (Cole *et al.*, 1998; Piperno and Mead, 1997).

Recentemente, Halbritter e colaboradores (2013) realizaram um estudo para identificar proteínas do complexo B que poderiam estar envolvidas com ciliopatias. Para isso eles realizaram análises de mutações em genes codificadores para proteínas do complexo B em indivíduos com nefronoftise relacionada à ciliopatia – condição autossômica recessiva associada a doença cística renal. Eles identificaram mutações do gene que codifica a proteína IFT172 em indivíduos que apresentavam anomalias de ossos longos e/ou tórax, de rim, fígado e retina, sintomas consistentes com as ciliopatias, distrofia toraxica asfíxiante (ATD – do inglês *asphyxiating thoracic dystrophy*, também conhecida como síndrome de Jeune), e a síndrome de Mainzer-Saldino (MZSDS). Ainda, células

expressando IFT172 mutante apresentam cílio truncado, devido a defeitos no axonema ciliar distal (Friedland-Little *et al.*, 2011).

As tubulinas são proteínas muito abundantes na célula e envolvidas com várias funções, uma vez que fazem parte do citoesqueleto e participam da divisão celular, formando o fuso mitótico, formação de estruturas como flagelos e cílios, orientando a polarização celular e ainda permeabilidade mitocondrial (Rostovtseva *et al.*, 2008 Sheldon *et al.*, 2011).

No trabalho de Sharma e colaboradores (2011) foi demonstrada a relação da disponibilidade de tubulina solúvel e comprimento do cílio primário, sendo que o comprimento do cílio está diretamente relacionado à disponibilidade de tubulina solúvel no citosol e, ainda que o tratamento com taxol, um conhecido estabilizante de microtúbulos, reduz esse comprimento. Além disso, os resultados desse trabalho indicam para uma dinâmica importante entre a actina e a elongação do cílio e que proteínas que medeiam a comunicação entre a actina e as tubulinas, ou nas modificações pós-traducionais dessas, podem ser importantes para explicar essa relação. Essa constatação é extremamente interessante quando analisamos a relação da Nek4 com a estabilidade dos microtúbulos, apresentada no trabalho de Doles e Heman, 2010. Considerando que a Nek4 atua diretamente na polimerização dos microtúbulos, provavelmente por interagir diretamente com a tubulina alfa (encontrada em todas as réplicas, para as duas isoformas) e ainda a relação da whirlin com a polimerização dos filamentos de actina, pode-se imaginar que a Nek4 poderia interligar esses dois processos, possivelmente até através da fosforilação de uma dessas.

4.10 Processamento de mRNA

Após a transcrição ocorre o processamento do RNAm produzido, que envolve três etapas básicas: a adição de uma 7-metilguanosina na extremidade 5' do transcrito primário de RNAm para prevenir sua degradação; a adição de uma cauda de adeninas que estará relacionada à estabilidade do RNAm produzido; e, essencialmente a remoção das sequências não codificantes, os íntrons (Ward e Cooper, 2010), uma etapa denominada *splicing*. Além desse processo de *splicing*, dito constitutivo, ocorre ainda um processo de *splicing* alternativo que é responsável pela diversidade genética, permitindo que diferentes

proteínas sejam produzidas à partir de um gene através da remoção ou modificação de éxons (Grosso *et al.*, 2008). Curiosamente estes dois processos são realizados pelo mesmo conjunto de proteínas (fatores de *splicing* – SRFs, proteínas nucleares e proteínas quinases) e pequenos RNAs nucleares, os snRNAs (*small nuclear RNA*) (Ward e Cooper, 2010). O *splicing* ocorre em estruturas denominadas *spliceossomos* que são basicamente compostos por 5 snRNAs.

Os sítios de *splicing* podem ser fracos ou fortes, o que é determinado pela similaridade da sequência no consenso que será reconhecido pelo *spliceossoma*, sendo que, geralmente, sítios fortes são os reconhecidos constitutivamente. O uso dos sítios fracos e, portanto, a ocorrência de *splicing* alternativo está relacionada a atuação de elementos *cis* e *trans* sendo que dentre estes últimos se encontram os fatores SRF e as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRPNs), sendo que estes podem ativar ou inibir os sítios de *splicing* (Kornblihtt *et al.*, 2013).

SRPKs (*serine arginine protein kinase*), são serina argininas proteínas quinases, que foram descritas como as responsáveis pela fosforilação dos SRF. Elas fosforilam esses fatores na região enriquecida de resíduos arginina e serina e conseqüentemente alteraram sua distribuição e função no *splicing*. Inclusive, a interação com algumas subunidades do *spliceossoma* parece ser fosfo-dependente e responsável pelo estabelecimento dos sítios de *splicing* corretos. A fosforilação dos fatores favorece a montagem do *spliceossoma* e a remoção dos íntrons está associada a sua defosforilação. Ao final do *splicing* alguns fatores ainda permanecem associados ao RNAm maduro até que este seja exportado para o citosol e, para que estes fatores retornem ao núcleo é necessária a fosforilação destes por SRPK1 ou 2. Alguns estudos já demonstraram que após estresse genotóxico o perfil de *splicing* pode ser alterado, então, por exemplo, modificações pós-traducionais como sumoilação, fosforilação ou ubiquitinação e metilação podem alterar a localização e atividade dos fatores de *splicing* e, conseqüentemente, o próprio processamento (revisado em Lenzken, Loffreda, Barabino, 2013). Isto ocorre com as quinases SRPK, que após estresse genotóxico são redistribuídas, translocando do citosol para o núcleo e lá hiperfosforilam os fatores de *splicing* (Edmond *et al.*, 2011). A sumoilação também pode alterar o *splicing*, é o que ocorre com o fator ASF/SF2, que após o dano se associa a PIAS1 e regula sua atividade

de sumoilação. Ainda, várias hnRNPs são sumoiladas (Lenzken, Loffreda e Barabino, 2013).

Na nossa rede de interações entre proteínas foram encontradas várias proteínas relacionadas ao processamento do RNAm, especialmente via *spliceossomo*, sugerindo fortemente o envolvimento da Nek4 nesse processo (Figura 33). Isto é particularmente interessante, uma vez que o envolvimento das Neks com essa função não foi descrito até o momento. Ainda, esse processo parece ser compartilhado pelas duas isoformas, sugerindo que esta é uma função primordial da Nek4. Além disso, nosso resultado de IP/MS é reforçado pela imunofluorescência que apresenta completa colocalização da Nek4 como a Sc35, marcador de *speckles* nucleares. Essas estruturas nucleares são ricas em ribonucleoproteínas nucleares e outras proteínas relacionadas a transcrição e processamento de mRNA. Foram identificadas as proteínas SRRM2 (*Serine/arginine repetitive matrix protein 2*), PAPOLA (*Poly(A) polymerase alpha*) envolvida com a poli-adenilação, PRPF4B (*Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog*) que também fosforila SRSF2, SFQ, NONO e matrinxã 3, STRAP e várias ribonucleoproteínas nucleares, inclusive a hnRNPQ (SYNCRIP).

A hnRNPQ é membro da família de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas que é composta por mais de 20 proteínas. As proteínas dessa família interagem com RNA ou proteínas que se ligam ao RNA. Ainda, a maioria delas está envolvida com o transporte nuclear-citoplasmático. Elas já foram implicadas em diversos aspectos do metabolismo do RNA, inclusive a degradação do mRNA (Grosset *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005).

No citoplasma, várias hnRNPs são envolvidas em processos relacionados ao RNA e frequentemente elas podem ser encontradas em estruturas especializadas, os corpos GW (previamente denominados corpos de processamento (Pbs)) ou em grânulos de estresse (SGs). Os primeiros tem sido relacionados ao processo de decaimento do RNAm, atuando como um sítio para a degradação deste. Já os grânulos de estresse, descritos como agregados citoplasmáticos, acumulam RNAm em condições de estresse celular e apresentam redução ou inibição da tradução. Em vista disso, Quaresma e colaboradores (2009) observaram a localização da hnRNPQ nos grânulos de estresse após exposição a agentes como PMA, tapsigargina ou ainda, choque térmico.

Nós realizamos imunofluorescência para verificar a localização da Nek4 endógena e da hnRNPQ em condições fisiológicas. Esse experimento demonstrou um acúmulo de Nek4 e hnRNPQ em regiões do citoplasma, principalmente próximo ao núcleo (Figura 51).

Em nosso IP/MS, também foi identificada a proteína PAI-RBP1 (*Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein*) também conhecida como CGI-55 ou SERBP1. PAI-RBP1 apresenta 70% de similaridade com Ki-1/57 e, com ela compartilha vários parceiros de interação como Daxx e Topoisomerase I binding RS (Topors) (Lemos and Kobarg, 2006). Ki-1/57 também interage com hnRNPQ e está associada a eventos de processamento do RNAm e transcrição (Bressan *et al.*, 2009).

PAI-RBP1 interage com várias proteínas que ligam ao RNA em condições de estresse. Estas então se acumulam em grânulos no citoplasma e nucléolo. Nesse caso, os grânulos de estresse são formados quando a transcrição é interrompida durante uma condição estressante, constituindo um importante fator para proteção de partículas de ribonucleoproteínas mensageiras até a recuperação da célula (Lee, Wei e Chen, 2014).

É interessante ressaltar ainda que outra modificação pós-traducional relacionada a localização nos grânulos de estresse é a poli-ADP-ribosilação, mediada por PARP. Em condições de estresse específicas, PARP1 interage com proteínas que se ligam ao RNA para formação dos grânulos de estresse e ainda para resposta ao DNA danificado. Além disso, a adição de poli-ADP-ribose ao fator de *splicing* ASF/SF2 (SRSF1) inibe sua fosforilação mediada pela DNA topoisomerase (Ji e Tulin, 2-13).

Uma vez que nós também identificamos o fator de *splicing* ASF/SF2 (SRSF1) em nossa análise, realizamos imunofluorescência também para essa proteína e, dessa vez, não observamos colocalização dessa proteína com a Nek4 (Figura 51). Diante do exposto, uma possibilidade, novamente, seria a fosforilação desse fator pela Nek4 em condições específicas, regulada por PARP, que poderia modificar sua função/ localização. Tanto a proteína hnRNPQ como a SF2 apresentam predição de sítios de fosforilação para Nek6.

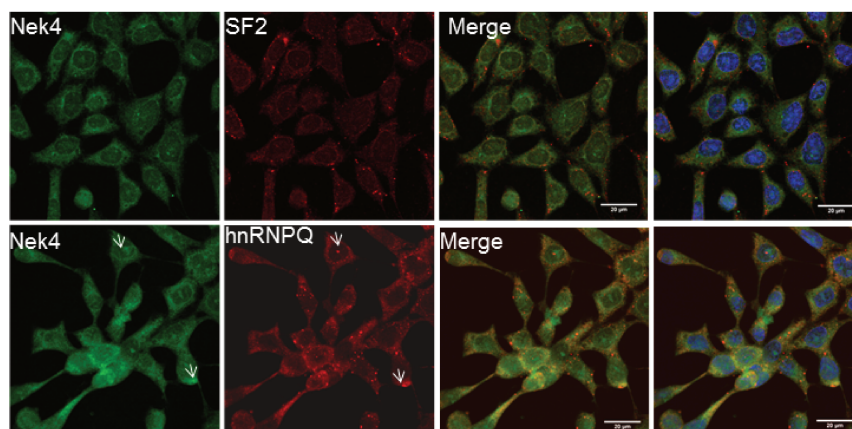


Figura 51: Localização da Nek4 e SF2 e hnRNPQ. Imunofluorescência indireta de células HEK293T utilizando os anticorpos contra Nek4 (anticorpo produzido em cabra) e SF2 ou hnRNPQ. As setas indicam pontos de colocalização. Marcação em verde – secundário Alexa Fluor @488 e em vermelho – Alexa Fluor @546. Microscópio confocal.

4.11 Análise dos sítios fosforilados encontrados para Nek4 no experimento de IP/MS

Nosso experimento de IP/MS não priorizou a identificação dos peptídeos fosforilados, e dessa forma nenhum tratamento específico das amostras visando o enriquecimento desses peptídeos foi realizado. Contudo, quando incluiu-se a fosforilação de serina/treoninas como modificação variável na busca de peptídeos, pudemos identificar 7 resíduos diferentes que estavam fosforilados nos peptídeos encontrados para a Nek4 (Tabela 7). Dentre esses, a serina na posição 340 apareceu fosforilada em todos os experimentos, para as duas isoformas. Os resíduos que teoricamente seriam fosforilados no *loop* de ativação não foram encontrados no nosso IP/MS.

Surpreendentemente, foram encontrados peptídeos que continham as serinas S457 e S461 (região que seria codificada pela sequência Alu e, consequentemente deveria estar ausente nas amostras da Nek4.2) fosforiladas para as duas isoformas, indicando que a isoforma 1 (Nek4.1) teria imunoprecipitado juntamente com a isoforma 2 (Nek4.2). Esse resultado é muito interessante, uma vez que aponta para a possibilidade da dimerização da Nek4.

Quando se analisa a predição para fosforilação de sítios que apresentam consenso para Nek6 são apontados 12 resíduos como potenciais alvos dessa quinase, nenhum deles correspondendo ao *loop* de ativação. Mas o consenso contendo a serina 340 seria reconhecido, segundo o preditor, exclusivamente pela Nek6 sugerindo que esta então

poderia ser o alvo para autofosforilação permitindo então a dimerização da Nek4, num mecanismo diferente do relatado para as outras Neks.

Tabela 7: Sítios fosforilados identificados no experimento de IP/Ms

Peptídeos	Resíduo	Isoformas	Potencial quinase
DQSLALSPK	S457	Nek4.1 (3E) Nek4.2 (2E)	PLK1, GSK3
	S461	Nek4.1 (3E) Nek4.2 (2E)	CLK1, CDK1, Nek6
ASGLLKSPASLK	S340	Nek4.1 (3E) Nek4.2 (4E)	Nek6
DLFAFQESP	S563	Nek4.1 (1E)	CDK1 e 2
QIHCLSEDELSSSTSSTDK	S677	Nek4.1 (2E) Nek4.2 (2E)	CK2
	S682	Nek4.1 (1E)	GSK3
RLSSDCSVTQCER	S661	Nek4.1 (1E)	PKA, GSK3, CAMK2

E: número de experimentos em que foi encontrado o resíduo fosforilado

A fonte das potenciais quinase é o preditor PHOSIDA

Conclusões

5. Conclusões

A Nek4 é um dos onze membros da família das proteínas quinases humanas Neks. Embora já tenha sido relacionada à função ciliar, estabilização de microtúbulos e resposta ao DNA danificado, seu papel, substratos e ativadores relacionados a essas funções ainda não foram caracterizados. Este estudo, tendo como objetivo principal melhor caracterizar a hNek4, relacionando sua rede de interações com suas possíveis funções biológicas, permite expandir a participação da família das proteínas Neks para novos processos biológicos ainda não descritos. Ainda, no decorrer desse estudo foi possível identificar uma nova isoforma para a Nek4, por nós denominada Nek4.2. Essa isoforma apresenta sequência codificadora muito similar a Nek4 de camundongo e difere da sequência canônica humana (Nek4.1) descrita nos bancos de dados por esta última apresentar uma inserção correspondente a uma sequência Alu. A sequência codificadora identificada neste estudo foi submetida ao banco de dados *GenBank* a fim de atualizar as informações existentes a respeito dessa proteína.

Através da rede de interações para cada isoforma, obtida a partir do experimento de IP/MS, é possível inferir que a inserção apresentada pela isoforma 1 tenha proporcionado a esta maior expressão e aquisição de novos parceiros de interação. Os resultados aqui apresentados estendem o conhecimento atual sobre os processos biológicos dos quais a Nek4 participa e nesse contexto, a nova isoforma, Nek4.2, é envolvida no processamento de RNAm, apoptose e transcrição, todos processos ainda não descritos para a família Nek. Curiosamente, a Nek4.1, além de compartilhar essas funções com a isoforma 2, ainda agrega funções como manutenção ciliar e resposta ao DNA danificado, já descritas para outras Neks. Todos esses processos parecem estar interconectados e, a Nek4 parece integrar os mesmos controlando a resposta celular a diferentes tipos de estresse, regulando, por exemplo, a expressão, localização e qualidade de proteínas. Ainda, observamos a localização da Nek4 em diferentes compartimentos celulares como estruturas subnucleares (corpos PML e *speckles* nucleares) e mitocôndria.

Nossos resultados dos experimentos utilizando diferentes agentes causadores de dano ao DNA sugerem que a participação da Nek4 na resposta ao DNA danificado parece variar conforme o tipo de estímulo e tempo de recuperação. Células expostas a radiação ionizante ou peróxido de hidrogênio apresentam acentuada marcação para Nek4 1-2 h após

a exposição ao dano e esta é coincidente com a localização da γ H2AX. Já quando as células são expostas a radiação ultravioleta, a marcação da Nek4 no núcleo também aumenta, contudo, não nos mesmos locais da marcação da γ H2AX.

Uma melhor caracterização das interações da Nek4 seria fundamental para compreensão dos processos dos quais a Nek4 participa, principalmente processamento do RNAm, apoptose e regulação da transcrição. Ainda, os estudos caracterizando as duas isoformas devem ser aprofundados, para melhor compreender o que a expressão dessas duas isoformas proporciona, principalmente no contexto da produção de ROS, uma vez que nossos resultados preliminares apontaram para papéis opostos das duas isoformas nesse âmbito. Seria a isoforma 2 uma antagonista da isoforma 1 nessa função, por não interagir com proteínas-chave ou por interagir e não apresentar a mesma atividade, dessa forma impedindo a ligação e atividade da isoforma 1? As duas isoformas apresentariam localização celular diferente? Ou ainda, poderiam apresentar expressão diferenciada frente a determinados estímulos e, nesse caso a expressão de uma modificar a função normalmente executada pela outra?

Nas predições de localização celular realizadas por nós não foi observada diferença em relação a isso. Assim como não observamos diferenças em relação a distribuição celular dessas proteínas através do fracionamento celular. Embora estudos de imunofluorescência sejam ainda necessários para confirmar essa constatação, uma possibilidade seria que além dos níveis de expressão condicionados por estresse, a localização celular dessas isoformas também poderia ser alterada nessa situação.

Considerando ainda a análise dos sítios de fosforilação e então a conclusão de que a isoforma 1 é encontrada no imunoprecipitado da isoforma 2, poder-se-ia sugerir que existe um mecanismo de regulação da função da Nek4 através da formação de homo ou heterodímero, sendo que em condições específicas poderia aumentar a expressão da Nek4.2 e favorecer a formação do heterodímero, regulando por exemplo, negativamente a função do homodímero da Nek4.1.

Assim como nossos resultados, os dados existentes na literatura associam a função da Nek4 a momentos celulares específicos, como resposta a quimioterápicos (Doles e Heman, 2010) e resposta a etoposídeo ou radiação ionizante (Nguyen *et al.*, 2012). Seria

então a Nek4 uma Nek, que poderia desempenhar as mesmas funções de outras Neks, mas, em condições específicas?

Embora nossos resultados abram um leque de muitas perguntas, também sugerem novas possibilidades, que, após profunda exploração, podem definir vias de sinalização de diferentes processos biológicos das quais a Nek4 participa ou mesmo conecta.

Perspectivas

6. Perspectivas

Os resultados aqui apresentados sugerem o envolvimento da Nek4 em diferentes funções biológicas e uma atuação particular em funções já relatadas na literatura como resposta ao DNA danificado. Assim, explorar e caracterizar as interações aqui apresentadas nos processos biológicos correspondentes é fundamental para determinar a importância da Nek4 na célula.

Diante disso, como perspectivas para o estudo da Nek4 estão:

- Caracterizar o papel da Nek4 no processamento de RNAm e verificar se esta atividade está restrita a algum momento celular específico;
- Caracterizar o efeito da Nek4 na regulação dos níveis de ROS, se esta é direta; através da proteína de canal ANT3 ou da peroxiredoxina ou indireta pela interação com TRAP1;
- Verificar, utilizando-se mutantes para o domínio quinase ou para a serina encontrada fosforilada em nosso experimento de IP/MS, a ocorrência de dímero;
- Caracterizar temporalmente a resposta da Nek4 a diferentes agentes danificadores de DNA, como níveis de expressão ao longo do tempo e translocação entre os compartimentos celulares, núcleo (ou mesmo PML e *speckle* nucleares) e mitocôndria;
- Através da utilização de mutantes para o domínio quinase, identificar os substratos para a Nek4.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Ahmed, S.; Thomas, G.; Ghousaini, M.; Healey, C. S.; Humphreys, M. K.; Platte, R.; Morrison, J.; Maranian, M.; Pooley, K. A.; Luben, R.; Eccles, D.; Evans, D. G.; Fletcher, O.; Johnson, N.; Dos Santos Silva, I.; Peto, J.; Stratton, M. R.; Rahman, N.; Jacobs, K.; Prentice, R.; Anderson, G. L.; Rajkovic, A.; Curb, J. D.; Ziegler, R. G.; Berg, C. D.; Buys, S. S.; Mccarty, C. A.; Feigelson, H. S.; Calle, E. E.; Thun, M. J.; *et al.* Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. **Nat Genet**, v. 41, n. 5, p. 585-90, 2009.
- Amoroso, M. R.; Matassa, D. S.; Laudiero, G.; Egorova, A. V.; Polishchuk, R. S.; Maddalena, F.; Piscazzi, A.; Paladino, S.; Sarnataro, D.; Garbi, C.; Landriscina, M.; Esposito, F. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 4, p. 592-604, 2012.
- Andreasson, U.; Dictor, M.; Jerkeman, M.; Berglund, M.; Sundstrom, C.; Linderroth, J.; Rosenquist, R.; Borrebaeck, C. A.; Ek, S. Identification of molecular targets associated with transformed diffuse large B cell lymphoma using highly purified tumor cells. **Am J Hematol**, v. 84, n. 12, p. 803-8, 2009.
- Apostolovic, B.; Danial, M.; Klok, H. A. Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials. **Chem Soc Rev**, v. 39, n. 9, p. 3541-75, 2010.
- Balajee, A. S.; Proietti De Santis, L.; Brosh, R. M., Jr.; Selzer, R.; Bohr, V. A. Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 4, p. 477-89, 2000.
- Banath, J. P.; Olive, P. L. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. **Cancer Res**, v. 63, n. 15, p. 4347-50, 2003.
- Bannai, H.; Tamada, Y.; Maruyama, O.; Nakai, K.; Miyano, S. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. **Bioinformatics**, v. 18, n. 2, p. 298-305, 2002.
- Barbagallo, F.; Paronetto, M. P.; Franco, R.; Chieffi, P.; Dolci, S.; Fry, A. M.; Geremia, R.; Sette, C. Increased expression and nuclear localization of the centrosomal kinase Nek2 in human testicular seminomas. **J Pathol**, v. 217, n. 3, p. 431-41, 2009.
- Barnes, D. E.; Lindahl, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet**, v. 38, p. 445-76, 2004.
- Belham, C.; Roig, J.; Caldwell, J. A.; Aoyama, Y.; Kemp, B. E.; Comb, M.; Avruch, J. A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nerccl/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 34897-909, 2003.
- Belyantseva, I. A.; Boger, E. T.; Naz, S.; Frolenkov, G. I.; Sellers, J. R.; Ahmed, Z. M.; Griffith, A. J.; Friedman, T. B. Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. **Nat Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 148-56, 2005.
- Benjamin, S.; Weidberg, H.; Rapaport, D.; Pekar, O.; Nudelman, M.; Segal, D.; Hirschberg, K.; Katzav, S.; Ehrlich, M.; Horowitz, M. EHD2 mediates trafficking from the plasma membrane by modulating Rac1 activity. **Biochem J**, v. 439, n. 3, p. 433-42, 2011.
- Berglund, L.; Bjorling, E.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Asplund, A.; Szgyarto, C. A.; Persson, A.; Ottosson, J.; Wernerus, H.; Nilsson, P.; Lundberg, E.; Sivertsson, A.; Navani, S.; Wester, K.; Kampf, C.; Hober, S.; Ponten, F.; Uhlen, M. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 2019-27, 2008.
- Bertran, M. T.; Sdelci, S.; Regue, L.; Avruch, J.; Caelles, C.; Roig, J. Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. **EMBO J**, v. 30, n. 13, p. 2634-47, 2011.
- Bisgrove, B. W.; Yost, H. J. The roles of cilia in developmental disorders and disease. **Development**, v. 133, n. 21, p. 4131-43, 2006.
- Blom, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1633-

49, 2004.

Boldt, K.; Van Reeuwijk, J.; Gloeckner, C. J.; Ueffing, M.; Roepman, R. Tandem affinity purification of ciliopathy-associated protein complexes. **Methods Cell Biol**, v. 91, p. 143-60, 2009.

Bowers, A. J.; Boylan, J. F. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. **Gene**, v. 328, p. 135-42, 2004.

Brameier, M.; Krings, A.; Maccallum, R. M. NucPred--predicting nuclear localization of proteins. **Bioinformatics**, v. 23, n. 9, p. 1159-60, 2007.

Brenner, C.; Grimm, S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4744-56, 2006.

Bressan, G. C.; Quaresma, A. J.; Moraes, E. C.; Manfiolli, A. O.; Passos, D. O.; Gomes, M. D.; Kobarg, J. Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. **FEBS J**, v. 276, n. 14, p. 3770-83, 2009.

Bryson, K.; McGuffin, L. J.; Marsden, R. L.; Ward, J. J.; Sodhi, J. S.; Jones, D. T. Protein structure prediction servers at University College London. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Web Server issue, p. W36-8, 2005.

Canman, J. C.; Wells, W. A. Rappaport furrows on our minds: the ASCB Cytokinesis Meeting Burlington, VT July 22-25, 2004. **J Cell Biol**, v. 166, n. 7, p. 943-8, 2004.

Cao, X.; Xia, Y.; Yang, J.; Jiang, J.; Chen, L.; Ni, R.; Li, L.; Gu, Z. Clinical and biological significance of never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) expression in hepatic cell cancer. **Pathol Oncol Res**, v. 18, n. 2, p. 201-7, 2012.

Capra, M.; Nuciforo, P. G.; Confalonieri, S.; Quarto, M.; Bianchi, M.; Nebuloni, M.; Boldorini, R.; Pallotti, F.; Viale, G.; Gishizky, M. L.; Draetta, G. F.; Di Fiore, P. P. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. **Cancer Res**, v. 66, n. 16, p. 8147-54, 2006.

Carter, H.; Samayoa, J.; Hruban, R. H.; Karchin, R. Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM). **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 6, p. 582-7, 2010.

Celeste, A.; Fernandez-Capetillo, O.; Kruhlak, M. J.; Pilch, D. R.; Staudt, D. W.; Lee, A.; Bonner, R. F.; Bonner, W. M.; Nussenzweig, A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 7, p. 675-9, 2003.

Chan, P. M.; Ng, Y. W.; Manser, E. A robust protocol to map binding sites of the 14-3-3 interactome: Cdc25C requires phosphorylation of both S216 and S263 to bind 14-3-3. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 3, p. M110 005157, 2011.

Chang, J.; Baloh, R. H.; Milbrandt, J. The NIMA-family kinase Nek3 regulates microtubule acetylation in neurons. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 13, p. 2274-82, 2009.

Chen, A.; Yanai, A.; Arama, E.; Kilfin, G.; Motro, B. NIMA-related kinases: isolation and characterization of murine nek3 and nek4 cDNAs, and chromosomal localization of nek1, nek2 and nek3. **Gene**, v. 234, n. 1, p. 127-37, 1999.

Chen, C. P.; Chang, T. Y.; Chen, C. Y.; Wang, T. Y.; Tsai, F. J.; Wu, P. C.; Chern, S. R.; Wang, W. Short rib-polydactyly syndrome type II (Majewski): prenatal diagnosis, perinatal imaging findings and molecular analysis of the NEK1 gene. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 51, n. 1, p. 100-5, 2012.

Chen, G. I.; Gingras, A. C. Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 298-305, 2007.

Chen, J.; Li, L.; Zhang, Y.; Yang, H.; Wei, Y.; Zhang, L.; Liu, X.; Yu, L. Interaction of Pin1 with Nek6 and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, n. 4, p. 1059-65, 2006.

Chen, Y.; Chen, C. F.; Riley, D. J.; Chen, P. L. Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR. **Cell Cycle**, v. 10, n. 4, p. 655-63, 2011.

- Chen, Y.; Craigen, W. J.; Riley, D. J. Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. **Cell Cycle**, v. 8, n. 2, p. 257-67, 2009.
- Chen, Y.; Dorn, G. W., 2nd. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 471-5, 2013.
- Chen, Y.; Gaczynska, M.; Osmulski, P.; Polci, R.; Riley, D. J. Phosphorylation by Nek1 regulates opening and closing of voltage dependent anion channel 1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 3, p. 798-803, 2010.
- Chen, Y.; Riley, D. J.; Zheng, L.; Chen, P. L.; Lee, W. H. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49408-16, 2002.
- Choi, H. J.; Lin, J. R.; Vannier, J. B.; Slaats, G. G.; Kile, A. C.; Paulsen, R. D.; Manning, D. K.; Beier, D. R.; Giles, R. H.; Boulton, S. J.; Cimprich, K. A. NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. **Mol Cell**, v. 51, n. 4, p. 423-39, 2013.
- Ciccia, A.; Elledge, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.
- Claros, M. G.; Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **Eur J Biochem**, v. 241, n. 3, p. 779-86, 1996.
- Coene, K. L.; Mans, D. A.; Boldt, K.; Gloeckner, C. J.; Van Reeuwijk, J.; Bolat, E.; Roosing, S.; Letteboer, S. J.; Peters, T. A.; Cremers, F. P.; Ueffing, M.; Roepman, R. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 18, p. 3592-605, 2011.
- Cole, D. G.; Diener, D. R.; Himelblau, A. L.; Beech, P. L.; Fuster, J. C.; Rosenbaum, J. L. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. **J Cell Biol**, v. 141, n. 4, p. 993-1008, 1998.
- Cooper, M. J.; Cox, N. J.; Zimmerman, E. I.; Dewar, B. J.; Duncan, J. S.; Whittle, M. C.; Nguyen, T. A.; Jones, L. S.; Ghose Roy, S.; Smalley, D. M.; Kuan, P. F.; Richards, K. L.; Christopherson, R. I.; Jin, J.; Frye, S. V.; Johnson, G. L.; Baldwin, A. S.; Graves, L. M. Application of multiplexed kinase inhibitor beads to study kinome adaptations in drug-resistant leukemia. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66755, 2013.
- Costantino, E.; Maddalena, F.; Calise, S.; Piscazzi, A.; Tirino, V.; Fersini, A.; Ambrosi, A.; Neri, V.; Esposito, F.; Landriscina, M. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells. **Cancer Lett**, v. 279, n. 1, p. 39-46, 2009.
- Cregan, S. P.; Fortin, A.; Maclaurin, J. G.; Callaghan, S. M.; Cecconi, F.; Yu, S. W.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Park, D. S.; Kroemer, G.; Slack, R. S. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J Cell Biol**, v. 158, n. 3, p. 507-17, 2002.
- D'andrea, L. D.; Regan, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 12, p. 655-62, 2003.
- Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-19, 2004.
- Dantzer, F.; De La Rubia, G.; Menissier-De Murcia, J.; Hostomsky, Z.; De Murcia, G.; Schreiber, V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Biochemistry**, v. 39, n. 25, p. 7559-69, 2000.
- De Souza, C. P.; Osmani, A. H.; Wu, L. P.; Spotts, J. L.; Osmani, S. A. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v. 102, n. 3, p. 293-302, 2000.
- De, T. H. E.; Riviere, M.; Bernhard, W. [Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma]. **Bull Assoc Fr Etud Cancer**, v. 47, p. 570-84, 1960.
- De Vos, S.; Hofmann, W. K.; Grogan, T. M.; Krug, U.; Schrage, M.; Miller, T. P.; Braun, J. G.; Wachsman, W.; Koeffler, H. P.; Said, J. W. Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. **Lab Invest**, v. 83, n. 2, p. 271-85, 2003.

- Dellaire, G.; Ching, R. W.; Dehghani, H.; Ren, Y.; Bazett-Jones, D. P. The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 6, p. 1026-33, 2006.
- Delprat, B.; Michel, V.; Goodyear, R.; Yamasaki, Y.; Michalski, N.; El-Amraoui, A.; Perfettini, I.; Legrain, P.; Richardson, G.; Hardelin, J. P.; Petit, C. Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 3, p. 401-10, 2005.
- Doles, J.; Hemann, M. T. Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. **Cancer Res**, v. 70, n. 3, p. 1033-41, 2010.
- Ebermann, I.; Scholl, H. P.; Charbel Issa, P.; Becirovic, E.; Lamprecht, J.; Jurklies, B.; Millan, J. M.; Aller, E.; Mitter, D.; Bolz, H. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. **Hum Genet**, v. 121, n. 2, p. 203-11, 2007.
- Edmond, V.; Moysan, E.; Khochbin, S.; Matthias, P.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Gazzeri, S.; Eymin, B. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. **EMBO J**, v. 30, n. 3, p. 510-23, 2011.
- Egeberg, D. L.; Lethan, M.; Manguso, R.; Schneider, L.; Awan, A.; Jorgensen, T. S.; Byskov, A. G.; Pedersen, L. B.; Christensen, S. T. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. **Cilia**, v. 1, n. 1, p. 15, 2012.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; Von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **J Mol Biol**, v. 300, n. 4, p. 1005-16, 2000.
- Felts, S. J.; Owen, B. A.; Nguyen, P.; Trepel, J.; Donner, D. B.; Toft, D. O. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. **J Biol Chem**, v. 275, n. 5, p. 3305-12, 2000.
- Fields, S. Interactive learning: Lessons from two hybrids over two decades **Proteomics**, v. 9, 5209–5213, 2009.
- Freshney, R. I. Measurement of viability and cytotoxicity. In: Culture of animal cells. 3ed. New York: WILEY-LISS, 1994. p. 287-307.
- Friedberg, E. C.; Aguilera, A.; Gellert, M.; Hanawalt, P. C.; Hays, J. B.; Lehmann, A. R.; Lindahl, T.; Lowndes, N.; Sarasin, A.; Wood, R. D. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. **DNA Repair (Amst)**, v. 5, n. 8, p. 986-96, 2006.
- Friedland-Little, J. M.; Hoffmann, A. D.; Ocbina, P. J.; Peterson, M. A.; Bosman, J. D.; Chen, Y.; Cheng, S. Y.; Anderson, K. V.; Moskowitz, I. P. A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 19, p. 3725-37, 2011.
- Fry, A. M. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. **Oncogene**, v. 21, n. 40, p. 6184-94, 2002.
- Fry, A. M.; Arnaud, L.; Nigg, E. A. Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. **J Biol Chem**, v. 274, n. 23, p. 16304-10, 1999.
- Fry, A. M.; Mayor, T.; Meraldi, P.; Stierhof, Y. D.; Tanaka, K.; Nigg, E. A. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. **J Cell Biol**, v. 141, n. 7, p. 1563-74, 1998.
- Fry, A. M.; Meraldi, P.; Nigg, E. A. A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. **EMBO J**, v. 17, n. 2, p. 470-81, 1998.
- Fry, A. M.; O'regan, L.; Sabir, S. R.; Bayliss, R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 19, p. 4423-33, 2012.
- Fry, A. M.; Schultz, S. J.; Bartek, J.; Nigg, E. A. 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**, v. 270, n. 21, p. 12899-905, 1995.

- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.
- Gnad, F.; Ren, S.; Cox, J.; Olsen, J. V.; Macek, B.; Orosi, M.; Mann, M. PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. **Genome Biol**, v. 8, n. 11, p. R250, 2007.
- Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 5177-81, 1999.
- Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 639-47, 2006.
- Groenendyk, J.; Michalak, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochim Pol**, v. 52, n. 2, p. 381-95, 2005.
- Grosset, C.; Chen, C. Y.; Xu, N.; Sonenberg, N.; Jacquemin-Sablon, H.; Shyu, A. B. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. **Cell**, v. 103, n. 1, p. 29-40, 2000.
- Grosso, A. R.; Martins, S.; Carmo-Fonseca, M. The emerging role of splicing factors in cancer. **EMBO Rep**, v. 9, n. 11, p. 1087-93, 2008.
- Gruneberg, U.; Neef, R.; Li, X.; Chan, E. H.; Chalamalasetty, R. B.; Nigg, E. A.; Barr, F. A. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. **J Cell Biol**, v. 172, n. 3, p. 363-72, 2006.
- Halbritter, J.; Porath, J. D.; Diaz, K. A.; Braun, D. A.; Kohl, S.; Chaki, M.; Allen, S. J.; Soliman, N. A.; Hildebrandt, F.; Otto, E. A. Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. **Hum Genet**, v. 132, n. 8, p. 865-84, 2013.
- Halliwell, B.; Cross, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v. 102 Suppl 10, p. 5-12, 1994.
- Hashimoto, Y.; Akita, H.; Hibino, M.; Kohri, K.; Nakanishi, M. Identification and characterization of Nek6 protein kinase, a potential human homolog of NIMA histone H3 kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 293, n. 2, p. 753-8, 2002.
- Hassa, P. O.; Hottiger, M. O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. **Front Biosci**, v. 13, p. 3046-82, 2008.
- Hayashi, K.; Igarashi, H.; Ogawa, M.; Sakaguchi, N. Activity and substrate specificity of the murine STK2 Serine/Threonine kinase that is structurally related to the mitotic regulator protein NIMA of *Aspergillus nidulans*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, n. 2, p. 449-56, 1999.
- Helps, N. R.; Luo, X.; Barker, H. M.; Cohen, P. T. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. **Biochem J**, v. 349, n. Pt 2, p. 509-18, 2000.
- Hinoi, E.; Takarada, T.; Tsuchihashi, Y.; Fujimori, S.; Moriguchi, N.; Wang, L.; Uno, K.; Yoneda, Y. A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 3, p. 925-35, 2006.
- Hoenicka, J.; Arrasate, M.; De Yébenes, J. G.; Avila, J. A two-hybrid screening of human Tau protein: interactions with Alu-derived domain. **Neuroreport**, v. 13, n. 3, p. 343-9, 2002.
- Holloway, K.; Roberson, E. C.; Corbett, K. L.; Kolas, N. K.; Nieves, E.; Cohen, P. E. NEK1 Facilitates Cohesin Removal during Mammalian Spermatogenesis. **Genes (Basel)**, v. 2, n. 1, p. 260-279, 2011.
- Hong, S. J.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 5, p. 259-64, 2004.
- Hornbeck, P. V.; Chabra, I.; Kornhauser, J. M.; Skrzypek, E.; Zhang, B. PhosphoSite: A bioinformatics

- resource dedicated to physiological protein phosphorylation. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1551-61, 2004.
- Huber, A. H.; Nelson, W. J.; Weis, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 871-82, 1997.
- Huse, M.; Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 275-82, 2002.
- Jackson, S. P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, 2009.
- Jee, H. J.; Kim, A. J.; Song, N.; Kim, H. J.; Kim, M.; Koh, H.; Yun, J. Nek6 overexpression antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. **Cell Cycle**, v. 9, n. 23, p. 4703-10, 2010.
- Ji, Y.; Tulin, A. V. Post-transcriptional regulation by poly(ADP-ribosyl)ation of the RNA-binding proteins. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 16168-83, 2013.
- John, G. B.; Shang, Y.; Li, L.; Renken, C.; Mannella, C. A.; Selker, J. M.; Rangell, L.; Bennett, M. J.; Zha, J. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 3, p. 1543-54, 2005.
- Joza, N.; Susin, S. A.; Daugas, E.; Stanford, W. L.; Cho, S. K.; Li, C. Y.; Sasaki, T.; Elia, A. J.; Cheng, H. Y.; Ravagnan, L.; Ferri, K. F.; Zamzami, N.; Wakeham, A.; Hakem, R.; Yoshida, H.; Kong, Y. Y.; Mak, T. W.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Kroemer, G.; Penninger, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549-54, 2001.
- Kamileri, I.; Karakasilioti, I.; Garinis, G. A. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. **Trends Genet**, v. 28, n. 11, p. 566-73, 2012.
- Kanamaru, Y.; Sekine, S.; Ichijo, H.; Takeda, K. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 931215, 2012.
- Kaneta, Y.; Ullrich, A. NEK9 depletion induces catastrophic mitosis by impairment of mitotic checkpoint control and spindle dynamics. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 442, n. 3-4, p. 139-46, 2013.
- Kang, B. H. TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors. **BMB Rep**, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2012.
- Kapitonov, V.; Jurka, J. The age of Alu subfamilies. **J Mol Evol**, v. 42, n. 1, p. 59-65, 1996.
- Karmakar, P.; Balajee, A. S.; Natarajan, A. T. Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines. **Mutagenesis**, v. 16, n. 3, p. 225-32, 2001.
- Kasap, E.; Boyacioglu, S. O.; Korkmaz, M.; Yuksel, E. S.; Unsal, B.; Kahraman, E.; Ozutemiz, O.; Yuceyar, H. Aurora kinase A (AURKA) and never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) genes are upregulated in erosive esophagitis and esophageal adenocarcinoma. **Exp Ther Med**, v. 4, n. 1, p. 33-42, 2012.
- Kasof, G. M.; Goyal, L.; White, E. Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 6, p. 4390-404, 1999.
- Kastan, M. B.; Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-23, 2004.
- Kepkay, R.; Attwood, K. M.; Ziv, Y.; Shiloh, Y.; Dellaire, G. KAP1 depletion increases PML nuclear body number in concert with ultrastructural changes in chromatin. **Cell Cycle**, v. 10, n. 2, p. 308-22, 2011.
- Kersten, F. F.; Van Wijk, E.; Van Reeuwijk, J.; Van Der Zwaag, B.; Marker, T.; Peters, T. A.; Katsanis, N.; Wolfrum, U.; Keunen, J. E.; Roepman, R.; Kremer, H. Association of whirlin with Cav1.3 (alpha1D) channels in photoreceptors, defining a novel member of the usher protein network. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 5, p. 2338-46, 2010.
- Kikkawa, Y.; Mburu, P.; Morse, S.; Kominami, R.; Townsend, S.; Brown, S. D. Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 3, p. 391-400, 2005.
- Kim, S.; Lee, K.; Rhee, K. NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. **Biochem**

Biophys Res Commun, v. 360, n. 1, p. 56-62, 2007.

Kim, S.; Rhee, K. NEK7 is essential for centriole duplication and centrosomal accumulation of pericentriolar material proteins in interphase cells. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 22, p. 3760-70, 2011.

Kim, T. D.; Kim, J. S.; Kim, J. H.; Myung, J.; Chae, H. D.; Woo, K. C.; Jang, S. K.; Koh, D. S.; Kim, K. T. Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 8, p. 3232-46, 2005.

Kluck, R. M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1132-6, 1997.

Koegl, M. e Uetz, P. Improving yeast two-hybrid screening systems. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v 6, n 4. 302-312, 2008.

Kohler, M. E.; Johnson, B. D.; Palen, K.; Chen, Q. R.; Khan, J.; Orentas, R. J. Tumor antigen analysis in neuroblastoma by serological interrogation of bioinformatic data. **Cancer Sci**, v. 101, n. 11, p. 2316-24, 2010.

Kokuryo, T.; Senga, T.; Yokoyama, Y.; Nagino, M.; Nimura, Y.; Hamaguchi, M. Nek2 as an effective target for inhibition of tumorigenic growth and peritoneal dissemination of cholangiocarcinoma. **Cancer Res**, v. 67, n. 20, p. 9637-42, 2007.

Kornblihtt, A. R.; Schor, I. E.; Allo, M.; Dujardin, G.; Petrillo, E.; Munoz, M. J. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 153-65, 2013.

Kosugi, S.; Hasebe, M.; Tomita, M.; Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 25, p. 10171-6, 2009.

Kremer, H.; Van Wijk, E.; Marker, T.; Wolfrum, U.; Roepman, R. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 2, p. R262-70, 2006.

Kumarswamy, R.; Chandna, S. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? **Mitochondrion**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2009.

Kurasawa, Y.; Earnshaw, W. C.; Mochizuki, Y.; Dohmae, N.; Todokoro, K. Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. **EMBO J**, v. 23, n. 16, p. 3237-48, 2004.

La Cour, T.; Kiemer, L.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Skriver, K.; Brunak, S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. **Protein Eng Des Sel**, v. 17, n. 6, p. 527-36, 2004.

Lallemand-Breitenbach, V.; De The, H. PML nuclear bodies. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 5, p. a000661, 2010.

Lamond, A. I.; Sleeman, J. E. Nuclear substructure and dynamics. **Curr Biol**, v. 13, n. 21, p. R825-8, 2003.

Landi, M. T.; Dracheva, T.; Rotunno, M.; Figueroa, J. D.; Liu, H.; Dasgupta, A.; Mann, F. E.; Fukuoka, J.; Hames, M.; Bergen, A. W.; Murphy, S. E.; Yang, P.; Pesatori, A. C.; Consonni, D.; Bertazzi, P. A.; Wacholder, S.; Shih, J. H.; Caporaso, N. E.; Jen, J. Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1651, 2008.

Landriscina, M.; Laudiero, G.; Maddalena, F.; Amoroso, M. R.; Piscazzi, A.; Cozzolino, F.; Monti, M.; Garbi, C.; Fersini, A.; Pucci, P.; Esposito, F. Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antitlastic agents. **Cancer Res**, v. 70, n. 16, p. 6577-86, 2010.

Lapenna, S.; Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 547-66, 2009.

Leav, I.; Plescia, J.; Goel, H. L.; Li, J.; Jiang, Z.; Cohen, R. J.; Languino, L. R.; Altieri, D. C. Cytoprotective mitochondrial chaperone TRAP-1 as a novel molecular target in localized and metastatic prostate cancer. **Am J Pathol**, v. 176, n. 1, p. 393-401, 2010.

- Leboucher, G. P.; Tsai, Y. C.; Yang, M.; Shaw, K. C.; Zhou, M.; Veenstra, T. D.; Glickman, M. H.; Weissman, A. M. Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. **Mol Cell**, v. 47, n. 4, p. 547-57, 2012.
- Lee, M. Y.; Kim, H. J.; Kim, M. A.; Jee, H. J.; Kim, A. J.; Bae, Y. S.; Park, J. I.; Chung, J. H.; Yun, J. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2705-9, 2008.
- Lee, Y. J.; Wei, H. M.; Chen, L. Y.; Li, C. Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli. **FEBS J**, v. 281, n. 1, p. 352-64, 2014.
- Lee, Y. Y.; Yu, Y. B.; Gunawardena, H. P.; Xie, L.; Chen, X. BCLAF1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in gammaH2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair. **Cell Death Dis**, v. 3, p. e359, 2012.
- Lei, Z.; Dai, Y. An SVM-based system for predicting protein subnuclear localizations. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 291, 2005.
- Lenzken, S. C.; Loffreda, A.; Barabino, S. M. RNA Splicing: A New Player in the DNA Damage Response. **Int J Cell Biol**, v. 2013, p. 153634, 2013.
- 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**, v. 11, n. 10, p. 3521-31, 1992.
- Li, W. H.; Gu, Z.; Wang, H.; Nekrutenko, A. Evolutionary analyses of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 847-9, 2001.
- Lindahl, T.; Wood, R. D. Quality control by DNA repair. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1897-905, 1999.
- Lipton, S. A.; Bossy-Wetzel, E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. **Cell**, v. 111, n. 2, p. 147-50, 2002.
- Liu, L.; Trimarchi, J. R.; Keefe, D. L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biol Reprod**, v. 62, n. 6, p. 1745-53, 2000.
- Liu, L.; Xie, H.; Chen, X.; Shi, W.; Xiao, X.; Lei, D.; Li, J. Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **Clin Exp Dermatol**, v. 37, n. 7, p. 772-80, 2012.
- Liu, Q.; Hirohashi, Y.; Du, X.; Greene, M. I.; Wang, Q. Nek2 targets the mitotic checkpoint proteins Mad2 and Cdc20: a mechanism for aneuploidy in cancer. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 2, p. 225-33, 2010.
- Liu, Q.; Zhang, Q.; Pierce, E. A. Photoreceptor sensory cilia and inherited retinal degeneration. **Adv Exp Med Biol**, v. 664, p. 223-32, 2010.
- Liu, S.; Ho, C. K.; Ouyang, J.; Zou, L. Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 6, p. 2175-80, 2013.
- Liu, S.; Lu, W.; Obara, T.; Kuida, S.; Lehoczy, J.; Dewar, K.; Drummond, I. A.; Beier, D. R. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. **Development**, v. 129, n. 24, p. 5839-46, 2002.
- Liu, X.; Gao, Y.; Lu, Y.; Zhang, J.; Li, L.; Yin, F. Upregulation of NEK2 is associated with drug resistance in ovarian cancer. **Oncol Rep**, v. 31, n. 2, p. 745-54, 2014.
- Mahjoub, M. R.; Trapp, M. L.; Quarmby, L. M. NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 12, p. 3485-9, 2005.
- Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle kinases in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 17, n. 1, p. 60-5, 2007.
- Marcus, A. I.; Peters, U.; Thomas, S. L.; Garrett, S.; Zelnak, A.; Kapoor, T. M.; Giannakakou, P. Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11569-77, 2005.

- Mardin, B. R.; Lange, C.; Baxter, J. E.; Hardy, T.; Scholz, S. R.; Fry, A. M.; Schiebel, E. Components of the Hippo pathway cooperate with Nek2 kinase to regulate centrosome disjunction. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 12, p. 1166-76, 2010.
- Mardin, B. R.; Schiebel, E. Breaking the ties that bind: new advances in centrosome biology. **J Cell Biol**, v. 197, n. 1, p. 11-8, 2012.
- Marina, M.; Saavedra, H. I. Nek2 and Plk4: prognostic markers, drivers of breast tumorigenesis and drug resistance. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 19, p. 352-65, 2014.
- Matsuo, K.; Nishimura, T.; Hayakawa, A.; Ono, Y.; Takahashi, M. Involvement of a centrosomal protein kendrin in the maintenance of centrosome cohesion by modulating Nek2A kinase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 398, n. 2, p. 217-23, 2010.
- Mcfarlane, A. A.; Orriss, G. L.; Stetefeld, J. The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems. **Eur J Pharmacol**, v. 625, n. 1-3, p. 101-7, 2009.
- Mchale, K.; Tomaszewski, J. E.; Puthiyaveetil, R.; Livolsi, V. A.; Clevenger, C. V. Altered expression of prolactin receptor-associated signaling proteins in human breast carcinoma. **Mod Pathol**, v. 21, n. 5, p. 565-71, 2008.
- Meirelles, G. V.; Silva, J. C.; Mendonca Yde, A.; Ramos, C. H.; Torriani, I. L.; Kobarg, J. Human Nek6 is a monomeric mostly globular kinase with an unfolded short N-terminal domain. **BMC Struct Biol**, v. 11, p. 12, 2011.
- Meirelles, G. V.; Perez, A. M.; Souza, E. E.; Basei, F. L.; Papa, P. F.; Hanchuk, T. D. M.; Cardoso, V. B.; Kobarg, J. "Stop Ne(c)king around": How systems biology can help to characterize the functions of Nek family kinases from cell cycle regulation to DNA damage response. **World J Biol Chem In Press**. 2014.
- Melixetian, M.; Klein, D. K.; Sorensen, C. S.; Helin, K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 10, p. 1247-53, 2009.
- Miller, S. L.; Antico, G.; Raghunath, P. N.; Tomaszewski, J. E.; Clevenger, C. V. Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 26, n. 32, p. 4668-78, 2007.
- Miller, S. L.; Demaria, J. E.; Freier, D. O.; Riegel, A. M.; Clevenger, C. V. Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 4, p. 939-49, 2005.
- Mogensen, M. M.; Rzadzinska, A.; Steel, K. P. The deaf mouse mutant whirler suggests a role for whirlin in actin filament dynamics and stereocilia development. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 7, p. 496-508, 2007.
- Moniz, L.; Dutt, P.; Haider, N.; Stambolic, V. Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. **Cell Div**, v. 6, p. 18, 2011.
- Moniz, L. S.; Stambolic, V. Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 1, p. 30-42, 2011.
- Montesano Gesualdi, N.; Chirico, G.; Pirozzi, G.; Costantino, E.; Landriscina, M.; Esposito, F. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. **Stress**, v. 10, n. 4, p. 342-50, 2007.
- Morris, N. R. A temperature-sensitive mutant of *Aspergillus nidulans* reversibly blocked in nuclear division. **Exp Cell Res**, v. 98, n. 1, p. 204-10, 1976.
- Muller, S.; Ledl, A.; Schmidt, D. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 1998-2008, 2004.
- Neal, J. A.; Meek, K. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? **Mutat Res**, v. 711, n. 1-2, p. 73-86, 2011.
- Nekrutenko, A.; Li, W. H. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. **Trends Genet**, v. 17, n. 11, p. 619-21, 2001.

- Nguyen, C. L.; Possemato, R.; Bauerlein, E. L.; Xie, A.; Scully, R.; Hahn, W. C. Nek4 regulates entry into replicative senescence and the response to DNA damage in human fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 32, n. 19, p. 3963-77, 2012.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Eng**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1997.
- Nigg, E. A.; Blangy, A.; Lane, H. A. Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. **Exp Cell Res**, v. 229, n. 2, p. 174-80, 1996.
- 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**, v. 277, n. 42, p. 39655-65, 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**, v. 279, n. 31, p. 32716-27, 2004.
- Nolen, B.; Taylor, S.; Ghosh, G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. **Mol Cell**, v. 15, n. 5, p. 661-75, 2004.
- Obenauer, J. C.; Cantley, L. C.; Yaffe, M. B. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3635-41, 2003.
- O'connell, M. J.; Krien, M. J.; Hunter, T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. **Trends Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 221-8, 2003.
- Oh, K. S.; Bustin, M.; Mazur, S. J.; Appella, E.; Kraemer, K. H. UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 10, n. 1, p. 5-15, 2011.
- O'regan, L.; Fry, A. M. The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 14, p. 3975-90, 2009.
- Otto, E. A.; Trapp, M. L.; Schultheiss, U. T.; Helou, J.; Quarmby, L. M.; Hildebrandt, F. NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 587-92, 2008.
- Ow, Y. P.; Green, D. R.; Hao, Z.; Mak, T. W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 532-42, 2008.
- Pan, L.; Zhang, M. Structures of usher syndrome 1 proteins and their complexes. **Physiology (Bethesda)**, v. 27, n. 1, p. 25-42, 2012.
- Pastor, T.; Talotti, G.; Lewandowska, M. A.; Pagani, F. An Alu-derived intronic splicing enhancer facilitates intronic processing and modulates aberrant splicing in ATM. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 21, p. 7258-67, 2009.
- Pelegrini, A. L.; Moura, D. J.; Brenner, B. L.; Ledur, P. F.; Maques, G. P.; Henriques, J. A.; Saffi, J.; Lenz, G. Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 447-54, 2010.
- Pierleoni, A.; Martelli, P. L.; Fariselli, P.; Casadio, R. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. e408-16, 2006.
- Piperno, G.; Mead, K. Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of Chlamydomonas flagella. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4457-62, 1997.
- Plotnikova, O. V.; Pugacheva, E. N.; Golemis, E. A. Primary cilia and the cell cycle. **Methods Cell Biol**, v. 94, p. 137-60, 2009.
- Polci, R.; Peng, A.; Chen, P. L.; Riley, D. J.; Chen, Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. **Cancer Res**, v. 64, n. 24, p. 8800-3, 2004.
- Polo, S. E.; Jackson, S. P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. **Genes Dev**, v. 25, n. 5, p. 409-33, 2011.

- Prigent, C.; Glover, D. M.; Giet, R. *Drosophila* Nek2 protein kinase knockdown leads to centrosome maturation defects while overexpression causes centrosome fragmentation and cytokinesis failure. **Exp Cell Res**, v. 303, n. 1, p. 1-13, 2005.
- Prilusky, J.; Felder, C. E.; Zeev-Ben-Mordehai, T.; Rydberg, E. H.; Man, O.; Beckmann, J. S.; Silman, I.; Sussman, J. L. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3435-8, 2005.
- Probst, F. J.; Fridell, R. A.; Raphael, Y.; Saunders, T. L.; Wang, A.; Liang, Y.; Morell, R. J.; Touchman, J. W.; Lyons, R. H.; Noben-Trauth, K.; Friedman, T. B.; Camper, S. A. Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1444-7, 1998.
- Prosser, H. M.; Rzadzinska, A. K.; Steel, K. P.; Bradley, A. Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 5, p. 1702-12, 2008.
- Pu, R. T.; Osmani, S. A. Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* is required for mitotic exit. **EMBO J**, v. 14, n. 5, p. 995-1003, 1995.
- Quaresma, A. J.; Bressan, G. C.; Gava, L. M.; Lanza, D. C.; Ramos, C. H.; Kobarg, J. Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 6, p. 968-80, 2009.
- Quarmby, L. M.; Mahjoub, M. R. Caught Nek-ing: cilia and centrioles. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 22, p. 5161-9, 2005.
- Rapley, J.; Baxter, J. E.; Blot, J.; Wattam, S. L.; Casenghi, M.; Meraldi, P.; Nigg, E. A.; Fry, A. M. Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 4, p. 1309-24, 2005.
- Rapley, J.; Nicolas, M.; Groen, A.; Regue, L.; Bertran, M. T.; Caelles, C.; Avruch, J.; Roig, J. The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 23, p. 3912-21, 2008.
- Rellos, P.; Ivins, F. J.; Baxter, J. E.; Pike, A.; Nott, T. J.; Parkinson, D. M.; Das, S.; Howell, S.; Fedorov, O.; Shen, Q. Y.; Fry, A. M.; Knapp, S.; Smerdon, S. J. Structure and regulation of the human Nek2 centrosomal kinase. **J Biol Chem**, v. 282, n. 9, p. 6833-42, 2007.
- Ren, J.; Gao, X.; Jin, C.; Zhu, M.; Wang, X.; Shaw, A.; Wen, L.; Yao, X.; Xue, Y. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. **Proteomics**, v. 9, n. 12, p. 3409-3412, 2009.
- Richards, M. W.; O'regan, L.; Mas-Droux, C.; Blot, J. M.; Cheung, J.; Hoelder, S.; Fry, A. M.; Bayliss, R. An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycle-regulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. **Mol Cell**, v. 36, n. 4, p. 560-70, 2009.
- Rogers, S.; Wells, R.; Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. **Science**, v. 234, n. 4774, p. 364-8, 1986.
- Roig, J.; Groen, A.; Caldwell, J.; Avruch, J. Active Nerccl protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 10, p. 4827-40, 2005.
- Roig, J.; Mikhailov, A.; Belham, C.; Avruch, J. Nerccl, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. **Genes Dev**, v. 16, n. 13, p. 1640-58, 2002.
- Roos, W. P.; Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 440-50, 2006.
- Rostovtseva, T. K.; Sheldon, K. L.; Hassanzadeh, E.; Monge, C.; Saks, V.; Bezrukov, S. M.; Sackett, D. L. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 48, p. 18746-51, 2008.
- Saijo, T.; Ishii, G.; Ochiai, A.; Yoh, K.; Goto, K.; Nagai, K.; Kato, H.; Nishiwaki, Y.; Saijo, N. Eg5 expression is closely correlated with the response of advanced non-small cell lung cancer to antimitotic agents combined with platinum chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 54, n. 2, p. 217-25, 2006.

- Salem, H.; Rachmin, I.; Yissachar, N.; Cohen, S.; Amiel, A.; Haffner, R.; Lavi, L.; Motro, B. Nek7 kinase targeting leads to early mortality, cytokinesis disturbance and polyploidy. **Oncogene**, v. 29, n. 28, p. 4046-57, 2010.
- Scharer, O. D. Chemistry and biology of DNA repair. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 42, n. 26, p. 2946-74, 2003.
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, 2012.
- Schmid, C. W. Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 53, p. 283-319, 1996.
- Schultz, J.; Milpetz, F.; Bork, P.; Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 5857-64, 1998.
- Sdelci, S.; Bertran, M. T.; Roig, J. Nek9, Nek6, Nek7 and the separation of centrosomes. **Cell Cycle**, v. 10, n. 22, p. 3816-7, 2011.
- Sdelci, S.; Schutz, M.; Pinyol, R.; Bertran, M. T.; Regue, L.; Caelles, C.; Vernos, I.; Roig, J. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of gamma-tubulin recruitment to the mitotic centrosome. **Curr Biol**, v. 22, n. 16, p. 1516-23, 2012.
- Sfikas, A.; Batsi, C.; Tselikou, E.; Vartholomatos, G.; Monokrousos, N.; Pappas, P.; Christoforidis, S.; Tzavaras, T.; Kanavaros, P.; Gorgoulis, V. G.; Marcu, K. B.; Kolettas, E. The canonical NF-kappaB pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. **Cell Signal**, v. 24, n. 11, p. 2007-23, 2012.
- Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, v. 13, n. 11, p. 2498-504, 2003.
- Sharma, N.; Kosan, Z. A.; Stallworth, J. E.; Berbari, N. F.; Yoder, B. K. Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. **Mol Biol Cell**, v. 22, n. 6, p. 806-16, 2011.
- Sheldon, K. L.; Maldonado, E. N.; Lemasters, J. J.; Rostovtseva, T. K.; Bezrukov, S. M. Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by serine/threonine kinases governs its interaction with tubulin. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25539, 2011.
- Shen, H. B.; Chou, K. C. Nuc-PLoc: a new web-server for predicting protein subnuclear localization by fusing PseAA composition and PsePSSM. **Protein Eng Des Sel**, v. 20, n. 11, p. 561-7, 2007.
- Shimizu, K.; Sawasaki, T. Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. **FEBS Lett**, v. 587, n. 14, p. 2219-25, 2013.
- Shoshan-Barmatz, V.; De Pinto, V.; Zweckstetter, M.; Raviv, Z.; Keinan, N.; Arbel, N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 3, p. 227-85, 2010.
- Shoshan-Barmatz, V.; Mizrachi, D.; Keinan, N. Oligomerization of the mitochondrial protein VDAC1: from structure to function and cancer therapy. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 117, p. 303-34, 2013.
- Shrestha, A.; Hamilton, G.; O'Neill, E.; Knapp, S.; Elkins, J. M. Analysis of conditions affecting autophosphorylation of human kinases during expression in bacteria. **Protein Expr Purif**, v. 81, n. 1, p. 136-43, 2012.
- Skoblov, M.; Marakhonov, A.; Marakasova, E.; Guskova, A.; Chandhoke, V.; Birerdinc, A.; Baranova, A. Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development. **Bioessays**, v. 35, n. 7, p. 586-96, 2013.
- Smith, L. A.; Bukanov, N. O.; Husson, H.; Russo, R. J.; Barry, T. C.; Taylor, A. L.; Beier, D. R.; Ibraghimov-Beskrovnaya, O. Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n.

10, p. 2821-31, 2006.

Sorensen, C. S.; Melixetian, M.; Klein, D. K.; Helin, K. NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling. **Cell Cycle**, v. 9, n. 3, p. 450-5, 2010.

Steigemann, P.; Gerlich, D. W. Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 606-16, 2009.

Stewart, D. J.; Johnson, C.; Lopez, A.; Glisson, B.; Rhee, J. M.; Bekele, B. N. Extensive disease small cell lung cancer dose-response relationships: implications for resistance mechanisms. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 11, p. 1826-34, 2010.

Stracker, T. H.; Usui, T.; Petrini, J. H. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 9, p. 1047-54, 2009.

Surpili, M. J.; Delben, T. M.; Kobarg, J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. **Biochemistry**, v. 42, n. 51, p. 15369-76, 2003.

Takamura, H.; Koyama, Y.; Matsuzaki, S.; Yamada, K.; Hattori, T.; Miyata, S.; Takemoto, K.; Tohyama, M.; Katayama, T. TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51912, 2012.

Takemoto, K.; Miyata, S.; Takamura, H.; Katayama, T.; Tohyama, M. Mitochondrial TRAP1 regulates the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum. **Neurochem Int**, v. 58, n. 8, p. 880-7, 2011.

Takeno, A.; Takemasa, I.; Doki, Y.; Yamasaki, M.; Miyata, H.; Takiguchi, S.; Fujiwara, Y.; Matsubara, K.; Monden, M. Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. **Br J Cancer**, v. 99, n. 8, p. 1307-15, 2008.

Tan, B. C.; Lee, S. C. Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. **J Biol Chem**, v. 279, n. 10, p. 9321-30, 2004.

Tang, S.; Bao, H.; Zhang, Y.; Yao, J.; Yang, P.; Chen, X. 14-3-3epsilon mediates the cell fate decision-making pathways in response of hepatocellular carcinoma to Bleomycin-induced DNA damage. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e55268, 2013.

Taylor, S. S.; Kornev, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 2, p. 65-77, 2011.

Thiel, C.; Kessler, K.; Giessler, A.; Dimmler, A.; Shalev, S. A.; Von Der Haar, S.; Zenker, M.; Zahnleiter, D.; Stoss, H.; Beinder, E.; Abou Jamra, R.; Ekici, A. B.; Schroder-Kress, N.; Aigner, T.; Kirchner, T.; Reis, A.; Brandstatter, J. H.; Rauch, A. NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. **Am J Hum Genet**, v. 88, n. 1, p. 106-14, 2011.

Tomimatsu, N.; Mukherjee, B.; Burma, S. Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. **EMBO Rep**, v. 10, n. 6, p. 629-35, 2009.

Tsunoda, N.; Kokuryo, T.; Oda, K.; Senga, T.; Yokoyama, Y.; Nagino, M.; Nimura, Y.; Hamaguchi, M. Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. **Cancer Sci**, v. 100, n. 1, p. 111-6, 2009.

Upadhyay, P.; Birkenmeier, E. H.; Birkenmeier, C. S.; Barker, J. E. Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 1, p. 217-21, 2000.

Valentine, M. T.; Gilbert, S. P. To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 75-81, 2007.

Van Reeuwijk, J.; Arts, H. H.; Roepman, R. Scrutinizing ciliopathies by unraveling ciliary interaction networks. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. R2, p. R149-57, 2011.

Vaz Meirelles, G.; Ferreira Lanza, D. C.; Da Silva, J. C.; Santana Bernachi, J.; Paes Leme, A. F.; Kobarg, J. Characterization of hNek6 interactome reveals an important role for its short N-terminal domain and colocalization with proteins at the centrosome. **J Proteome Res**, v. 9, n. 12, p. 6298-316, 2010.

- Wai, D. H.; Schaefer, K. L.; Schramm, A.; Korsching, E.; Van Valen, F.; Ozaki, T.; Boecker, W.; Schweigerer, L.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Poremba, C. Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. **Int J Oncol**, v. 20, n. 3, p. 441-51, 2002.
- Wang, L.; Zou, J.; Shen, Z.; Song, E.; Yang, J. Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 3, p. 692-710, 2012.
- Wang, R.; Song, Y.; Xu, X.; Wu, Q.; Liu, C. The expression of Nek7, FoxM1, and Plk1 in gallbladder cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. **Clin Transl Oncol**, v. 15, n. 8, p. 626-32, 2013.
- Wang, S.; Li, W.; Lv, S.; Wang, Y.; Liu, Z.; Zhang, J.; Liu, T.; Niu, Y. Abnormal expression of Nek2 and beta-catenin in breast carcinoma: clinicopathological correlations. **Histopathology**, v. 59, n. 4, p. 631-42, 2011.
- Wang, X.; Grammatikakis, N.; Siganou, A.; Stevenson, M. A.; Calderwood, S. K. Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 49460-9, 2004.
- Wang, X.; Perez, E.; Liu, R.; Yan, L. J.; Mallet, R. T.; Yang, S. H. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Brain Res**, v. 1132, n. 1, p. 1-9, 2007.
- Ward, A. J.; Cooper, T. A. The pathobiology of splicing. **J Pathol**, v. 220, n. 2, p. 152-63, 2010.
- Wei, R.; Ngo, B.; Wu, G.; Lee, W. H. Phosphorylation of the Ndc80 complex protein, HEC1, by Nek2 kinase modulates chromosome alignment and signaling of the spindle assembly checkpoint. **Mol Biol Cell**, v. 22, n. 19, p. 3584-94, 2011.
- Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 872-84, 2010.
- White, M. C.; Quarmby, L. M. The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. **BMC Cell Biol**, v. 9, p. 29, 2008.
- Won, J.; Kim, D. Y.; La, M.; Kim, D.; Meadows, G. G.; Joe, C. O. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 19347-51, 2003.
- Wong, S. Y.; Seol, A. D.; So, P. L.; Ermilov, A. N.; Bichakjian, C. K.; Epstein, E. H., Jr.; Dlugosz, A. A.; Reiter, J. F. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. **Nat Med**, v. 15, n. 9, p. 1055-61, 2009.
- Wright, R. N.; Hong, D. H.; Perkins, B. RprORF15 connects to the usher protein network through direct interactions with multiple whirlin isoforms. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 3, p. 1519-29, 2012.
- Wu, Z.; Doondea, J. B.; Gholami, A. M.; Janning, M. C.; Lemeer, S.; Kramer, K.; Eccles, S. A.; Gollin, S. M.; Grenman, R.; Walch, A.; Feller, S. M.; Kuster, B. Quantitative chemical proteomics reveals new potential drug targets in head and neck cancer. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 12, p. M111 011635, 2011.
- Xiong, J. J.; Zhang, Y.; Wang, J. L.; Bao, G. D.; Zhu, Z. Y. Silencing of Ref-1 expression by retrovirus-mediated shRNA sensitizes HEK293 cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, n. 12, p. 3206-10, 2008.
- Yang, J.; Liu, X.; Zhao, Y.; Adamian, M.; Pawlyk, B.; Sun, X.; Mcmillan, D. R.; Liberman, M. C.; Li, T. Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000955, 2010.
- Yang, R. F.; Zhao, G. W.; Liang, S. T.; Zhang, Y.; Sun, L. H.; Chen, H. Z.; Liu, D. P. Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 428, n. 1, p. 93-8, 2012.
- Yang, Z.; Cheng, W.; Hong, L.; Chen, W.; Wang, Y.; Lin, S.; Han, J.; Zhou, H.; Gu, J. Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor induced apoptosis of MCF-7 cells. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 11, p. 4681-9, 2007.

- Yim, H.; Sung, C. K.; You, J.; Tian, Y.; Benjamin, T. Nek1 and TAZ interact to maintain normal levels of polycystin 2. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 5, p. 832-7, 2011.
- 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**, v. 580, n. 27, p. 6489-95, 2006.
- Youle, R. J.; Van Der Blik, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062-5, 2012.
- Young, C. L.; Khoshnevis, S.; Karbstein, K. Cofactor-dependent specificity of a DEAD-box protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 29, p. E2668-76, 2013.
- Yu, Y. B. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 8, p. 1113-29, 2002.
- Zalli, D.; Bayliss, R.; Fry, A. M. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthosis, is both activated and degraded during ciliogenesis. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 5, p. 1155-71, 2012.
- Zhang, B.; Chen, H. W.; Mu, R. L.; Zhang, W. K.; Zhao, M. Y.; Wei, W.; Wang, F.; Yu, H.; Lei, G.; Zou, H. F.; Ma, B.; Chen, S. Y.; Zhang, J. S. NIMA-related kinase NEK6 affects plant growth and stress response in Arabidopsis. **Plant J**, v. 68, n. 5, p. 830-43, 2011.
- Zhao, H.; Traganos, F.; Albino, A. P.; Darzynkiewicz, Z. Oxidative stress induces cell cycle-dependent Mre11 recruitment, ATM and Chk2 activation and histone H2AX phosphorylation. **Cell Cycle**, v. 7, n. 10, p. 1490-5, 2008.
- Zhou, W.; Yang, Y.; Xia, J.; Wang, H.; Salama, M. E.; Xiong, W.; Xu, H.; Shetty, S.; Chen, T.; Zeng, Z.; Shi, L.; Zangari, M.; Miles, R.; Bearss, D.; Tricot, G.; Zhan, F. NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers. **Cancer Cell**, v. 23, n. 1, p. 48-62, 2013.
- Zhu, Y. Y.; Lan, J. P.; Yu, J. [Interaction between a novel centrosomal protein TACP1 and mitotic kinase Nek2A]. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 36, n. 4, p. 337-42, 2007.
- Zorzano, A.; Hernandez-Alvarez, M. I.; Palacin, M.; Mingrone, G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-1beta and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 1028-33, 2010.

Anexos

8. Anexos

8.1 Proteínas identificadas no experimento de IP/MS

Tabela 5: Proteínas identificadas no experimento de IP/MS

Nek4.1			
Uniprot ID	Description	Gene Name	Exp n
P62847	40S ribosomal protein S24	RPS24	4E
P42677	40S ribosomal protein S27	RPS27	3E
Q9Y230	RuvB-like 2	RUVBL2	3E
O43852	Calumenin	CALU	3E
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	PABP4	3E
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR	3E
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1	3E
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB	3E
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6	3E
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	3E
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1	3E
Q16891	Mitochondrial inner membrane protein	IMMT	3E
P61353	60S ribosomal protein L27	RPL27	2E
P83731	60S ribosomal protein L24	RPL24	2E
P62266	40S ribosomal protein S23	RPS23	2E
P61247	40S ribosomal protein S3a	RPS3	2E
P50402	Emerin	EMD	2E
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	CHIP	2E
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP09	2E
P35268	60S ribosomal protein L22	RPL22	2E
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2	2E
P62910	60S ribosomal protein L32	RPL32	2E
P08865	40S ribosomal protein AS	RPSSA	2E
Q9Y265	RuvB-like 1	RUVBL1	2E
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	2E
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATP5C1	2E
O75828	Carbonyl reductase [NADPH] 3	CBR3	2E
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	2E
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	2E
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	2E
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	2E
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	2E
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	DNAJA2	2E
O96019	Actin-like protein 6 ^a	ACTL6A	2E
A6NHR9	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMCHD1	2E

Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	SLC25A13	2E
P43243	Matrin-3	MATR3	2E
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	2E
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	2E
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	2E
Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	2E
P51965	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	UBE2E1	1E
Q30KQ2	Beta-defensin 130	DEFB130	1E
P0CW22	40S ribosomal protein S17-like	RPS17L	1E
P05114	Non-histone chromosomal protein HMG-14	HMG1	1E
Q9BWJ5	Splicing factor 3B subunit 5	SF3B5	1E
P63220	40S ribosomal protein S21	RPS21	1E
P62263	40S ribosomal protein S14	RPS14	1E
P62277	40S ribosomal protein S13	RPS13	1E
Q16540	39S ribosomal protein L23, mitochondrial	MRPL23	1E
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	1E
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3	1E
P05451	Lithostathine-1-alpha	REG1A	1E
Q9NQ92	Coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator	COPRS	1E
P49207	60S ribosomal protein L34	RPL34	1E
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	1E
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	C14orf66	1E
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	1E
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	1E
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	1E
P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	1E
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	1E
Q13561	Dynactin subunit 2	DCTN2	1E
P05141	ADP/ATP translocase 2	SCL25A5	1E
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIM50	1E
Q9UKZ4	Teneurin-1	TENM1	1E
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	1E
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG	1E
P61962	DDB1- and CUL4-associated factor 7	DCAF7	1E
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	1E
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Tcp1	1E
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	NAGA	1E
P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	EIF2S3	1E
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	1E
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	1E
Q8NEE8	Tetratricopeptide repeat protein 16	TTC16	1E
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1E
P07237	Protein disulfide-isomerase	PDIA1	1E

O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	HAT1	1E
Q15428	Splicing factor 3A subunit 2	SF3A2	1E
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	1E
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3	1E
P08670	Vimentin	VIM	1E
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3	1E
P17858	6-phosphofructokinase, liver type	PFKL	1E
O60825	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	PFKFB2	1E
Q9ULX6	A-kinase anchor protein 8-like	AKAP8L	1E
P46087	Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	NOP2	1E
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	1E
P33992	DNA replication licensing factor MCM5	MCM5	1E
O43707	Alpha-actinin-4	ACTN4	1E
P13639	Elongation factor 2	EEF2	1E
Q86W24	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 14	NLRP14	1E
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	1E
Q9UM54	Unconventional myosin-VI	MYO6	1E
Q00610	Clathrin heavy chain 1	CLTC	1E
Q6DCA4	LOC100133091	LOC100133091	1E
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1	1E
Q9P202	Whirlin	DFNB31	1E
P58505	Uncharacterized protein C21orf58	C21orf58	1E
Q9BZU1	PNAS-20	empty	1E
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	1E
O15111	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	CHUK	1E
O60733	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2	PLA2G6	1E
Q00889	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 6	PSG6	1E
Q8N6M5	Probable allantoicase	ALLC	1E
Q16769	Glutaminy-peptide cyclotransferase	QPCT	1E
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1E
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	TUBB2B	1E
P04350	Tubulin beta-4A chain	TUBB4A	1E
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	1E
Q13748	Tubulin alpha-3C/D chain	TUBA3C	1E
Q6PEY2	Tubulin alpha-3E chain	TUBA3E	1E
Q9NRY4	Rho GTPase-activating protein 35	ARHGAP35	1E
Q9HCM4	Band 4.1-like protein 5	EPB41L5	1E
Q13509	Tubulin beta-3 chain	TUBB3	1E
P68366	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	1E
Q5W0Q7	SUMO-specific isopeptidase USPL1	USPL1	1E
Q8NBR6	Protein FAM63B	FAM63B	1E
O43182	Rho GTPase-activating protein 6	ARHGAP6	1E
Q9P0L2	Serine/threonine-protein kinase MARK1	MARK1	1E

P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6	1E
O75787	Renin receptor	ATP6AP2	1E
Q9Y2T7	Y-box-binding protein 2	YBX2	1E
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	1E
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	1E
P62736	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	1E
P68133	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	1E
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1E
P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	1E
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	POTEE	1E
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	POTEF	1E
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3	POTEKP	1E
Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50	DDX50	1E
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	TUBA8	1E
Q8N6C5	Immunoglobulin superfamily member 1	IGSF1	1E
Q5TA45	Integrator complex subunit 11	CPSF3L	1E
Q6UWM9	UDP-glucuronosyltransferase 2A3	UGT2A3	1E
Q8IXK0	Polyhomeotic-like protein 2	PHC2	1E
P23515	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein	OMG	1E
Q8IYU2	E3 ubiquitin-protein ligase HACE1	HACE1	1E
O94889	Kelch-like protein 18	KLHL18	1E
Q9P2K3	REST corepressor 3	RCOR3	1E
O60347	TBC1 domain family member 12	TBC1D12	1E
Q8NDF8	Non-canonical poly(A) RNA polymerase PAPD5	PAPD5	1E
Q6J272	Protein FAM166A	FAM166A	1E
Q5TDP6	Lengsin	LGSN	1E
Q12887	Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	COX10	1E
Q8N3V7	Synaptopodin	SYNPO	1E
Q71UI9	Histone H2A.V	H2AFV	1E
P04908	Histone H2A type 1-B/E	HIST1H2AE	1E
Q7L7L0	Histone H2A type 3	HIST3H2A	1E
Q96QV6	Histone H2A type 1-A	HIST1H2AA	1E
Q96KK5	Histone H2A type 1-H	HIST1H2AH	1E
Q9BTM1	Histone H2A.J	H2AFJ	1E
Q93077	Histone H2A type 1-C	HIST1H2AC	1E
Q6FI13	Histone H2A type 2-A	HIST2H2AA4	1E
Q8IUE6	Histone H2A type 2-B	HIST2H2AB	1E
P0C0S5	Histone H2A.Z	H2AFZ	1E
P16104	Histone H2AX	H2AFX	1E
P20671	Histone H2A type 1-D	HIST1H2AD	1E
P0C0S8	Histone H2A type 1	HIST1H2AI	1E
Q16777	Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	1E
Q99878	Histone H2A type 1-J	HIST1H2AJ	1E

Q9Y5F6	Protocadherin gamma-C5	PCDHGC5	1E
Q99666	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	RGPD6	1E
A6NKT7	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 3	RGPD3	1E
O14715	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 8	RGPD8	1E
Q8WYP5	Protein ELYS	AHCTF1	1E
Q9NXL6	SID1 transmembrane family member 1	SIDT1	1E
P20309	Muscarinic acetylcholine receptor M3	CHRM3	1E
Q9UPW5	Cytosolic carboxypeptidase 1	AGTPBP1	1E
Q9UG01	Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	1E
Q9P2B4	CTTNBP2 N-terminal-like protein	CTTNBP2NL	1E
P12036	Neurofilament heavy polypeptide	NEFH	1E
Q9NZJ5	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	EIF2AK3	1E
P45983	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	1E
Q9Y546	Leucine-rich repeat-containing protein 42	LRRC42	1E
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HSPA1L	1E
Q86YZ3	Hornerin	HRNR	1E
Q8NH70	Olfactory receptor 4A16	OR4A16	1E
Q16832	Discoidin domain-containing receptor 2	DDR2	1E
P42766	60S ribosomal protein L35	RPL35	1E
Q8IYJ1	Copine-9	CPNE9	1E
Q9ULT8	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	HECTD1	1E
O75808	Calpain-15	CAPN15	1E
O00327	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	ARNTL	1E
O95996	Adenomatous polyposis coli protein 2	APC2	1E
O60244	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	MED14	1E
P17275	Transcription factor jun-B	JUNB	1E
Q16760	Diacylglycerol kinase delta	DGKD	1E
P06858	Lipoprotein lipase	LPL	1E
P20929	Nebulin	NEB	1E
Q53H47	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	SETMAR	1E
Q9HCL3	Zinc finger protein 14 homolog	ZFP14	1E
Q96BY7	Autophagy-related protein 2 homolog B	ATG2B	1E
Q9UJP4	Kelch-like protein 21	KLHL21	1E
O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	DYNC1LI2	1E
Q8N2A0	Putative uncharacterized protein encoded by LINC00269	NCRNA00269	1E
Q3BBV0	Neuroblastoma breakpoint family member 1	NBPF1	1E
Q5SXJ2	Neuroblastoma breakpoint family member 16	NBPF16	1E
Q3BBV2	Putative neuroblastoma breakpoint family member 8	NBPF8	1E
Q5TI25	Neuroblastoma breakpoint family member 14	NBPF14	1E
Q3BBW0	Neuroblastoma breakpoint family member 20	NBPF9	1E
Q6P3W6	Neuroblastoma breakpoint family member 10	NBPF10	1E
Q8N660	Neuroblastoma breakpoint family member 15	NBPF15	1E
Q86T75	Neuroblastoma breakpoint family member 11	NBPF11	1E

Q5RGN0	Putative neuroblastoma breakpoint family member 24	NBPF24	1E
Q5TAG4	Neuroblastoma breakpoint family member 12	NBPF12	1E
Q9ULV4	Coronin-1C	CORO1C	1E
Q9H477	Ribokinase	RBKS	1E
Q13296	Mammaglobin-A	SCGB2A2	1E
Q96QE4	Leucine-rich repeat-containing protein 37B	LRRC37B	1E
Q2LD37	Uncharacterized protein KIAA1109	KIAA1109	1E
Q6WQI6	Putative cancer susceptibility gene HEPN1 protein	HEPN1	1E
Q5H9L4	Transcription initiation factor TFIID subunit 7-like	TAF7L	1E
Q5SRD3	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 8	AGAP8	1E
Q8TF27	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 11	AGAP8	1E
A6NIR3	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 5	AGAP5	1E
Q96P64	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 4	AGAP4	1E
Q5VUJ5	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 7	AGAP7	1E
A8MT82	Putative centaurin-gamma-like family member 11P	CTGLF11P	1E
O75027	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	ABCB7	1E
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB	1E
Q9H7R5	Zinc finger protein 665	ZNF665	1E
Q13367	AP-3 complex subunit beta-2	AP3B2	1E
Q9NS68	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19	TNFRSF19	1E
Q96LM5	Uncharacterized protein C4orf45	C4orf45	1E
Q86YA3	Uncharacterized protein C4orf21	C4orf21	1E
P16144	Integrin beta-4	ITGB4	1E
O76082	Solute carrier family 22 member 5	SLC22A5	1E
Q8IX04	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3	UEVLD	1E
Q99611	Selenide, water dikinase 2	SEPHS2	1E
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	MDC1	1E
O15409	Forkhead box protein P2	FOXP2	1E
Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	1E
Q08289	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2	CACNB2	1E
Q86SJ6	Desmoglein-4	DSG4	1E
Q8NHM5	Lysine-specific demethylase 2B	KDM2B	1E
O43781	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3	DYRK3	1E
Q9UJ68	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	MSRA	1E
Q9NXZ2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX43	DDX43	1E
Q9UJU5	Forkhead box protein D3	FOXD3	1E
Q6PID6	Tetratricopeptide repeat protein 33	TTC33	1E
Q86VS3	IQ domain-containing protein H	IQCH	1E
Q9Y5P4	Collagen type IV alpha-3-binding protein	COL4A3BP	1E
Q96AY4	Tetratricopeptide repeat protein 28	TTC28	1E
Q9Y6E0	Serine/threonine-protein kinase 24	STK24	1E
Q9UMZ2	Synergism gamma	SYNRG	1E
Q8TBA6	Golgin subfamily A member 5	GOLGA5	1E

Q8N2M4	Lysoplasmalogenase-like protein TMEM86A	TMEM86A	1E
Q99650	Oncostatin-M-specific receptor subunit beta	OSMR	1E
Q5VZL5	Zinc finger MYM-type protein 4	ZMYM4	1E
Q99551	Transcription termination factor, mitochondrial	MTERF	1E
P51003	Poly(A) polymerase alpha	PAPOLA	1E
Q9NVR5	Protein kintoun	DNAAF2	1E
Q9NR81	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	ARHGEF3	1E
Q86TB3	Alpha-protein kinase 2	ALPK2	1E
Q86XX4	Extracellular matrix protein FRAS1	FRAS1	1E
P29590	Protein PML	PML	1E
Q9NS40	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 7	KCNH7	1E
Q9ULF5	Zinc transporter ZIP10	SLC39A10	1E
P51610	Host cell factor 1	HCFC1	1E
Q9P219	Protein Daple	CCDC88C	1E
Q9BZC7	ATP-binding cassette sub-family A member 2	ABCA2	1E
Q2M3T9	Hyaluronidase-4	HYAL4	1E
Q7Z3Z4	Piwi-like protein 4	PIWIL4	1E
Q9NS87	Kinesin-like protein KIF15	KIF15	1E
Q92636	Protein FAN	NSMAF	1E
Q96DZ1	Endoplasmic reticulum lectin 1	ERLEC1	1E
Q96JM2	Zinc finger protein 462	ZNF462	1E
O75443	Alpha-tectorin	TECTA	1E
P16234	Platelet-derived growth factor receptor alpha	PDGFRA	1E
Q86UK0	ATP-binding cassette sub-family A member 12	ABCA12	1E
Q99704	Docking protein 1	DOK1	1E
Q9H7D0	Dedicator of cytokinesis protein 5	DOCK5	1E
O95972	Bone morphogenetic protein 15	BMP15	1E
P39748	Flap endonuclease 1	FEN1	1E
Q9Y5X9	Endothelial lipase	LIPG	1E
Q9UL01	Dermatan-sulfate epimerase	DSE	1E
P28749	Retinoblastoma-like protein 1	RBL1	1E
Q9P253	Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog	VPS18	1E
Q96J84	Kin of IRRE-like protein 1	KIRREL	1E
Q9P1Y5	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	KIAA1543	1E
P16112	Aggrecan core protein	ACAN	1E
O95180	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	CACNA1H	1E
Q9BQN1	Protein FAM83C	FAM83C	1E
Q96RT8	Gamma-tubulin complex component 5	TUBGCP5	1E
A0AVK6	Transcription factor E2F8	E2F8	1E
Q13402	Unconventional myosin-VIIa	MYO7A	1E
Q6Q759	Sperm-associated antigen 17	SPAG17	1E
Q8IWA4	Mitofusin-1	MFN1	1E
Q7Z4L5	Tetratricopeptide repeat protein 21B	TTC21B	1E

P43007	Neutral amino acid transporter A	SLC1A4	1E
Q9NWS1	PCNA-interacting partner	C12orf48	1E
Q9BV47	Dual specificity protein phosphatase 26	DUSP26	1E
Q96G03	Phosphoglucomutase-2	PGM2	1E
O60296	Trafficking kinesin-binding protein 2	TRAK2	1E
Q03169	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	TNFAIP2	1E
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	1E
Q9NYQ7	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	CELSR3	1E
P43363	Melanoma-associated antigen 10	MAGEA10	1E
Q9P227	Rho GTPase-activating protein 23	ARHGAP23	1E
Q03001	Dystonin	DST	1E
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9	STARD9	1E
O14514	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	BAI1	1E
Q5T5P2	Sickle tail protein homolog	KIAA1217	1E
Q6ZNL0	GPS, PLAT and transmembrane domain-containing protein FLJ00285	LOC399491	1E
O95639	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4	CPSF4	1E
Q9Y6X0	SET-binding protein	SETBP1	1E
Q13523	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	PRPF4B	1E
Q9NQW8	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-3	CNGB3	1E
Q6V0I7	Protocadherin Fat 4	FAT4	1E
Q9Y6E2	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	BZW2	1E
Q96EM0	Trans-L-3-hydroxyproline dehydratase	C14orf149	1E
Q9ULL5	Proline-rich protein 12	PRR12	1E
Q8IZ81	ELMO domain-containing protein 2	ELMOD2	1E
Q9Y566	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	SHANK1	1E
Q8IZH2	5'-3' exoribonuclease 1	XRN1	1E
Q9ULQ0	Striatin-interacting protein 2	FAM40B	1E
Q9BS34	Zinc finger protein 670	ZNF670	1E
Q86YC2	Partner and localizer of BRCA2	PALB2	1E
Q86US8	Telomerase-binding protein EST1A	SMG6	1E
Q8N5M1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	ATPAF2	1E
Q96JN2	Coiled-coil domain-containing protein 136	CCDC136	1E
P27816	Microtubule-associated protein 4	MAP4	1E
Q5S007	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	LRRK2	1E
O95714	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	HERC2	1E
O75575	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC9	CRCP	1E
O75962	Triple functional domain protein	TRIO	1E
Q9UKP5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 6	ADAMTS6	1E
Q92696	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha	RABGGTA	1E
P50221	Homeobox protein MOX-1	MEOX1	1E
Q7Z407	CUB and sushi domain-containing protein 3	CSMD3	1E
Q8NG08	DNA helicase B	HELB	1E
Q16880	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase	UGT8	1E

P14543	Nidogen-1	NID1	1E
A6NKL6	Transmembrane protein 200C	TMEM200C	1E
Q8NHW5	60S acidic ribosomal protein P0-like	RPLP0P6	1E
Q9NRM1	Enamelin	ENAM	1E
Q9C091	GREB1-like protein	GREB1L	1E
Q9C000	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1	NLRP1	1E
Q8NGA0	Olfactory receptor 7G1	OR7G1	1E
Q7Z589	Protein EMSY	C11orf30	1E
Q5TCZ1	SH3 and PX domain-containing protein 2A	SH3PXD2A	1E
Q9UNS1	Protein timeless homolog	TIMELESS	1E
Q8N4U5	T-complex protein 11-like protein 2	TCP11L2	1E
Q8WXQ8	Carboxypeptidase A5	CPA5	1E
Q8TB40	Abhydrolase domain-containing protein 4	ABHD4	1E
Q86UQ4	ATP-binding cassette sub-family A member 13	ABCA13	1E
Q8IZ96	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 1	CMTM1	1E
Q8IYM0	Protein FAM186B	FAM186B	1E
P59510	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 20	ADAMTS20	1E
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	NUP98	1E
Q93084	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	ATP2A3	1E
Q86YS6	Ras-related protein Rab-43	RAB43	1E
A6NDJ8	Putative Rab-43-like protein ENSP00000330714	empty	1E
P25940	Collagen alpha-3(V) chain	COL5A3	1E
Q8IWA0	WD repeat-containing protein 75	WDR75	1E
A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3	TUBAL3	1E
Q9NWU1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	OXSM	1E
Q8N5H7	SH2 domain-containing protein 3C	SH2D3C	1E
B1APH4	Putative zinc finger protein 487	ZNF487P	1E
Q9C0K0	B-cell lymphoma/leukemia 11B	BCL11B	1E
Q9BQS2	Synaptotagmin-15	SYT15	1E
Q14CM0	FERM and PDZ domain-containing protein 4	FRMPD4	1E
Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3	ASXL3	1E
Q02641	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	CACNB1	1E
Q3V6T2	Girdin	CCDC88A	1E
Q9ULU8	Calcium-dependent secretion activator 1	CADPS	1E
O00322	Uroplakin-1 ^a	UPK1A	1E
Q03468	DNA excision repair protein ERCC-6	ERCC6	1E

Nek4.2			
Uniprot ID	Description	Gene Name	Exp n
Q6NVV1	Putative 60S ribosomal protein L13a-like MGC87657	empty	2E
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	2E
P61981	14-3-3 protein gamma	YWHAG	2E
Q9GZS3	WD repeat-containing protein 61	WDR61	2E
O94905	Erlin-2	ERLIN2	2E
Q15427	Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	2E
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	1E
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	ATP5J	1E
P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SNRPD2	1E
P05386	60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	1E
P83881	60S ribosomal protein L36a	RPL36A	1E
P60660	Myosin light polypeptide 6	MYL6	1E
Q01130	Serine/arginine-rich splicing factor 2	SRSF2	1E
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1E
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	1E
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	1E
P05451	Lithostathine-1-alpha	REG1A	1E
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	1E
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1	1E
Q8N954	G patch domain-containing protein 11	GPATCH11	1E
Q8WWY3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	PRPF31	1E
P61163	Alpha-centractin	ACTR1A	1E
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	1E
P29692	Elongation factor 1-delta	EEF1D	1E
P06733	Alpha-enolase	ENO1	1E
Q9NR64	Kelch-like protein 1	KLHL1	1E
Q15717	ELAV-like protein 1	ELAVL1	1E
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	1E
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	1E
P03956	Interstitial collagenase	MMP1	1E
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	1E
O43318	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	MAP3K7	1E
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	1E
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	1E
Q16630	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	1E
O00567	Nucleolar protein 56	NOP56	1E
Q96SB4	SRSF protein kinase 1	SRPK1	1E
Q9Y6U3	Adseverin	SCIN	1E
Q8N163	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	1E
O60568	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	PLOD3	1E
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	1E

Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1	1E
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1	1E
Q01804	OTU domain-containing protein 4	OTUD4	1E
Q10570	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	CPSF1	1E
P35579	Myosin-9	MYH9	1E
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	1E

Interações Comuns entre as duas isoformas

Uniprot ID	Description	Gene Name	Nek4.1	Nek4.2
P51957	Serine/threonine-protein kinase Nek4	NEK4	4E	4E
P68363	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	4E	4E
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	4E	4E
O75688	Protein phosphatase 1B	PPM1B	3E	4E
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	3E	4E
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	3E	4E
P61313	60S ribosomal protein L15	RPL15	3E	1E
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	3E	4E
P62906	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	3E	1E
P62714	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB	3E	2E
P46821	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	3E	4E
P18124	60S ribosomal protein L7	RPL7	3E	4E
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	3E	4E
P46776	60S ribosomal protein L27a	RPL27A	3E	2E
P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	3E	4E
P46781	40S ribosomal protein S9	RPS9	3E	4E
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNPF	3E	3E
O14654	Insulin receptor substrate 4	IRS4	3E	2E
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	3E	4E
P46778	60S ribosomal protein L21	RPL21	3E	4E
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	3E	2E
P12236	ADP/ATP translocase 3	SLC25A6	3E	1E
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	3E	2E
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	3E	2E
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	3E	3E
O43143	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	3E	2E
P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	3E	2E
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	3E	2E
P27824	Calnexin	CANX	3E	1E
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	3E	1E
P23396	40S ribosomal protein S3	RPS3	2E	3E
P15880	40S ribosomal protein S2	RPS2	2E	1E
P62851	40S ribosomal protein S25	RPS25	2E	1E

P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	RPS4X	2E	3E
P18077	60S ribosomal protein L35a	RPL35A	2E	1E
P39023	60S ribosomal protein L3	RPL3	2E	2E
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM	2E	1E
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	2E	1E
Q99848	Probable rRNA-processing protein EBP2	EBNA1BP2	2E	1E
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2	2E	3E
Q96I25	Splicing factor 45	RBM17	2E	1E
Q96E39	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	RBMXL1	2E	1E
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	2E	1E
P25205	DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	2E	1E
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	PRPF19	2E	1E
P46777	60S ribosomal protein L5	RPL5	2E	1E
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	2E	1E
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	HNRNPQ	2E	1E
P62917	60S ribosomal protein L8	RPL8	2E	2E
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	2E	2E
Q9NYF8	Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLFA1	2E	1E
P05455	Lupus La protein	SSB	2E	2E
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	2E	1E
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	2E	1E
O15042	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	U2SURP	2E	3E
Q9HDC5	Junctophilin-1	JPH1	2E	1E
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	2E	1E
Q16875	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	PFKFB3	2E	1E
P27708	CAD protein	CAD	2E	1E
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	2E	2E
P62269	40S ribosomal protein S18	RPS18	2E	2E
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	2E	1E
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	1E	3E
Q8N4Q1	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	CHCHD4	1E	1E
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E	SNRPE	1E	2E
P25398	40S ribosomal protein S12	RPS12	1E	1E
Q9BRJ6	Uncharacterized protein C7orf50	C7orf50	1E	1E
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	1E	2E
P60866	40S ribosomal protein S20	RPS20	1E	1E
P62750	60S ribosomal protein L23a	RPL23A	1E	2E
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	1E	3E
P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11	1E	2E
Q9GZV4	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	EIF5A2	1E	1E
Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	PGAM5	1E	1E
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	1E	1E
P62249	40S ribosomal protein S16	RPS16	1E	1E

P46782	40S ribosomal protein S5	RPS5	1E	1E
P24534	Elongation factor 1-beta	EEF1B2	1E	3E
P27635	60S ribosomal protein L10	RPL10	1E	2E
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7	1E	2E
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO	1E	1E
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	1E	1E
Q9BWF3	RNA-binding protein 4	RBM4	1E	1E
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	1E	1E
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	TMPO	1E	1E
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	1E	4E
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP	1E	1E
Q9BRS2	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	1E	1E
P11387	DNA topoisomerase 1	TOP1	1E	1E
Q14498	RNA-binding protein 39	RBM39	1E	2E
P98175	RNA-binding protein 10	RBM10	1E	2E
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	1E	1E
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1	1E	1E
Q9P2R3	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	ANKFY1	1E	1E
Q68CZ1	Protein fantom	RPGRIP1L	1E	1E
Q9BQG0	Myb-binding protein 1 ^a	MYBBP1A	1E	1E
Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	SPTAN1	1E	1E
Q15942	Zyxin	ZYX	1E	1E
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	1E	1E
P54105	Methylosome subunit pICln	CLNS1A	1E	1E
P16989	Y-box binding protein 3	YBX3	1E	2E
P63267	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTG2	1E	2E

8.2 Anticorpos utilizados

Anticorpo	Fabricante	Nº de catálogo	Diluição WB	Diluição IF
Goat anti Nek4	Santa Cruz Biotechnology	SC-5517	1:500	1:50
Mouse anti Nek4	Santa Cruz Biotechnology	SC-81332	1:500	1:50
Rabbit anti pH3	Cell Signaling	CS 9701	-	1:200
Mouse anti H2AX (Clone JBW301)	Millipore	05-636	1:2000 (0,5µg/mL)	1:850
Rabbit anti γ-H2AX	Cell Signaling Technology	CS 9718	-	1:400
Rabbit anti CENPF	Abcam	Ab5	-	1:500
Rabbit anti TRAP1	Santa Cruz Biotechnology	SC8665	1:500	1:50
Rabbit anti TUBG	Sigma	T3559	1:5000	1:300
Rabbit anti TUBB	Abcam	ab83311	1:1000	1:150
Mouse anti-Flag	Sigma	F3165	1:1000	1:200
Mouse anti TOM20	BD	612278	1:1000	1:250
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG	Life technology	A11001	-	1:200
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat IgG	Life technology	A11055	-	1:200
Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Mouse IgG	Life technology	A21147	-	1:200
Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Rabbit IgG	Life technology	A21428	-	1:200
IgG anti Mouse (HRP-conjugated)	Jackson Immuno Research	115-035-146	1:10000	-
IgG anti Rabbit (HRP-conjugated)	Vitro	ryD-HaF008	1:10000	-
IgG anti Goat (HRP-conjugated)	Jackson Immuno Research	705-035-147	1:5000	-
Mouse anti Whirlin	Santa Cruz Biotechnology	SC271939	1:500	1:50
goat anti PML	Santa Cruz Biotechnology	SC9863	-	1:100
rabbit anti-14-3-3e	Thermo	PA5-24165	1:5000	1:50
Mouse anti SLC25A6	Thermo	PA5-29199	-	1:250
mouse anti-SC-35	Abcam	ab11826	-	1:100
mouse anti-VDAC	Abcam	ab14734	1:1000	
Rabbit anti Flag	Sigma	T7425	1:800	1:200
Mouse anti TUBac	Sigma	T7451	-	1:500
Mouse anti hnRNPQ	Santa Cruz Biotechnology	SC- 56703	-	1:50
Rabbit anti CGI	-	-	1:3000	-

Rabbit anti CGI	Sigma	Av40310	-	1:200
Mouse anti PARP1	BD	556494	1:500	1:100
Mouse anti BCLAF	Santa Cruz Biotechnology	SC-135845	1:250	1:25
Mouse anti SF2	Invitrogen	324500	-	1:50
Mouse anti Calnexin	Abcam	ab31290		1:300
Mouse anti PCNA	Cell Signaling	2586S	1:2000	1:2400
Mouse ati Ku70	Thermo	MA513110	1:500	-
Rabbit anti Lamin	Santa Cruz Biotechnology	SC 20680	1:500	-
Goat anti Rabbit HRP	Sigma	A6154	1:5000	
Rabbit anti Goat HRP	Sigma	A5420	1:5000	
Goat anti Mouse HRP	Calbiochem	401253	1:5000	

Quadro 2: Anticorpos utilizados

8.3 Expressão heteróloga da Nek4KD

Na tentativa de caracterizar estruturalmente a Nek4, a sequência de cDNA codificante para o domínio quinase (Nek4KD) foi clonada em pET-his-TEV para expressão em bactéria.

O domínio de quinase (6 -261) da Nek4 foi expresso inicialmente na cepa BL21contendo o plasmídio pRARE1 e foram realizados testes para determinar a melhor condição de expressão nos quais variou-se temperatura, meio de crescimento e tempo de indução da expressão com IPTG, contudo os resultados não foram positivos (tabela 8).

Então, optou-se por utilizar a cepa BL21ΔSlyD com pRARE2. No teste de expressão a temperatura de 30°C mostrou uma expressão maior de proteína, embora na fração insolúvel. Não foi possível visualizar a expressão da Nek4KD em gel corado com *Coomassie*, mas no *western blotting*, foram visualizadas bandas do tamanho esperado, tanto na fração solúvel quanto na insolúvel (Figura 52). Por isso, optou-se por realizar a expressão em larga escala utilizando a temperatura de 30°C com 4h de indução da expressão com IPTG.

Tabela 8: Testes de expressão Nek4KD

Cepa	Meio	Temperatura	Tempo	Resultado
BL21pRARE1	LB	18°C	1h	Não expressou
			4h	Apenas fração insolúvel
			16h	Apenas fração insolúvel
	TB	18°C	1h	Não expressou
			4h	Não expressou
			16h	Apenas fração insolúvel
	LB	30°C	1h	Apenas fração insolúvel
			4h	Apenas fração insolúvel
	TB	30°C	1h	Apenas fração insolúvel
			4h	Apenas fração insolúvel
	LB	37°C	1h	Apenas fração insolúvel
			4h	Apenas fração insolúvel
	TB	37°C	1h	Apenas fração insolúvel
			4h	Apenas fração insolúvel
BL21pRARE2 Δ SlyD	LB	20°C	4h	Fração solúvel
			16h	Fração solúvel
		30°C	4h	Fração solúvel
			16h	Fração solúvel

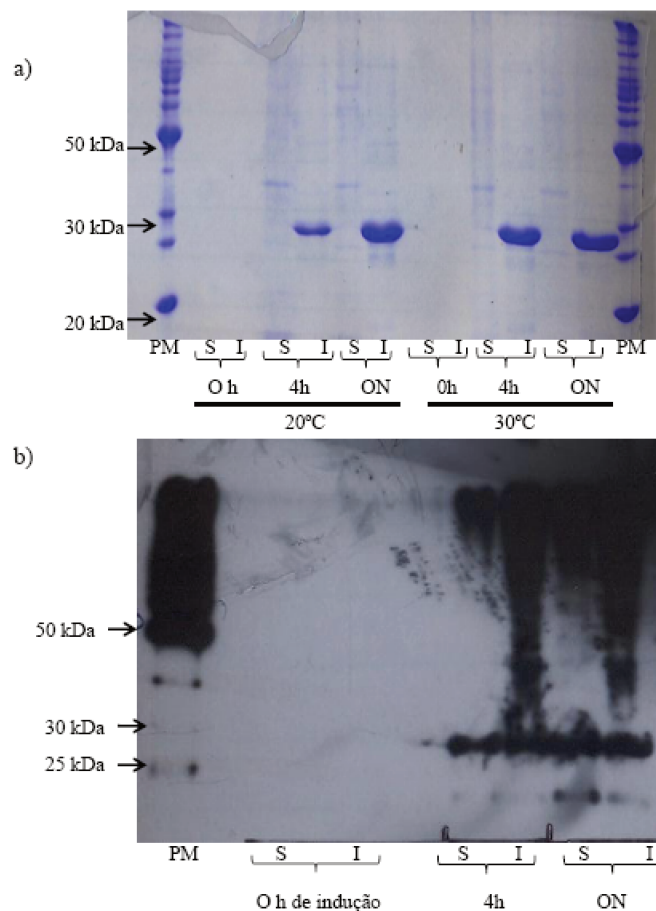


Figura 52: Teste de expressão da Nek4KD. Gel de *Coomassie* (a) com as frações solúvel e insolúvel após 4h e 16h de indução da expressão nas temperaturas de 20 e 30°C. E filme de *western blotting* (b) com as frações solúvel e insolúvel após 4h e 16 h de indução da expressão a 30°C. S – solúvel; I – insolúvel; ON – *overnight*: 16h de indução

Expressando-se em 2 litros de meio LB, após cromatografia de afinidade por metal, na qual se observa discreta elevação na absorbância, que vai de 250 -450 mM de Imidazol (ou 50 – 90% tampão B) (Figura 53), foi possível observar uma discreta banda no tamanho esperado no gel corado com *Coomassie*, confirmado por *western blotting*. Contudo, nessas frações apareciam também muitos contaminantes (Figura 54). Sendo que para realizar-se uma segunda etapa de purificação o rendimento seria muito baixo.

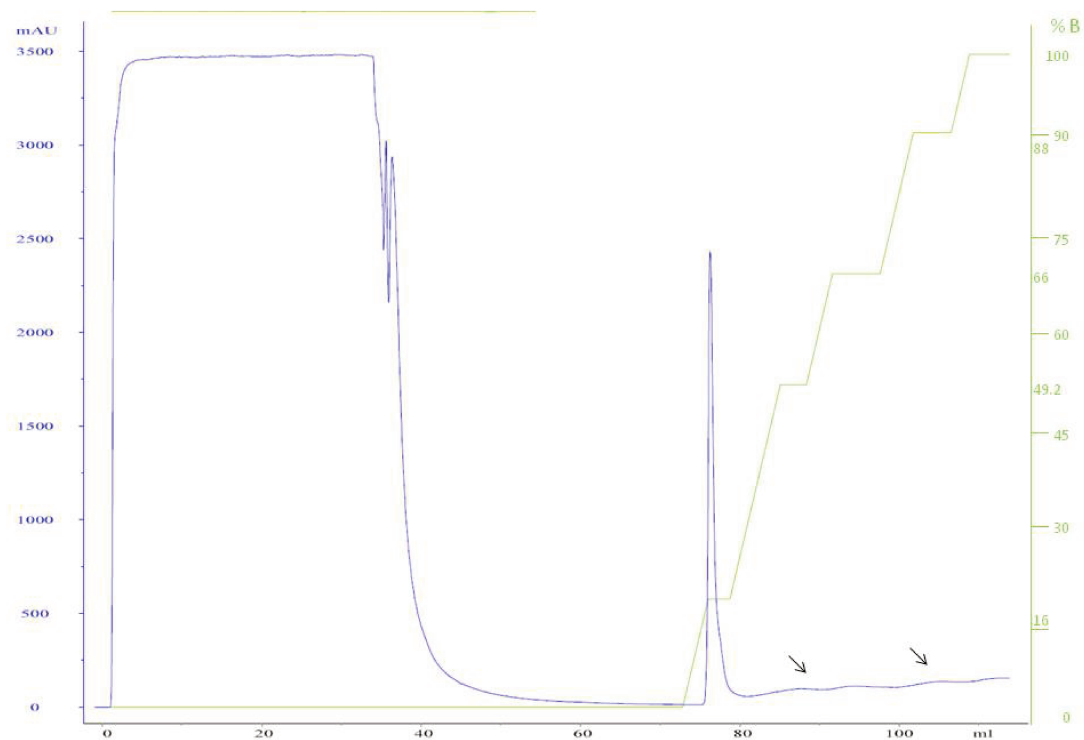


Figura 53: Purificação através de cromatografia de afinidade da Nek4KD. O cromatograma apresenta a absorbância, volume coletado e a concentração de B. As setas indicam elevações na absorbância durante a eluição.

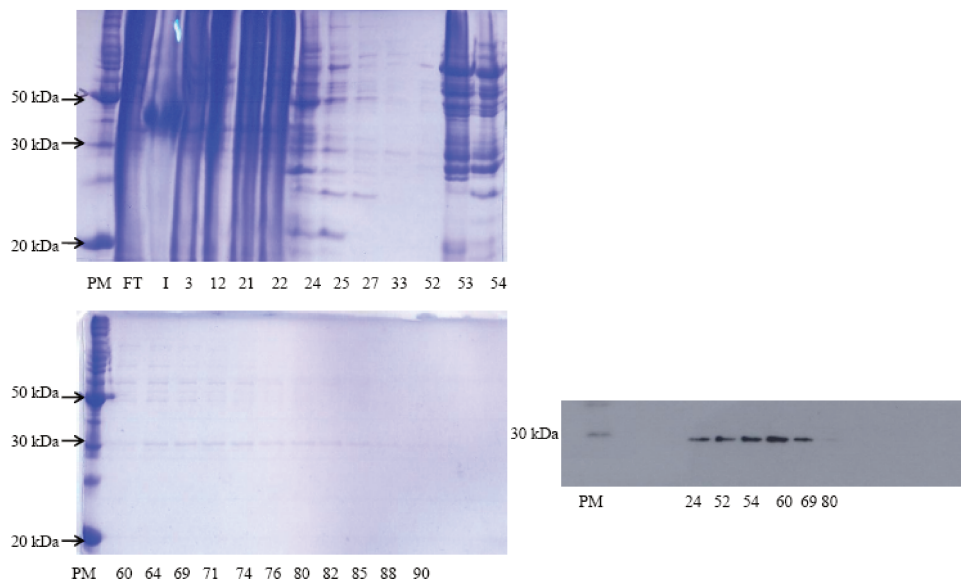


Figura 54: Expressão em larga escala da Nek4KD. Foram expressos 2L de Nek4KD em meio LB a 30°C com 4h de indução da expressão. Prosseguiu-se a purificação por cromatografia de afinidade por metal e as frações obtidas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE para corar com Coomassie ou para *western blotting*. FT: *Flow through*

Para otimização da expressão da Nek4KD, considerou-se que como a expressão era relativamente baixa e a purificação através de afinidade por metal não apresentava pureza suficiente para permitir um menor número de etapas de purificação, o que acarretaria em maior perda de proteína, uma alternativa seria iniciar a purificação através de outra técnica. Como o pI teórico da Nek4KD é de 9.4 uma alternativa seria a troca catiônica. Assim, realizou-se purificação por troca iônica em tandem, colocando-se primeiramente uma coluna de troca aniônica e por último uma coluna de troca catiônica. Essa purificação foi mais promissora, sendo que a Nek4KD foi eluída com 300 mM de NaCl (Figura 55). As frações foram misturadas e fez-se então uma purificação de afinidade por metal, sendo que dessa vez a proteína foi eluída (200 mM de Imidazol) com menor grau de contaminantes e poderia ser melhor purificada através de uma cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 56). Optou-se por misturar e concentrar uma parte das frações (17 – 23) e quantificar a fração 15 para realização de um ensaio de *Thermal Shift* e dicroísmo circular.

A quantificação foi realizada através dos métodos de BCA e Bradford, contudo, os resultados foram muito discrepantes, possivelmente pela presença de imidazol e do próprio HEPES, embora estes métodos apresentem uma tolerância considerável para esses componentes (de acordo com os manuais dos fabricantes dos reagentes). Então optou-se por fazer diálise para prosseguir a quantificação utilizando absorbância em 280nm. A concentração da fração 15, considerando o coeficiente de extinção molar ficou em 4.8µM. Então, misturaram-se as frações 15 e 16, concentrou-se e fez-se diálise para trocar o tampão, contudo, após concentrar a mistura das frações a concentração final foi inferior a inicial, 4.2µM. Optou-se por usar essa mistura para realização de um experimento de dicroísmo circular (CD), contudo, apesar das diluições, a voltagem do equipamento ficou muito alta na presença da amostra impossibilitando a obtenção de qualquer espectro. Esse aumento na absorbância que ocasionou aumento na voltagem não foi observado com o tampão, o branco do experimento. O único componente presente na amostra que poderia justificar esse aumento seria o imidazol, contudo isso é um tanto improvável uma vez que a diálise foi feita por mais de 24h. Outra possibilidade seria algum problema do equipamento.

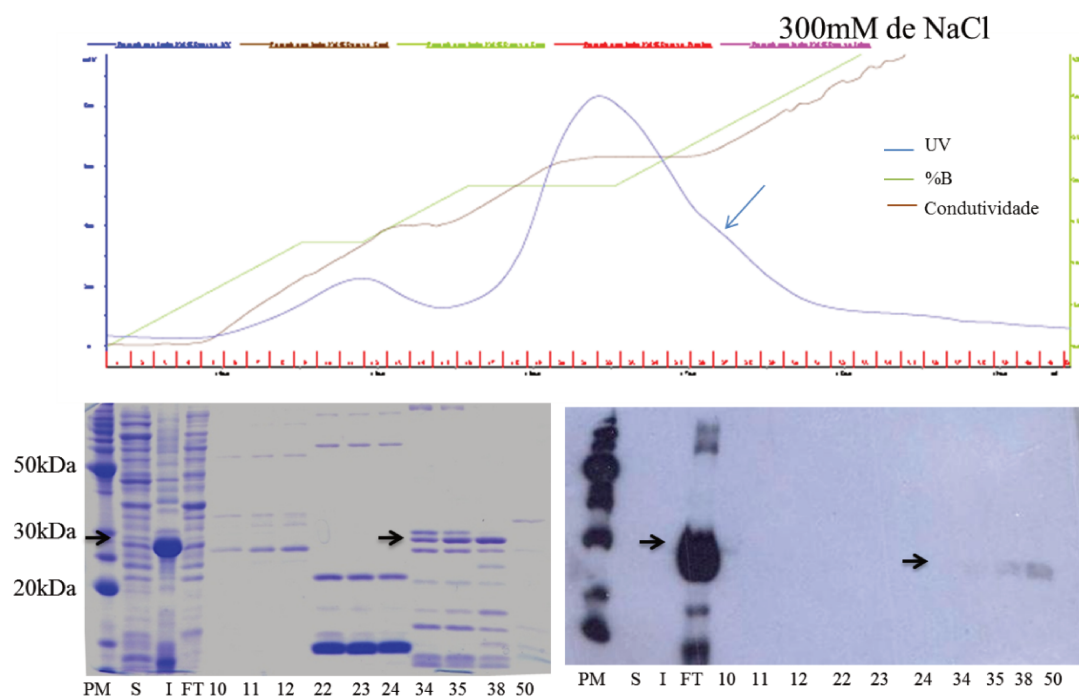


Figura 55: Purificação Nek4KD – Troca Iônica. Quatro litros de expressão da Nek4KD foram purificados através de cromatografia de troca iônica. Utilizou-se purificação em tandem, sendo que o extrato primeiramente passou por coluna de troca aniônica e depois catiônica. No cromatograma está indicada a região do pico de absorbância (UV) onde saíram as frações que continham a proteína, indicadas no gel e filme de western blotting com setas. PM. Marcador de peso molecular. S extrato, fração solúvel, I extrato fração insolúvel e FT *flow through*.

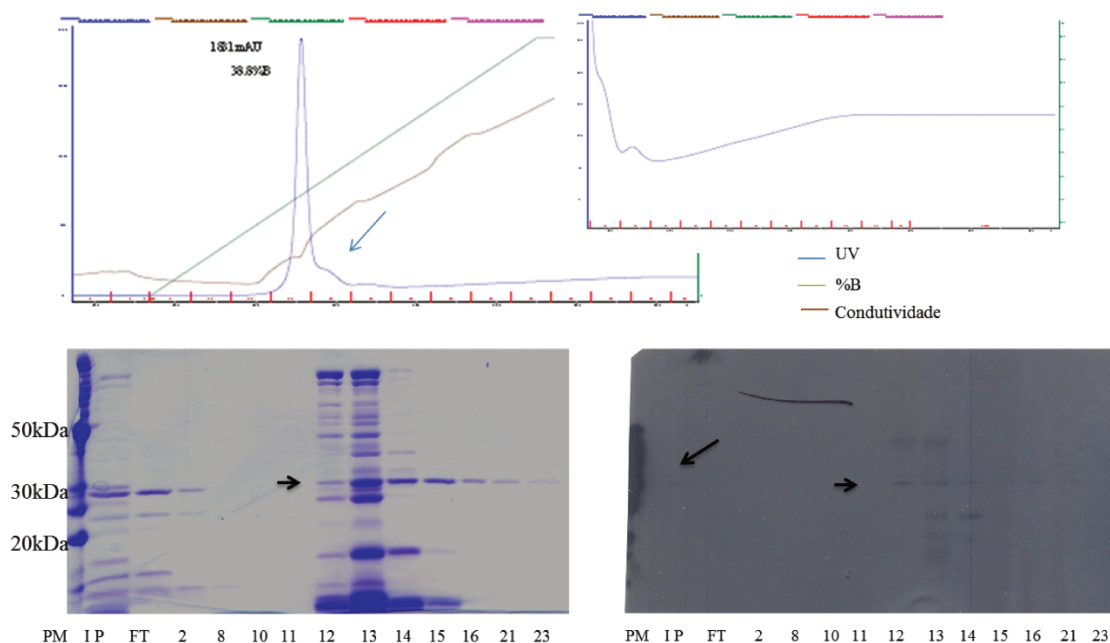


Figura 56: Purificação Nek4KD – Afinidade por metal. As frações 34-50 foram misturadas e submetidas à purificação por afinidade por níquel. A seta e a ampliação apresentam no cromatograma a região correspondente a eluição da Nek4KD segundo a detecção em gel corado com Coomassie Blue e *western blotting*.

Como em todos experimentos de purificação por afinidade para Nek4 apareciam duas bandas fortes (no gel corado com azul de *Coomassie* e no *western blotting* com anticorpo anti-HIS), uma com massa molecular de aproximadamente 32kDa, o tamanho esperado para o domínio quinase da Nek4, e outra com aproximadamente 60kDa, suspeitou-se que pudesse estar ocorrendo a formação de dímero. Assim as bandas de interesse foram excisadas do gel corado com azul de *Coomassie* e enviou-se para identificação por espectrometria de massas. A banda correspondente à altura de aproximadamente 32kDa foi identificada como Nek4 (Figura 57), contudo as demais bandas excisadas corresponderam a proteínas bacterianas. Esse resultado não confirmou a presença de dímero na amostra, contudo, após análise das proteínas bacterianas não foi verificado a presença de uma sequência com várias histidinas ou histidinas vicinais que justificasse a identificação com anticorpo contra histidina. Contudo, não se pode excluir a possibilidade de formação do dímero, uma vez que a banda mais forte visualizada no gel poderia não corresponder ao dímero da Nek4 e esta estar em uma quantidade menor que não seria detectada devido à mistura com outras proteínas.

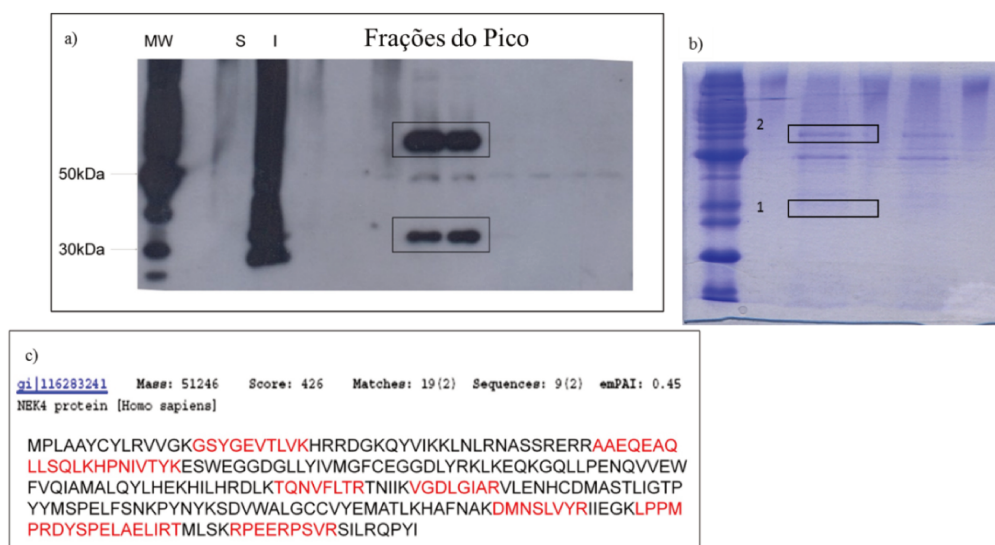


Figura 57: Identificação da Nek4 por espectrometria de massas. Western blotting apresentando bandas intensas na altura esperada (~32kDa) e também superior a 60kDa (a). Em (b) gel corado com *Coomassie Blue* no qual aparecem as frações do pico (a). Foram excisadas as bandas apresentadas que foram enviadas para identificação por espectrometria de massas. Em (c) peptídeos encontrados que se encaixam com a proteína Nek4.

8.4 Expressão das hNeks no SGC (*Structural Genomics Consortium*)

Durante o desenvolvimento desse projeto de doutorado, foi estabelecida uma colaboração entre os Professores Jörg Kobarg e Sefan Knapp, do laboratório do *Structural Genomics Consortium*, Oxford, UK. Assim, eu, e outros colegas do grupo, que também desenvolviam seus projetos de pesquisa visando melhor caracterizar as Neks humanas, trabalhamos com a tentativa de expressão de mais de 300 construções diferentes para as Neks 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10 e 11 além de melhorar as condições de expressão e purificação de construções já testadas pelo grupo de do SGC para a Nek6 e Nek7 (Figuras 58, 59 e 60) com o objetivo de obter a estrutura da hNek6, ainda não resolvida e encontrar bons ligantes para Nek7.

Dentre as construções testadas e os diferentes sistemas de expressão pôde-se observar, como consta na tabela 9, que todas as Neks que apresentaram um nível de expressão médio/alto em bactérias, o fizeram quando expressas na presença de *lambda* fosfatase e, a Nek 9 não foi expressa em bactéria e, assim como a Nek10 (não apresentado) e Nek11 apresenta maior rendimento no sistema eucarioto. Os resultados para a maioria das Neks, com diversas construções, confirma que estas são proteínas de difícil expressão. Das construções testadas para a Nek4 (77 no total), apenas 9 apresentaram um rendimento médio na expressão e, considerando os problemas já enfrentados no Brasil e a perda decorrente das etapas de purificação subsequentes, optou-se por não mais investir na expressão heteróloga dessa proteína

A co-expressão com *lambda* fosfatase é muito útil para a expressão de proteínas quinases, uma vez que essas proteínas apresentam em geral, quando expressas em bactéria, a propriedade de se autofosforilar durante o enovelamento, o que muitas vezes gera uma proteína hiperfosforilada e com fosforilação em resíduos de aminoácidos inadequados, o que compromete o correto enovelamento e gera uma proteína insolúvel (Shrestha *et al.*, 2012).

No período de estágio no SGC, foi possível a realização de vários experimentos de expressão e purificação das Neks 1, 6 e 7, sendo que embora obtivéssemos grandes quantidades das proteínas 6 e 7 essas mostraram-se muito instáveis, sendo que grande parte das proteínas precipitavam à medida que eram concentradas. Foram testados vários

tampões diferentes para encontrar aquele no qual as proteínas apresentassem melhor comportamento, contudo, as proteínas ainda precipitavam. Com a quantidade que conseguimos concentrar realizamos experimentos de deslocamento térmico (*thermal shift*) e, no caso da Nek6, montamos algumas placas de cristalização, sendo que em nenhuma condição foi observado o aparecimento de cristal. No caso do ensaio de deslocamento térmico, foram testadas as Neks 6 e 7 com 12 placas de 96 poços de uma biblioteca de inibidores de quinases, e, foram observados deslocamentos significativos (maior que 2°C) apenas para 7 inibidores no caso da Nek6, sendo que esses são inibidores comuns para quinases (Figura 61).

Tabela 9: Testes de expressão/purificação para diferentes construções das Neks

Nek	Construções (total)	Construções Procarioto c/ fosfatase	Construções que expressaram*	Construções Procarioto	Construções que expressaram*	Construções em Eucarioto (baculovírus)	Construções que expressaram*
Nek1	24	24	15	24	6	-	-
Nek3	66	50	2	34	0	16	2
Nek4	77	40	7	38	0	19	2
Nek5	24	14	1	7	0	8	1
Nek8	46	30	1	14	1	16	2
Nek9	35	27	0	19	0	8	4
Nek10	59		-	-	-	-	-
Nek11	24	24	7	-	-	20	10

*Expressão média ou alta

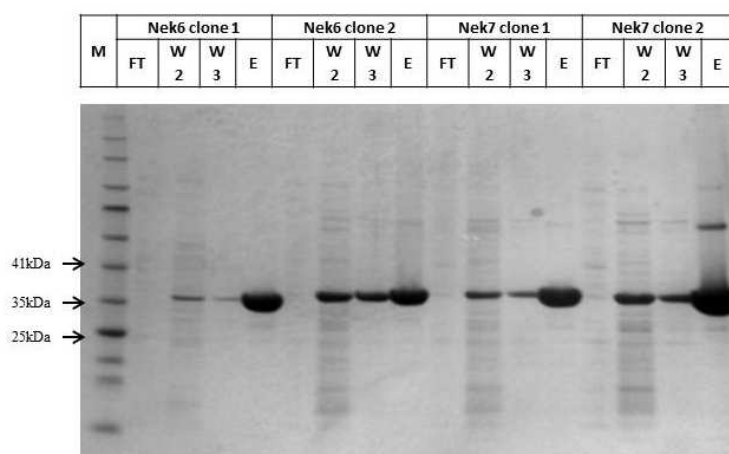


Figura 58: Expressão das Neks 6 e 7. Gel SDS-PAGE das amostras de expressão de dois clones da Nek6 e dois clones da Nek7 após purificação por cromatografia de afinidade por metal. M: marcador; FT: Flow Through; W: wash. E: elution

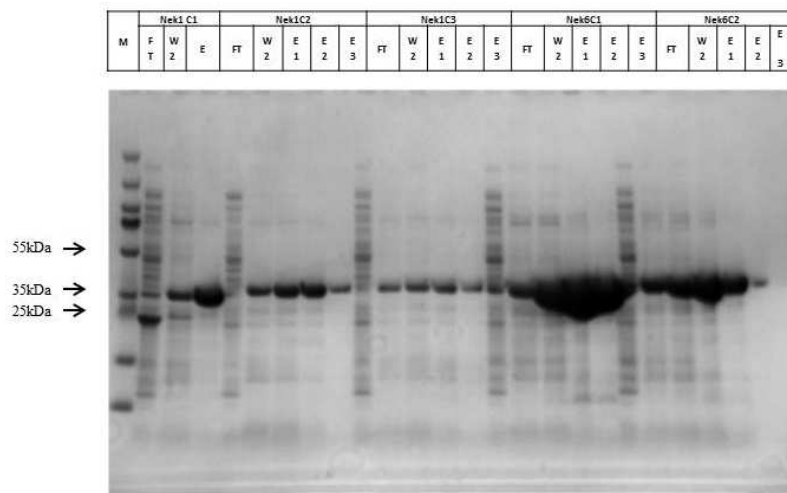


Figura 59: Purificação das Neks 1 e 6. Gel SDS-PAGE das amostras de expressão de três clones da Nek1 e dois clones da Nek 6 após purificação por cromatografia de afinidade por metal. M: marcador; FT: Flow Through; W: wash. E: elution

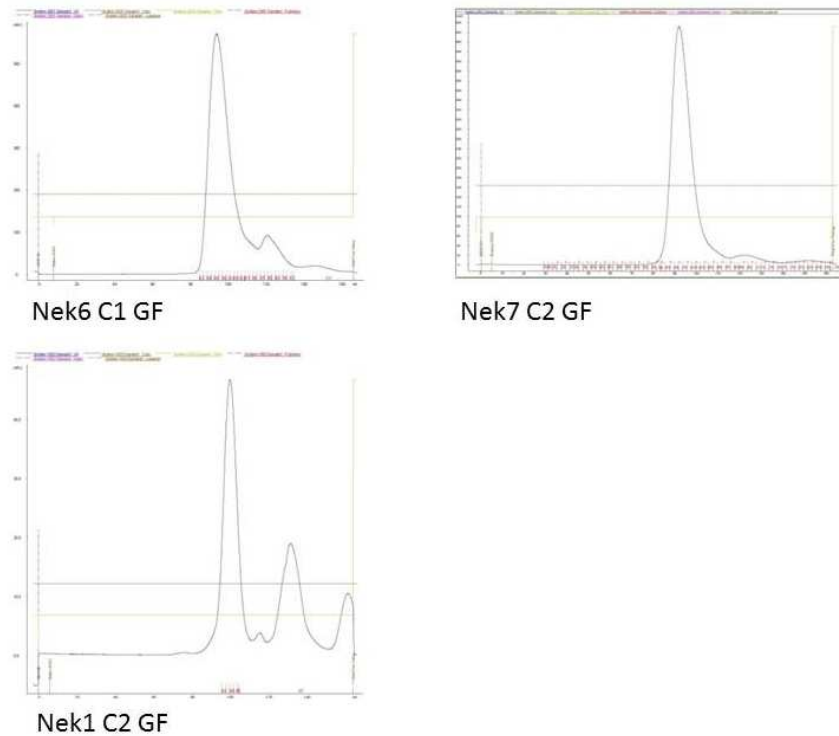


Figura 60: Cromatograma da exclusão por tamanho realizada para as amostras Nek1, 6 e 7. Nek1 construção 2, Nek6 construção 1 e Nek7, construção 2

O período de trabalho no SGC foi interessante pois nos permitiu obter várias construções dos domínios de quinase de diferentes Neks que possibilitam novos testes. Ainda foi interessante observar como é o funcionamento de um laboratório que direciona suas atividades para clonagem, expressão e cristalização, além de teste com inibidores em grande escala, *high throughput* e, dessa colaboração, foi possível obter cristais da Nek1 e a resolução da sua estrutura na presença e ausência de inibidor (PDB ID: 4APC e 4B9D).

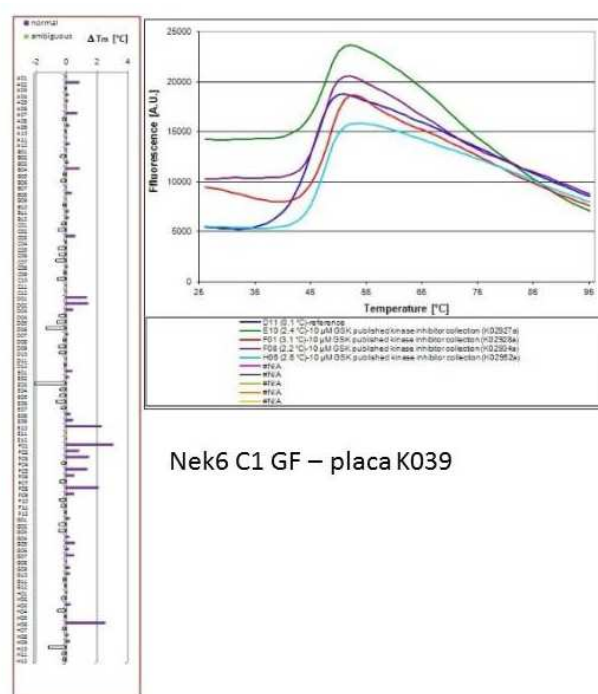


Figura 61: Ensaio de deslocamento térmico para Nek6, construção 1. Na placa K039, 4 compostos apresentaram um deslocamento na desnaturação da Nek6 com valor maior que 2°C,

8.5 Duplo-híbrido em levedura

O sistema de duplo híbrido em levedura é uma ferramenta comumente usada para identificar parceiros de interação entre proteínas. Assim, no primeiro e segundo ano de doutorado esse sistema foi exaustivamente utilizado na tentativa de determinar a rede de interações para a Nek4. Nesse sistema, de forma geral, a proteína de interesse é fusionada ao domínio de ligação de DNA enquanto uma biblioteca de cDNAs, ou algum plasmídeo isolado, codificando as proteínas potencialmente interativas a serem identificadas, é

fusionado ao domínio de ativação de transcrição. Quando ocorre uma interação entre a proteína de interesse e uma proteína da biblioteca, o fator de transcrição funcional completo é reconstituído e os genes repórteres são ativados. Os genes da levedura L40 (genótipo: *trp1-901*, *his3Δ200*, *leu2-3*, *ade2* *LYS2::(lexAop)4-HIS3* *URA3::(lexAop)8-lac GAL4*), uma das cepas utilizada para realização do *screening*, são *LacZ*, que expressa a enzima β -Galactosidase e *HIS3*, que dá habilidade de crescimento em meio sem histidina (Figura 62).

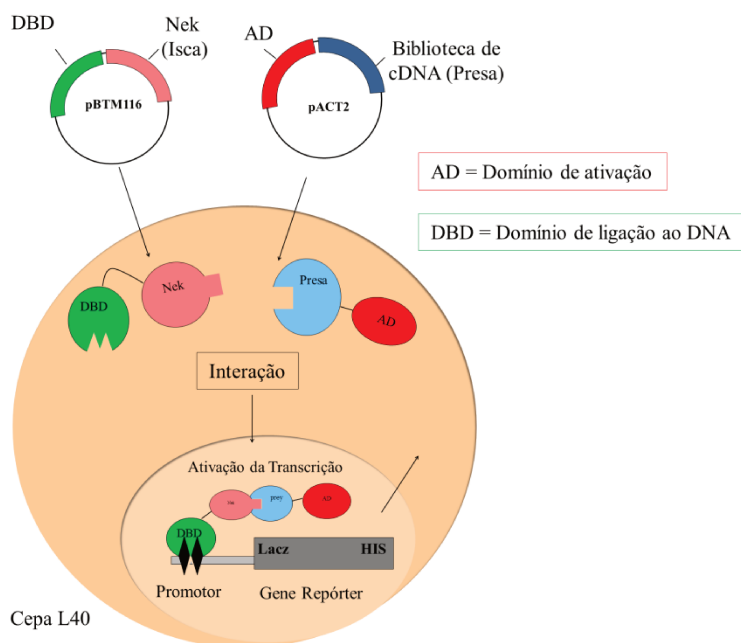


Figura 62: Esquema representativo do sistema de duplo-híbrido em levedura. De forma geral o sistema de duplo-híbrido em levedura baseia-se na indução da transcrição de proteínas essenciais para o crescimento da levedura. Para isto, a isca é clonada em um vetor que contém um domínio de ligação ao DNA, enquanto os possíveis parceiros de interação são clonados em um vetor com domínio para ativação da transcrição. Nesse caso, quando ocorrer uma interação estável entre as duas proteínas, esses domínios podem promover, consecutivamente, a ligação e transcrição dos genes repórteres.

Para o primeiro *screening* de duplo híbrido a ser realizado a Nek4 foi clonada em pBTM116KQ. E como isca, foram usadas as bibliotecas CFH, MO e leucócito, sendo as sequências de cDNA clonadas no vetor pACT. Primeiramente foi realizado o teste para verificar se a Nek4 comprometia o crescimento da levedura ou se apresentava a capacidade de auto-ativação. Neste teste observamos que as leveduras contendo o DNA recombinante (pBTM116KQ/Nek4) não apresentavam alterações no crescimento em meio seletivo e

através do teste da atividade de β -galactosidase, concluímos que proteína Nek4 não apresentava capacidade de auto-ativar, como pode ser observado na Figura 63, a atividade da enzima β -galactosidase foi negativa para pBTM116KQ/Nek4. Como controle positivo foi utilizada a proteína humana Fez1 completa (1-392 - estudada em nosso grupo) clonada no vetor pBTM116KQ, uma vez que ela apresenta capacidade de auto-ativar os genes repórteres, e como controles negativos utilizamos o vetor pBTM116KQ vazio (ϕ) e a região 221-392 da Fez1 uma vez que sem os resíduos iniciais a Fez1 perde a capacidade de auto-ativação.

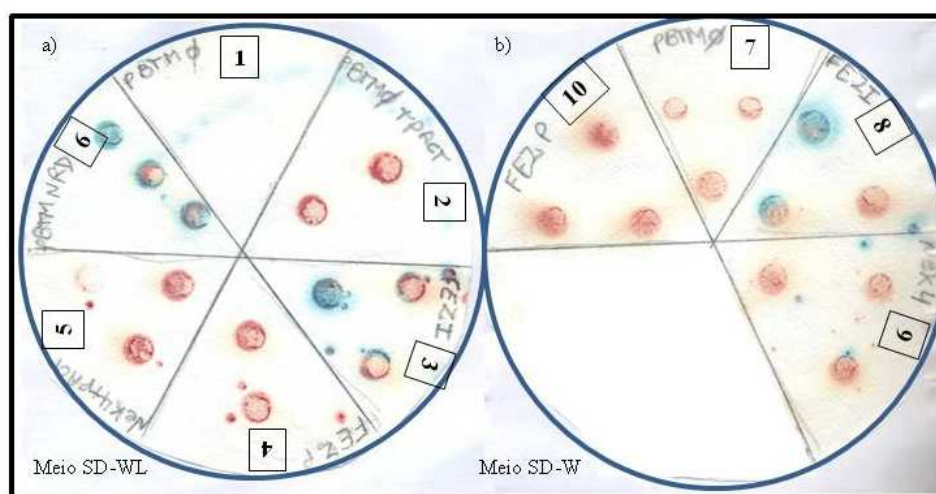


Figura 63: Teste de ativação do gene repórter β -galactosidase e de crescimento para pBTM116KQ/Nek4 em meio seletivo. Em (a), as colônias contendo ambos os vetores, pBTM116KQ e pACT, apresentam capacidade de crescer em meio seletivo SD-WL, contudo, apenas as colônias que forem capazes de auto-ativar o gene repórter para a enzima β -galactosidase são capazes de metabolizar X-Gal e desenvolver coloração azul. Em (a) Controle negativo para crescimento em meio seletivo SD-WL - pBTM ϕ (1), Controles positivos para ativação do gene repórter: pBTM/NRD + pACT ϕ (6) e pBTM/FezI (1-392) + pACT ϕ (3). Controle negativo para ativação do gene repórter da β -galactosidase: pBTM/Fez P (221-392) + pACT ϕ (4), pBTM ϕ + pACT ϕ (2); Em (b) crescimento em meio seletivo SD-W e ativação do gene repórter para β - galactosidase. pBTM ϕ (7); pBTM/FezI (8); pBTM/Nek4 (9) e pBTM/FezP (10).

No *screening*, apesar da eficiência da transformação ficar dentro do esperado para as bibliotecas de cérebro fetal humano ($1,62 \times 10^6$) e medula óssea ($1,33 \times 10^6$), após quatorze dias 56 colônias apareceram, e, após o repique para o teste de crescimento apenas 8 colônias se desenvolveram (A3, B1, C1, C2, C5, F2, F3 e H5) e, destas apenas 5 confirmaram no teste do azul a ativação do fator de transcrição para a β - galactosidase (A3, B1, C1, C2, F2) (Figura 64).

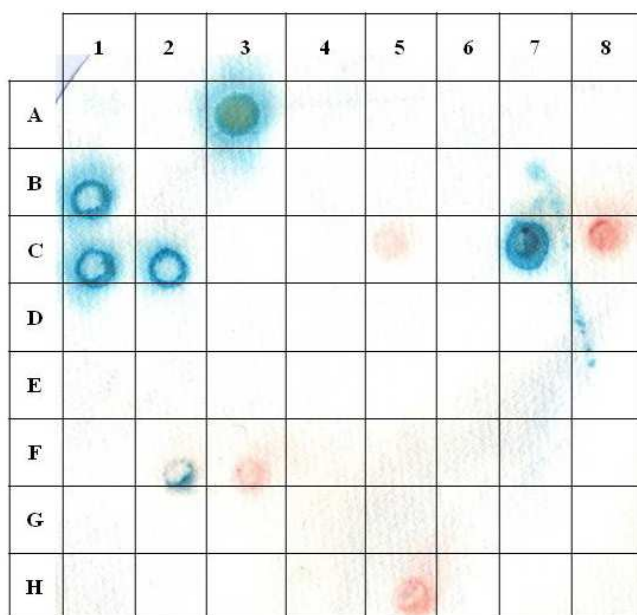


Figura 64: Teste de ativação do gene repórter para β galactosidase com as colônias que cresceram no *screening* do duplo-híbrido para a Nek4. As colônias que cresceram no *screening* foram repicadas em meio seletivo SD-WL e após o crescimento foi realizado teste do azul. C7 e C8 são controles positivo (Fez 1-392), que apresenta capacidade de auto-ativar e dessa forma metabolizar X-Gal, e negativo (Fez 221-392), que não é capaz de ativar o gene repórter, respectivamente.

O DNA das colônias que cresceram em meio seletivo foi extraído e sequenciado. Então, foram analisados contra o banco de dados *GenBank* (NCBI), através do programa BLAST. Dos clones obtidos, foi encontrado em 4 a sequência para a proteína humana PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*), envolvida na origem da leucemia promielocítica aguda (quando fusionada ao gene do receptor do ácido retinóico). Essa proteína, uma vez que apresenta domínio de ligação ao DNA, quando em fusão com o domínio de ativação da biblioteca pode atuar como fator de transcrição e ativar os genes repórteres, sendo então um falso positivo muito comum nesse ensaio e já foi encontrada em outros experimentos realizados em nosso grupo. Foi identificada também a proteína ribossomal 18S, que é um dos componentes da subunidade ribossomal 40S (F3); a proteína N – associada a uma ribonucleoproteína nuclear que participa do processamento do pré-RNAm de eventos de splicing alternativo tecido-específico (H5) e uma proteína hipotética (LOC100506191), sendo que esta foi a única, com exceção dos falsos-positivos, capaz de metabolizar a β -galactosidase no teste do azul (Tabela 10 e Tabela 11), como demonstrado na figura 65).

Tabela 10: Identificação das presas obtidas no *screening* de duplo-híbrido

Código	Nº Acesso	Nome	E value	Aa alin	Pb alin I	Frame	Conf.	Nº clones
C1, C2 B1 e A3	NP_005997.2	zinc finger and BTB domain-containing protein 16	4e ⁻¹⁷¹	146-445	1-900	+1	-	4
F3	NP_072045.1	40S ribosomal protein S18	4e ⁻⁷¹	25-429	1-135	+1	-	1
F2	XP_003119043.1	hypothetical protein LOC100506191	1e ⁻¹⁰			-1	-	1
H5	NP_003088.1	small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	3e ⁻⁵⁸	2-490	6-168	+2	-	1

Aa alin: resíduos de aminoácidos onde ocorre o alinhamento; Pb alin – alinhamento na sequência de cDNA da “presa”; Conf: confirmação

Tabela 11: Resumo dos resultados de crescimento e teste do azul das presas obtidas

Identificação	Biblioteca	Limite 3-AT	Teste Azul
C1	CFH	30 mM	+
F3	Leuc	10 mM	-
F2	CFH	30 mM	+
H5	Leuc	10 mM	-
C2	MO	30 mM	+
B1	CFH	30 mM	+
A3	CFH	30 mM	+

Para confirmar se a ativação dos genes repórteres era mesmo decorrente de uma interação da Nek4 com as proteínas presentes na biblioteca foi realizado o teste de confirmação, contudo, não se obteve sucesso em todas as co-transformações, sendo que das colônias que cresceram nenhuma confirmou a interação com a Nek4. As colônias que continham a sequência codificante para a PLZF, como esperado, foram capazes de ativar o

gene repórter da β -galactosidase tanto na presença como na ausência da Nek4, confirmando então ser um resultado falso positivo do experimento (Figura 65). Infelizmente não foi possível realizar o teste com a proteína hipotética uma vez que a co-transformação não funcionou.

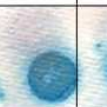
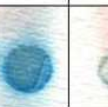
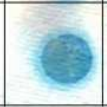
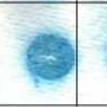
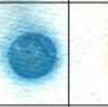
Presas	C2	B1	A3	H5	C-/C+
pBTMvazio+ presa					
pBTM-Nek4+presa					

Figura 65: Teste do azul para confirmar interações entre a Nek4 e as proteínas pescadas no duplo-híbrido. As presas foram co-transformadas com pBTM116KQ vazio ou pBTM116KQ-Nek4 em levedura e as células foram plaqueadas em meio seletivo SD-WL e foi realizado o teste do azul. C- controle negativo de auto-ativação – Fez 221-392; C+ controle positivo de auto-ativação – Fez 1-392

A técnica de duplo híbrido apresenta algumas limitações, como por exemplo: a fusão do domínio de ligação pode ocluir o sítio de interação com outras proteínas ou ainda atrapalhar o enovelamento da proteína em estudo. Além disso, a levedura pode não sustentar o correto enovelamento da proteína ou as modificações pós- traducionais necessárias, as interações podem ser fracas ou fugazes, a proteína pode ser tóxica para a levedura (Koegl e Uetz, 2007; Fields, 2009). Outra limitação pode ser a da levedura não suprir as condições necessárias para o correto enovelamento ou para as modificações necessárias para a Nek4 interagir com outras proteínas. No segundo semestre do segundo ano de doutorado Coene e colaboradores (2011) publicaram seu estudo, no qual se referem a realização de um duplo-híbrido realizado com cDNA de retina humana e três fragmentos distintos de Nek4 e a proteína inteira como isca. Curiosamente, verificou-se crescimento apenas no experimento realizado com um fragmento da Nek4, que compreendia os aminoácidos 560-841. E, nesse caso, apenas um parceiro de interação foi encontrado. Esse resultado ainda suporta a experiência que o nosso grupo já teve com a Nek1, a maior das

Neks humanas, onde só foi possível identificar interação quando o *screening* foi realizado com fragmentos da proteína (Surpili, Delben e Kobarg, 2003). Diante dessas dificuldades optou-se por lançar mão de outro sistema, como a expressão estável em célula de mamífero para imunoprecipitação dos parceiros de interação e subsequente identificação destes por espectrometria de massas.

8.6 Artigos submetidos/aceitos

8.6.1 Artigo I

Idetification of new interaction partners for Nek4 and characterization of its novel isoform

Fernanda Luisa Basei, Deivid Lucas Migueleti, Gabriela Vaz Meirelles, Jörg Kobarg

Artigo submetido a revista Proteome Science.

8.6.2 Artigo II

“Stop Ne(c)king around: How interactomics contributes to functional charcarterize Nek family kinases”

Gabriela Vaz Meirelles, Arina Marina Perez, Edmárcia Elisa de Souza, Fernanda Luisa Basei, Priscila Ferreira Papa, Talita Diniz Melo Hanchuk, Vanessa Bonfim Cardoso and Jörg Kobarg

Revisão aceita para publicação na revista World Journal of Biological Chemistry

Identification of new interaction partners for Nek4 and characterization of its novel isoform

Fernanda Luisa Basei^{1,2}

Deivid Lucas Migueleti^{1,3}

Gabriela Vaz Meirelles¹

Jörg Kobarg^{1,2,3}

1 Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P.6192, 13084-971 Campinas, SãoPaulo, Brazil.

2 Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

3 Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes - Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

Address correspondence to: Jörg Kobarg, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Laboratório Nacional de Biociências, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P. 6192, 13084-971 Campinas - SP, Brasil, Tel.: (+55)19-3512-1125, Fax: (+55)19-3512-1006, E-mail:

jorg.kobarg@lnbio.cnpem.br

fernanda.basei@lnbio.cnpem.br

gabriela.meirelles@lnbio.cnpem.br

deividmigueleti@gmail.com

Abstract

Background: Neks are serine-threonine kinases that are similar to NIMA, a protein found in *Aspergillus nidulans* which is essential for cell division. In humans there are eleven Neks which are involved in different biological functions besides the cell cycle control. Nek4 is one of largest members of the Neks family and has been related to the primary cilia formation and in DNA damage response. However, its substrates and interaction partners are still unknown. Thus in an attempt to better understand the role of Nek4 we performed an interactomics study to find new biological processes in which Nek4 is involved. Besides, we described here a novel Nek4 isoform and compared the interactomics profile of these two Nek4 proteins.

Results and Discussion: Isoform 1 and isoform 2 of Nek4 were expressed in human cells and after an immunoprecipitation followed by mass spectrometry, 474 interacting proteins were identified for isoform 1 and 149 for isoform 2 of Nek4. 102 proteins are common interactors between both isoforms. Our results confirm Nek4 involvement in the DNA damage response, cilia maintenance and microtubules stabilization, and raise the possibility of new functional contexts including mRNA processing, apoptosis signaling, stress response, translation and protein quality control. Among the interaction partners, we found important proteins such as TRAP-1, Whirlin, PCNA, 14-3-3 ϵ , Btf, PARP-1, SRSF1, PAI-RBP1 and KAP-1. We could observe that both isoforms share functions that are

new to the Nek family, and isoform 1 apparently has also maintained functions which have already been established to other Nek family members.

Conclusions: this study provides new insights into Nek4 functions, identifying new interaction partners, localization to new cellular compartment and further suggests an interesting difference between isoform 1 and the novel isoform 2 of Nek4. Nek4 isoform 1 may have maintained similar roles compared to other Neks and these roles are not all preserved in isoform 2.

Keywords: Neks, Interaction Partners, DNA damage response, apoptosis, mRNA processing

Background

Neks (NIMA-related kinases) are a group of serine-threonine kinases that are related to NIMA, their orthologous from *Aspergillus nidulans* which is essential for cells to enter in mitosis. Human Neks show around 40% amino acid sequence similarity in their kinase domains with NIMA. While in *Aspergillus nidulans* there is only one NIMA, in humans there are eleven proteins that constitute the Nek family and that diverge in their N-terminal and specially C-terminal regulatory domains from NIMA [1,2]. For this reason it has been speculated that human Neks show additional and diversified biological functions besides cell cycle control [3]. Until recently the only in depth studied Neks were Nek 2, 6 7 and 9. Until recently the only in depth studied Neks were Nek 1, 2, 6, 7 and 9. All of these, except Nek1, are related to mitosis progression and the regulation of centrosome separation [4-6]. Nek1 has been described to be

involved in the primary cilia formation [7,8], DNA damage response [8-11] and recently in apoptosis signaling [12,13].

Nek4, initially named as STK2 [14], is one of the largest human Neks proteins, constituted by an N-terminal kinase domain and a C-terminal regulatory domain. The human Nek4 gene is located on chromosome 3p21.1 and is transcribed into a ~4kb mRNA, encoding an 841 residues protein [15].

Nek4's biological role is still not well understood. Some reports have already excluded the importance of Nek4 for cell cycle control [16,17] and others have demonstrated that Nek4 can share other functions, such as regulation of microtubule stability, primary cilium assembly, and association to replicative senescence and DNA damage response [16-18] with others Neks, mainly, Nek1, Nek8 and Nek11 [9,11,19-22].

Aiming to better characterize Nek4 protein interactome and possible functions, we amplified it from the human cell line HEK 293T and performed an immunoprecipitation followed by mass spectrometry (IP-MS) experiment. We were able to amplified two Nek4 isoforms and, report here new insights in Nek4 functions and its novel isoform.

Results and Discussion

Identification of a novel Nek4 isoform

Nek4 was initially identified by Cance and co-workers [14] as STK2, from Serine/Threonine kinase 2, in a study using a kinase specific cDNA library from human breast cancer tumors or breast cancer cells. In that study they observed that STK2 showed homology to *Aspergillus nidulans* NIMA protein and its expression was observed at widely variable levels in the human breast tumors. Lately, Levedakou and co-workers [15] also isolated STK2 using a breast cancer cell line. Additionally, Levedakou and co-workers characterized the STK2 cell cycle expression profile as well as its tissue specificity, showing that this kinase is expressed in high levels, but not exclusively, in the heart and its mRNA levels are not cell cycle-dependent. Later, after studies with murine STK2 [23,24], these proteins started to be renamed correctly as Nek4. In our study we were able to amplify the coding sequence (CDS) for a novel isoform of Nek4. The CDS for this isoform was amplified from cDNA libraries (data not shown) and also from HEK293T cells (Figure 1 A). From the later, we also amplified the CDS for isoform 1 [GenBank Refseq: NM_003157.4] described by Levedakou and co-workers [15] which will be named as Nek4.1 in this report. The novel amplified isoform [GenBank accession: KJ592714] is very similar to murine Nek4 long isoform [24] and we will denominate it here as Nek4.2. The difference between Nek4.1 and Nek4.2 is that the codifying cDNA for Nek4.1 holds a 138 bp insertion in the regulatory domain in comparison with Nek4.2 and also shows higher expression levels, suggesting that it is the predominant

form (Figure 1 A) [25]. This insertion corresponds to an *Alu* sequence, the most abundant DNA repetitive element in the primate genome. It was denominated *Alu* because it contains a sequence to *AluI* restriction enzyme. The presence of this element in transcript regions is not common although, growing evidences have shown that transposable elements are found in coding sequences of up to 4% of human genes and that *Alu* elements correspond to 33% of these insertions [26]. The insertion of an *Alu* sequence could add a new splicing site in *Nek4* mRNA, changing its expression profile. Besides, the translated protein from the mRNA containing the *Alu* sequence could have different functions and/or subcellular localization due to this potentially new interaction region [27,28]. In case of *Nek4*, the *Alu* insertion does not promote a frame shift, codifying therefore a protein with additional 46 amino acids residues in the middle of its regulatory domain (Figure 1 B).

As the information about *Nek4* biological functions and protein interactome is scarce, we performed an IP-MS experiment with a stable cell line for *Nek4* isoforms expression (Figure 1 C) to gain more information about the biological context in which this protein is involved and the possible differences between both isoforms.

Interestingly, the number of partners identified for *Nek4.1* (474) was three times greater than the obtained for *Nek4.2* (150) (Figure 1 D). The two isoforms showed a relatively small overlap (102) of interactors, pointing out that *Nek4.1* may have acquired novel functions mediated by new interaction partners.

Nek4 is expressed in several cellular compartments

The identified Nek4 interacting proteins are proteins localized to several cellular compartments. Nek4 shows a nuclear localization sequence (RRQKRREQTE) (NLS) on its regulatory domain with a high prediction score (NucPred predictor – [29]) which has already been described previously [24]. In immunofluorescence experiments we could observe a nuclear dotted staining pattern for Nek4, indicating that Nek4 localizes to specialized sub-structures in the nucleus (Figure 2 A - C). Using PML bodies and nuclear speckles markers we could observe a partial colocalization of Nek4 on PML bodies (Figure 2 A) and a strong colocalization on nuclear speckles (Figure 2 B - C).

PML bodies are circular structures found in a variable number in the nucleus. They are basically constituted by PML (Promyelocytic Leukemia) protein and contain also Sp100 and Daxx proteins. In the past they were considered as a storage place for nuclear proteins but recently the role of these bodies has been associated to cell senescence, transcriptional regulation, apoptosis and DNA damage response [30,31] (reviewed in [32]). Despite the Nek4 localization in PML bodies has never been described before, the Nek4 involvement in DNA damage response and replicative senescence entry [18] could justify the presence of Nek4 in this structure.

Nuclear speckles are also dotted nuclear structures and they are involved in mRNA processing once pre-messenger RNA splicing factors and spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins are found in nuclear speckles (reviewed in [33]). Nek4 localization in this compartment is surprising and may indicate a new function to the Nek family (Figure 2 B - C).

Furthermore, we identified Nek4 in mitochondria (Figure 2 D). Previously another Nek family member, Nek1, was related to an anti-apoptotic mitochondrial-driven process [12]. These researchers found that Nek1 phosphorylates the membrane protein VDAC in the domain pointing to the cytoplasm, thereby preventing the channel opening and release of Cytochrome c, required to initiate apoptosis. In a similar way, Nek4 could also participate in the regulation of cell death as Nek1.

Functional networks analysis

The cellular localization experiments support the interactions found in the IP-MS experiment. The Nek4 interactome shows proteins annotated in different cellular compartments that are also involved in biological processes already described for Nek4 or other Nek family members. On the other hand, it also shows Nek4 in completely new functions not described before (Figure 3).

The *in silico* PPI automated analysis and manual annotation (cilium maintenance/assembly) of Nek4.1 functions show 14 enriched biological processes. Nek4.2 shows 9 enriched different biological processes and among these, 3 processes – mRNA splicing, apoptosis and cell cycle checkpoint – were also enriched in Nek4.1 analyses. The difference between these proteins consists in DNA repair, cell proliferation (with proteins detected in two or more experiments), cilium maintenance, translation, cell adhesion and microtubule cytoskeleton organization processes. This indicates that Nek4.1 may expand to other functions related to other Nek family members (DNA repair, microtubule organization and cilium function) or may even acquire new functions such as

regulation of translation and cell adhesion, previously not described for other Nek family members. Interestingly, mRNA splicing and RNA metabolism in general, is a functional context common to both isoforms that also has not been reported previously for neither Nek4 nor other Nek family members.

Notably, some interesting Nek4 binding partners already described in literature were also identified in our experiment, such as Protein Fanton (RPGRIP1L) [17] and X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6) [18], validating our results. The next sections will explore some biological contexts that Nek4 could be involved in accordance to its protein interaction profile.

Nek4 and DNA damage response

Recently, Nguyen and co-workers showed the role of Nek4 in the DNA damage response (DDR) [18]. In this study, which attempted to identify proteins involved in replicative senescence, Nek4 depleted cells were found to be resistant to enter in replicative senescence and this response was associated to the decrease of p21 levels. Moreover, these cells were resistant to DNA double-break agents, such as etoposide, bleomycin and γ -irradiation, maintaining their ability to proliferate. Performing an IP-MS experiment they found that Nek4 interacts with DNA-PKcs, Ku70 and Ku80, important players in Non-Homologous End Joining (NHEJ) response. Nek4 depleted cells show a decrease of γ H2AX activation, probably as a result of the DNA-PKcs recruitment impairment. Moreover, p53 activation through S15 phosphorylation, in an ATM independent way, was reduced in Nek4 depleted cells [18].

Besides, classical interaction partners already described for Nek4, such as XRCC6 or Ku70 [18], were also identified in our IP-MS experiment Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1), E3 ubiquitin-protein ligase CHIP (STUB1), Transcription intermediary factor 1-beta (TRIM28 or KAP-1) and Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Figure 3). Interestingly, most of them are involved in double-strand break (DSB) repair and γ H2AX phosphorylation. Other identified proteins also related with these functions include DNA replication licensing factors (MCMs), Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR (SETMAR), Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), Bcl-2-associated transcription factor 1 (BCLAF1) or Btf and DNA repair protein complementing XP-G cells (ERCC5) (Figure 3).

PARP-1 and PCNA (Figure 4) which are mainly involved in Base Excision Repair (BER) pathway (reviewed in [34];[35,36] while ERCC5 (together with PCNA) [37] is mainly involved in Nucleotide Excision Repair (NER). Besides the role of Nek4 in the DNA-PKcs/Ku70 and Ku80 complex (that remains to be clarified) we speculate that Nek4 could also participate in DDR-mediated cell cycle arrest and cell death signaling.

Another protein found in our experiment is BCLAF1 and its role mediating the cell decision (repair versus death) has been previously reported [38]. The BCLAF1 expression is increased in the nucleus in association with γ H2AX after high doses of irradiation. After DNA damage DNA-PKcs phosphorylates BCLAF1 inducing thereby its translocation to γ H2AX foci. BCLAF/DNA-PKcs interaction is important to the stabilization of DNA-PKcs/Ku70 complex. In γ H2AX foci BCLAF1 induces G2/M cell cycle arrest mediated by p53. Furthermore, a fraction of BCLAF1 remains in the cytosol where it induces

Ku70/Bax dissociation, promoting Bax activation and apoptosis [38]. Since Nek4 interacts with all the mentioned repair proteins it is conceivable that Nek4 may either through phosphorylation or interaction regulate the activity of these proteins [38]. The possible relationship between Nek4 and cell death will be exploited further in a specific section.

Nek4 and Cilia

Human ciliopathies arise from defects in the primary cilium and can lead to obesity, retinal degeneration, polycystic kidney disease (PKD) and are also associated with a wide range of morphological abnormalities [39]. Nek4 has been functionally implicated in the regulation of primary cilium stability, which was already described to other Nek family members, Nek1 and Nek8 [7,20]. Coene and co-workers showed that Nek4 interacts with RPGR-interacting protein 1 (RPGRIP1) and RPGRIP1-like protein (RPGRIP1L) [17], both associated with ciliopathies, such as eye-restricted disease Leber congenital amaurosis and Joubert and Meckel syndromes, which affect multiple organs and are at the severe end of the ciliopathy spectrum. After Nek4 knockdown, the ciliated cell number decreases but this effect is not related to either RPGRIP1 or RPGRIP1L phosphorylation, suggesting Nek4 is actually a scaffold to cilia signaling proteins [17]. The same group also showed the localization of Nek4 at the cilia root, suggesting that Nek4, similar to Nek2, could be important for cilia stability. However unlike Nek2, 6, 7 and 9, Nek4 is not essential for centrosome separation [4 – 6]. The stability of cilia mediated by Nek4 could be related to microtubule stabilization since Nek4 involvement in microtubule polymerization has already been shown by Doles and Hemann [16].

In our IP-MS experiment, we have identified the protein Whirlin (DFNB31) which, together with Unconventional myosin-VIIa (MYO7a), also found in our experiment, is a member of the Usher network, a complex of adapter and motor proteins, cellular adhesion factors and transmembrane receptors, which are important to cilia, stereocilia and general cellular morphology [40,41]. Mutations in DFNB31 gene promote Usher syndrome, an autosomal recessive condition related to retinitis pigmentosa and congenital deafness [42]. Using immunofluorescence analysis we could also observe that Nek4 colocalize with Whirlin (Figure 4). In a study by Wright and co-workers was showed the colocalization of Whirlin and RPGR^{ORF15}, a splicing variant of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR), in photoreceptor connecting cilia [43]. Besides cilia localization, Whirlin is also found in the stereocilia [41,44], a structure that differently from cilia, is constituted basically of actin filaments. In the rat stereocilia, from cochlea or vestibular region, the Whirlin localization changes during development, going from the base to the tip of the stereocilia, indicating that Whirlin participates in the stereocilium growth and differentiation [44].

In this context we have also identified two proteins involved in intraflagellar transport: Tetratricopeptide repeat protein 21 B (TTC21B) and Intraflagellar transport protein 172 homolog (IFT172). TTC21B is important for the retrograde intraflagellar transport and essential to the maintenance of the structure of the sensorial cilia in photoreceptors and kidney [45]. IFT172 participates in the IFT complex B, involved in anterograde transport and mutations in this gene were related to ciliopathies, such as Asphyxiating thoracic dystrophy or Jeune syndrome and Mainzer-Saldino (MZSDS)

syndrome [46]. Nek4 does not act as a RPGRIP kinase, but works as a scaffold protein. As we identified here different proteins important for cilia function, we believe that Nek4 could interact with a complex of proteins and among them, some could be Nek4 substrate. Clearly, more studies are necessary to better understand Nek4 role in this context and to identify its possible substrates.

Association of Nek4 to Mitochondria and Apoptosis

After genotoxic stress, the mitochondria permeabilization is essential to cell death via Cytochrome c release, from mitochondria to cytosol. Cytochrome c release occurs through opening of permeability transition pore (PTP). It has been proposed that PTP is constituted of VDAC1, a protein of the external membrane, ADP/ATP translocase (ANT) and the protein membrane associated Cyclophilin D (PPIF) [47]. PTP opening can occurs after intracellular acidosis, decrease in ATP or calcium levels in mitochondrial matrix, or interaction of VDAC with Bcl-2 family members [48].

In our IP-MS experiment we have identified several proteins related to the apoptotic process (Figure 3), such as Heat shock protein 75 kDa (TRAP1) (Figure 4), Apoptosis-inducing factor 1 (AIFM1) and ANT3 (SLC25AC) (Figure 4). ANT3 is an ADP/ATP translocator and could be part of PTP. There is an evidence that it is involved in the response to TNF-alpha ROS generation and mutations in ANT3 result in a decrease of apoptosis after TNF-alpha treatment [49]. Chen and co-workers showed that Nek1 is the main kinase responsible for VDAC1 phosphorylation. VDAC1 phosphorylation protects cells from DNA

damage induced death, because it prevents the PTP opening and maintains the mitochondrial membrane potential [12].

TRAP1 is a mitochondrial heat shock protein [50] that plays several roles in mitochondria including protection against cell death induced by ROS [51]. This protection could be related to different types of stresses, like hydrogen peroxide, cisplatin and DME [52], which indicates the TRAP1 importance as a therapeutic target in cancer treatment since the decrease in ROS levels has been associated to chemotherapeutic resistance [53–55]. Moreover, another interesting role of TRAP1 lies in the quality control of the proteins destined to mitochondria [56]. TRAP1 interacting with TBP7/Rpt3, in the interface region between the endoplasmic reticulum and the mitochondria would be important to decide if a protein could enter in mitochondria or should be degraded.

AIFM is a protein from the mitochondrial intermembrane space that is implicated in diverse processes, such as the maintenance of the electron transport chain function, regulation of the production of reactive oxygen species, cell death and neurodegeneration [57–59]. AIFM1 is considered a death mediator independent of caspase. After cellular stress AIF translocates from the mitochondria to the nucleus where it induces DNA fragmentation and the AIF activation and translocation is mediated by PARP1 [reviewed in 60;61] a DDR related protein, which also was identified by us as a Nek4 interactor. Curiously, in cells expressing high levels of TRAP1, Gesualdi and co-workers observed that AIFM1 levels in the nucleus did not increase after stress [52]. This is particularly interesting once free radicals scavenger role have already been reported to AIFM1 [60], indicating that in TRAP1 presence the role protective to AIF is predominant then pro-apoptotic role.

Another interesting protein identified, implicated in a large spectrum of signaling pathways, is 14-3-3 ϵ (YWHA ϵ) (Figure 4). Although not clustered in the apoptotic process (Figure 3), this protein is a member of the 14-3-3 proteins (with 7 subtypes) family which usually binds to phosphorylated proteins modifying their functions or cellular localization. Bax, an important apoptosis regulator, for example, remains in the cytosol in normal conditions due to the interaction with 14-3-3 proteins. After some kind of stress, such as the increase in calcium levels, this interaction is disrupted releasing thereby Bax to translocate to mitochondria to promote activation of cell death pathways. BAD, another pro-apoptotic protein, after pro-apoptotic stimulus, such as UVC or staurosporin exposition, dissociates from 14-3-3 and interacts with Bcl-X(L) inducing apoptosis [62].

14-3-3 are also important regulators of the G2/M checkpoint, since after DNA damage 14-3-3 interacts with the phosphatase CDC25C sequestering it from nucleus and, in this way, blocking cell cycle progression [63]. It is possible that the interaction of Nek4 with 14-3-3 ϵ is also necessary to mediate Nek4 transition between nucleus, cytosol and mitochondria in special conditions such as the DNA damage.

Nek4 and mRNA processing

Our protein-protein interaction networks strongly indicate a possible Nek4 involvement in mRNA processing; especially spliceosome mediated processing (Figure 3). This is particularly interesting, since the involvement of Neks in this function has not been reported so far and, as both isoforms interact with

proteins which participate in this process, it seems that mRNA processing is a common and possibly primordial function of Nek4. Furthermore our immunofluorescence data show endogenous Nek4 localization to nuclear speckles, which are nuclear sub-structures known to be enriched in small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) and many other transcription-related and pre-mRNA splicing related proteins (Figure 2). Among the proteins found in our IP-MS experiment there are several splicing factors and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), including hnRNPQ, that has been functionally implicated in several aspects of mRNA maturation, including mRNA degradation of specific mRNAs, such as that of *c-fos* [64,65]. In the cytoplasm, several hnRNPs proteins are involved in RNA-related processes and they can be frequently found in two specialized structures, known as GW-bodies (GWbs), previously known as processing bodies: PBs, and stress granules (SGs). GWbs have been early reported to be involved in the mRNA decay process, acting as a site of mRNA degradation. In a similar way, stress granules (SGs) have been described as cytoplasmic aggregates, which contain accumulated mRNAs in cells under stress conditions and present reduced or inhibited translation. Moreover, Quaresma and co-workers showed endoplasmic reticulum localization of hnRNPQ after stress induced by PMA, thapsigargin, arsenite or heat shock [66].

In our interactome study, we also identified PAI-RBP1 (CGI-55 or SERBP1), which shows 40.7% of similarity with Ki-1/57 and share with it interacting partners, such as chromatin remodeling factor chromo-helicase DNA-binding domain protein 3, DAXX and Topors [67]. Ki-1/57 also interacts

with hnRNPQ and is associated to regulatory events of pre-mRNA processing and transcription [68].

PAI-RBP1 interacts with several RNA-binding proteins and under stress conditions accumulates in stress granules in the cytoplasm and nucleolus. Stress granules are formed when the transcription is blocked during a stress condition and act as important protectors of mRNA/mRNP until cell recovery. [69].

Several data from literature suggested that after genotoxic stress the splicing pattern of pre-mRNAs can be modified. Furthermore post-translational modifications, such as sumoylation, phosphorylation, ubiquitylation or methylation, can lead to changes in splicing factor function and localization, therefore also altering the splicing of pre-mRNA [reviewed in 70]. It has already been demonstrated to SRPK kinases, which, after genotoxic stress, translocate from cytosol to nucleus where hyperphosphorylates the splicing factors [71]. Since we have also found ASF/SF2 (SRSF1) splice factors in our analysis and Nek4 localizes to nuclear speckles, it is possible that Nek4 can modify splicing factors activity or by phosphorylation or through direct interaction and thereby changing its functions or localization.

Conclusions

Here we have characterized the interaction profile of Nek4 and its novel isoform. These results allow the confirmation and extension of the current knowledge on the biological processes in which Nek4 participates. This study shows that the novel isoform, Nek4.2, is involved in mRNA processing,

apoptosis and transcription, all processes not described before for other Nek family members. Curiously, Nek4.1, which holds an insertion on its regulatory domain, shows a broader interaction spectrum, sharing interactions and biological processes with isoform 2 but also holding new functions already described for other Neks, such as DNA repair and cilia functions. Though, all of these different biological processes seem to be interconnected and Nek4 could integrate them by controlling cell response to different kinds of stresses, through regulation of expression, localization or protein quality.

A better understanding of the Nek4 interactions shown here in its biological context requires a depth and detailed investigation. However, our findings are the first steps towards the elucidation of novel Nek4 roles and consist in the pieces of a big puzzle that need to be integrated. Further studies are necessary to dissect the real role of Nek4 in these novel functions described here, such as mRNA processing, apoptosis and also transcription regulation.

Methods

Molecular cloning

The full length Nek4 [GenBank RefSeq: NM_003157.4] and its novel isoform sequence [GeneBank accession: KJ592714], named here as Nek4.1 and Nek4.2, respectively, were amplified by PCR from a human fetal brain cDNA library (Clontech) and cloned into the pcDNA5-FRT-TO vector between *Bam*HI and *Not*I restriction sites. The occurrence of these isoforms was confirmed by RT-PCR amplification from HEK293 cells.

Cell culture and establishment of a stable cell line

All cell lines used in this study were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO) plus 10% FCS, supplemented with 2mM L-Glutamine and 100 U/ml penicillin-streptomycin. Stable cell lines to Nek4 expression were generated from HEK293 Flp-In T-REx cells, containing recombination sites. These cells were transfected with pcDNA5-FRT-TO vector containing codifying sequences to both Nek4 isoforms expression or empty vector fused to a Flag tag and a recombinase expression plasmid (pOG44) using Lipofectamine (Invitrogen). After selection with hygromycin (100µg/mL), the clones were tested for Nek4 expression, induced by addition of tetracycline (500 ng/ml) in culture medium, using western blotting analysis.

Cell lyses and immunoprecipitation

In order to identify Nek4 binding partners, HEK293 Flp-In FRT cells were grown at 70% confluence in 175 cm² flasks (5 flasks per condition) and then 500ng/mL of tetracycline was added in culture medium. Cells were harvested 48h after the induction with tetracycline. Pellets were washed with PBS and then centrifuged for 5 min at 450 g and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitors (2 mM Sodium Orthovanadate, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM Sodium Fluoride (Sigma)). After 30 min of incubation on ice, the cell lysates were centrifuged for 15 min at 12,000 g at 4 °C to clear cell debris. Total protein concentration was determined by Bradford assay according to the

manufacturer's instruction (Sigma). Equal amount of cell lysates to each sample were incubated at 4 °C overnight under gentle agitation with 150 µL of anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma). The beads were washed three times with TBS buffer (150 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 150 mM NaCl) and the immunocomplexes were eluted with FLAG peptide (Sigma) at a final concentration of 150 ng/µL for 30min at 4 °C, under agitation. The eluate was analyzed by western blotting and mass spectrometry.

Western blotting

Eluted proteins were separated by SDS-PAGE in sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.8% SDS, 0.2% bromophenol blue, 45% glycerol, 20% 2-β-mercaptoethanol) and then transferred onto a 0.45µm PVDF membrane (Millipore). After transfer, the membrane was blocked with TBS-T (TBS containing 0.1% of Tween 20) containing 5% non-fat milk. The primary antibody used was mouse anti-Flag M2 (Sigma 1:5000) and the membrane was probed overnight at 4°C under gentle agitation. After the washing step with TBS-T, the membrane was incubated with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse antibody (Calbiochem 1:5000)) for 1 hour. The immunoreactive proteins signals were developed using Luminol (Santa Cruz Biotechnology) and the membranes were exposed to photographic film (GE Healthcare). In addition, the protein bands were visualized in SDS-PAGE using silver staining.

LC-MS/MS

The immunocomplexes (80-200µg of protein) were reduced (500 µM dithiothreitol for 30 min at 56 °C), alkylated (4 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark), and digested with trypsin (Promega). The samples were dried in a vacuum concentrator and reconstituted in 20 µL of 0.1% formic acid. 4.5 µL of the resulting peptide mixture was analyzed on an ETD enabled LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled with LC-MS/MS by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. The LC-MS/MS was performed by the Mass Spectrometry Facility at Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil. All of the instrument methods for the LTQ Velos Orbitrap were set up in the data-dependent acquisition mode.

Peak lists (msf) were generated from the raw data files using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) with Sequest search engine against Swiss-Prot human database (released March 25Th 2013), with carbamidomethylation (+57.021 Da) as the fixed modification and methionine oxidation (+15.995 Da) as variable modification, allowing one trypsin missed cleavage site and a tolerance of 10 ppm for precursor and 1 Da for fragment ions.

Mass spectrometry data analysis and *In silico* PPI analysis

To classify real interactions, were discarded proteins that have appeared at least one time on the control (empty Flag vector). Some proteins that have already shown in literature as Nek4 interaction partners were identified in only one replicate and for this reason the proteins that were identified one time were

also maintained on analysis and were discriminated on table I (see additional Material) and Figure 3.

The retrieved Nek4.1 and Nek4.2 interacting partners from AP-MS were integrated in interaction networks using the Integrated Interactome System (IIS) platform, developed at National Laboratory of Biosciences, Brazil (Carazzolle et al., submitted). The enriched biological processes from the Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>) database were calculated in each network using the hypergeometric distribution (Carazzolle et al., submitted) The interaction networks were visualized using Cytoscape 2.8.3 software [72].

Indirect Immunofluorescence

In order to perform the image experiments HeLa or HEK293T cells were grown in coverslips and fixed and permeabilized with ice cold methanol for 10 minutes at -20 °C. Fixed cells were blocked in PBS-T (1X PBS, 0.1% Triton X-100, and 3% BSA) for 20 minutes and then incubated with primary antibodies (goat anti-Nek4 (SC5517), mouse anti-Nek4 (SC81332) rabbit anti-TRAP1 (SC8665), mouse anti-whirlin (SC271939) or goat anti PML (SC9863) from Santa Cruz Biotechnology, rabbit anti-14-3-3e (PA5-24165) mouse anti SLC25A6 (PA5-29199) from Thermo Scientific and mouse anti-SC-35 (ab11826) or mouse anti-VDAC (ab14734) from Abcam) in the same buffer. Primary antibodies were detected with secondary antibodies (Donkey anti goat Alexa Fluor 488, chicken anti mouse Alexa Fluor 546 or chicken anti rabbit Alexa Fluor 546 from Invitrogen) in the same buffer for 20 minutes. DNA was stained with 4,6- diamidino-2-phenylindole (DAPI, 0.01 mg/ml). Cells were

visualized in non-confocal Nikon and confocal Leica SP8 or LSM780 – NLO (Zeiss) microscopy. The confocal acquisitions were performed in LNBio or National Institute of Science and Technology on Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC). The images treatments were performed on Fiji software [73].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

FLB and JK conceived and designed the study and drafted the manuscript. FLB performed all experiments. GVM and DLM participated in data analysis. JK coordinated the study. All authors read, corrected and approved the manuscript

Acknowledgements

We acknowledge the Mass Spectrometry Facility at Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil for their support on mass spectrometry analysis.

We thank the access to equipment and assistance provided by the National Institute of Science and Technology on Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) at the State University of Campinas; INFABIC is co-funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (08/57906-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (573913/2008-0). We thank Silvio Roberto Consonni for his support on confocal microscopy data acquisition.

References

1. O'Connell MJ, Krien MJ, Hunter T: **Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control.** *Trends Cell Biol* 2003, **13**:221-228.
2. Fry AM, O'Regan L, Sabir SR, Bayliss R: **Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases.** *J Cell Sci* 2012, **125**:4423-4433.
3. Meirelles GV, Perez AM, Souza EE, Basei FL, Papa PF, Hanchuk TDM, Cardoso VB, Kobarg J (2014) **“Stop Ne(c)king around”: How systems biology can help to characterize the functions of Nek family kinases from cell cycle regulation to DNA damage response.** *World J Biol Chem* In Press.
4. 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, **17**:470-481.
5. Bertran MT, Sdelci S, Regue L, Avruch J, Caelles C, Roig J: **Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5.** *EMBO J* 2011, **30**:2634-2647.
6. Sdelci S, Bertran MT, Roig J: **Nek9, Nek6, Nek7 and the separation of centrosomes.** *Cell Cycle* 2011, **10**:3816-3817.
7. 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 U S A* 2000, **97**:217-221.
8. Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J: **Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase**

NEK1. *Biochemistry* 2003, **42**:15369-15376.

9. Pelegri AL, Moura DJ, Brenner BL, Ledur PF, Maques GP, Henriques JA, Saffi J, Lenz G: **Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest.** *Mutagenesis* 2010, **25**:447-454.

10. Chen Y, Chen CF, Riley DJ, Chen PL: **Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR.** *Cell Cycle* 2011, **10**:655-663.

11. Liu S, Ho CK, Ouyang J, Zou L: **Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:2175-2180.

12. Chen Y, Craigen WJ, Riley DJ: **Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1.** *Cell Cycle* 2009, **8**:257-267.

13. Chen Y, Gaczynska M, Osmulski P, Polci R, Riley DJ: **Phosphorylation by Nek1 regulates opening and closing of voltage dependent anion channel 1.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **394**:798-803.

14. Cance WG, Craven RJ, Weiner TM, Liu ET: **Novel protein kinases expressed in human breast cancer.** *Int J Cancer* 1993, **54**:571-577.

15. Levedakou EN, He M, Baptist EW, Craven RJ, Cance WG, Welcsh PL, Simmons A, Naylor SL, Leach RJ, Lewis TB, et al.: **Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating Xenopus MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern.** *Oncogene* 1994, **9**:1977-1988.

16. Doles J, Hemann MT: **Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons.** *Cancer Res* 2010, **70**:1033-1041.
17. Coene KL, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, Roosing S, Letteboer SJ, Peters TA, Cremers FP, Ueffing M, Roepman R: **The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**:3592-3605.
18. Nguyen CL, Possemato R, Bauerlein EL, Xie A, Scully R, Hahn WC: **Nek4 regulates entry into replicative senescence and the response to DNA damage in human fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 2012, **32**:3963-3977.
19. White MC, Quarmby LM: **The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis.** *BMC Cell Biol* 2008, **9**:29.
20. Mahjoub MR, Trapp ML, Quarmby LM: **NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**:3485-3489.
21. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y: **Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses.** *J Biol Chem* 2002, **277**:39655-39665.
22. Melixetian M, Klein DK, Sorensen CS, Helin K: **NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:1247-1253.
23. Chen A, Yanai A, Arama E, Kilfin G, Motro B: **NIMA-related kinases: isolation and characterization of murine nek3 and nek4 cDNAs, and**

chromosomal localization of nek1, nek2 and nek3. *Gene* 1999, **234**:127-137.

24. Hayashi K, Igarashi H, Ogawa M, Sakaguchi N: **Activity and substrate specificity of the murine STK2 Serine/Threonine kinase that is structurally related to the mitotic regulator protein NIMA of *Aspergillus nidulans*.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264**:449-456.

25. Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A: **Evolutionary analyses of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:847-849

26. Nekrutenko A, Li WH: **Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes.** *Trends Genet* 2001, **17**:619-621.

27. Pastor T, Talotti G, Lewandowska MA, Pagani F: **An Alu-derived intronic splicing enhancer facilitates intronic processing and modulates aberrant splicing in ATM.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:7258-7267.

28. Hoenicka J, Arrasate M, de Yébenes JG, Avila J: **A two-hybrid screening of human Tau protein: interactions with Alu-derived domain.** *Neuroreport* 2002, **13**:343-349.

29. Brameier M, Krings A, MacCallum RM: **NucPred--predicting nuclear localization of proteins.** *Bioinformatics* 2007, **23**:1159-1160.

30. Dellaire G, Ching RW, Dehghani H, Ren Y, Bazett-Jones DP: **The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism.** *J Cell Sci* 2006, **119**:1026-1033.

31. Kepkay R, Attwood KM, Ziv Y, Shiloh Y, Dellaire G: **KAP1 depletion**

increases PML nuclear body number in concert with ultrastructural changes in chromatin. *Cell Cycle* 2011, **10**:308-322.

32. Lallemand-Breitenbach V, de The H: **PML nuclear bodies.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**:a000661.

33. Lamond AI, Sleeman JE: **Nuclear substructure and dynamics.** *Curr Biol* 2003, **13**:R825-828.

34. Hassa PO, Hottiger MO: **The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases.** *Front Biosci* 2008, **13**:3046-3082.

35. Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V: **Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1.** *Biochemistry* 2000, **39**:7559-7569.

36. Karmakar P, Balajee AS, Natarajan AT: **Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines.** *Mutagenesis* 2001, **16**:225-232.

37. Mocquet V, Laine JP, Riedl T, Yajin Z, Lee MY, Egly JM: **Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step.** *EMBO J* 2008, **27**:155-167.

38. Lee YY, Yu YB, Gunawardena HP, Xie L, Chen X: **BCLAF1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in gammaH2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair.** *Cell Death Dis* 2012, **3**:e359.

39. Fliegauf M, Benzing T, Omran H: **When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:880-893.
40. Tian G, Zhou Y, Hajkova D, Miyagi M, Dinculescu A, Hauswirth WW, Palczewski K, Geng R, Alagramam KN, Isosomppi J, Sankila EM, Flannery JG, Imanishi Y: **Clarin-1, encoded by the Usher Syndrome III causative gene, forms a membranous microdomain: possible role of clarin-1 in organizing the actin cytoskeleton.** *J Biol Chem* 2009, **284**:18980-18993.
41. Wang L, Zou J, Shen Z, Song E, Yang J: **Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II.** *Hum Mol Genet* 2012, **21**:692-710.
42. Bonnet C, El-Amraoui A: **Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches.** *Curr Opin Neurol* 2012, **25**:42-49.
43. Wright RN, Hong DH, Perkins B: **RpgrORF15 connects to the usher protein network through direct interactions with multiple whirlin isoforms.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012, **53**:1519-1529.
44. Delprat B, Michel V, Goodyear R, Yamasaki Y, Michalski N, El-Amraoui A, Perfettini I, Legrain P, Richardson G, Hardelin JP, Petit C: **Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**:401-410.
45. Liu Q, Zhang Q, Pierce EA: **Photoreceptor sensory cilia and inherited retinal degeneration.** *Adv Exp Med Biol* 2010, **664**:223-232.

46. Halbritter J, Bizet AA, Schmidts M, Porath JD, Braun DA, Gee HY, McInerney-Leo AM, Krug P, Filhol E, Davis EE, Airik R, Czarnecki PG, Lehman AM, Trnka P, Nitschke P, Bole-Feysot C, Schueler M, Knebelmann B, Burtey S, Szabo AJ, Tory K, Leo PJ, Gardiner B, McKenzie FA, Zankl A, Brown MA, Hartley JL, Maher ER, Li C, Leroux MR, *et al.*: **Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans.** *Am J Hum Genet* 2013, **93**:915-925.
47. Kumarswamy R, Chandna S: **Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?** *Mitochondrion* 2009, **9**:1-8.
48. Brenner C, Grimm S: **The permeability transition pore complex in cancer cell death.** *Oncogene* 2006, **25**:4744-4756.
49. Yang Z, Cheng W, Hong L, Chen W, Wang Y, Lin S, Han J, Zhou H, Gu J: **Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor induced apoptosis of MCF-7 cells.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:4681-4689.
50. Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft DO: **The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties.** *J Biol Chem* 2000, **275**:3305-3312.
51. Kang BH: **TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors.** *BMB Rep* 2012, **45**:1-6.
52. Montesano Gesualdi N, Chirico G, Pirozzi G, Costantino E, Landriscina

M, Esposito F: **Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis.** *Stress* 2007, **10**:342-350.

53. Landriscina M, Amoroso MR, Piscazzi A, Esposito F: **Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy.** *Gynecol Oncol* 2010, **117**:177-182.

54. Costantino E, Maddalena F, Calise S, Piscazzi A, Tirino V, Fersini A, Ambrosi A, Neri V, Esposito F, Landriscina M: **TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptotic in human colorectal carcinoma cells.** *Cancer Lett* 2009, **279**:39-46.

55. Liu D, Hu J, Agorreta J, Cesario A, Zhang Y, Harris AL, Gatter K, Pezzella F: **Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates genes involved in cell cycle and metastases.** *Cancer Lett* 2010, **296**:194-205.

56. Amoroso MR, Matassa DS, Laudiero G, Egorova AV, Polishchuk RS, Maddalena F, Piscazzi A, Paladino S, Sarnataro D, Garbi C, Landriscina M, Esposito F: **TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins.** *Cell Death Differ* 2012, **19**:592-604.

57. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM:

Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001, **410**:549-554.

58. Lipton SA, Bossy-Wetzel E: **Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity.** *Cell* 2002, **111**:147-150.

59. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS: **Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death.** *J Cell Biol* 2002, **158**:507-517.

60. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL: **Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling.** *Trends Pharmacol Sci* 2004, **25**:259-264.

61. Delavallee L, Cabon L, Galan-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA: **AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics.** *IUBMB Life* 2011, **63**:221-232.

62. Won J, Kim DY, La M, Kim D, Meadows GG, Joe CO: **Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis.** *J Biol Chem* 2003, **278**:19347-19351.

63. Chan PM, Ng YW, Manser E: **A robust protocol to map binding sites of the 14-3-3 interactome: Cdc25C requires phosphorylation of both S216 and S263 to bind 14-3-3.** *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**:M110 005157.

64. Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB: **A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein**

complex. *Cell* 2000, **103**:29-40.

65. Kim TD, Kim JS, Kim JH, Myung J, Chae HD, Woo KC, Jang SK, Koh DS, Kim KT: **Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:3232-3246.

66. Quaresma AJ, Bressan GC, Gava LM, Lanza DC, Ramos CH, Kobarg J: **Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments.** *Exp Cell Res* 2009, **315**:968-980.

67. Lemos TA, Kobarg J: **CGI-55 interacts with nuclear proteins and co-localizes to p80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus.** *Cell Biochem Biophys* 2006, **44**:463-474.

68. Bressan GC, Quaresma AJ, Moraes EC, Manfiolli AO, Passos DO, Gomes MD, Kobarg J: **Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events.** *FEBS J* 2009, **276**:3770-3783.

69. Lee YJ, Wei HM, Chen LY, Li C: **Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli.** *FEBS J* 2014, **281**:352-364.

70. Lenzken SC, Loffreda A, Barabino SM: **RNA Splicing: A New Player in the DNA Damage Response.** *Int J Cell Biol* 2013, **2013**:153634.

71. Edmond V, Moysan E, Khochbin S, Matthias P, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B: **Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin.** *EMBO J* 2011, **30**:510-523.

72. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 2003, **13**:2498-2504.
73. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**:676-682.
74. Yang J, Liu X, Zhao Y, Adamian M, Pawlyk B, Sun X, McMillan DR, Liberman MC, Li T: **Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1000955.
75. Liu X, Vansant G, Udovichenko IP, Wolfrum U, Williams DS: **Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1997, **37**:240-252.

Figure Legends:

Figure 1: Identification and characterization of two Nek4 isoforms. (A)

cDNAs to Nek4 isoform 1 (Nek4.1) and Nek4 isoform 2 (Nek4.2) were amplified from HEK293 T cells extracts. (B) cDNA to Nek4.2 codify a protein of 781 residues which is very similar to Nek4.1 except for the regulatory domain where Nek4.1 shows a 46 amino acid residues long insertion, which is codified by an Alu DNA sequence. (C) HEK293 Flp-In T-REx stable cell lines expressing cDNA

for both isoforms of Nek4 fused to Flag tag were lysed and an immunoprecipitation for Flag tag was performed. The eluate was used for mass spectrometry and western blotting analyses. C: Silver staining to Nek4 isoforms and immunoprecipitated proteins (below). Western blotting to identify Nek4 isoforms (upper panel). (D) Venn diagram showing unique or common interactors to both isoforms of Nek4. Bp: DNA ladder. MW: Protein ladder. KD: kinase domain (red) ALU: translated region from retrotransposon Alu Flag ϕ empty vector – negative control.

Figure 2: Endogenous Nek4 localizes to nuclear speckles and mitochondria. Indirect immunofluorescence of HEK293T (A, B and D) and HeLa cells (C) shows nuclear and cytoplasmic localization of endogenous Nek4. Confocal microscopy shows the pointed staining of Nek4 in the nucleus, which is related to nuclear speckles (complete colocalization with SC-35) depicted in B and C. Nek4 localization in PML bodies (partial colocalization, arrows) is depicted in A. Nek4 also shows mitochondrial staining indicated by non-confocal microscopy and VDAC mitochondrial marker. DNA was stained with DAPI.

Figure 3. Interaction networks of the retrieved Nek4.1 and Nek4.2 interactors from IP-MS. The selected most relevant enriched GO biological processes are depicted in (A) Nek4.1 and (B) Nek4.2 networks by clustering the proteins involved in each of the biological processes with a circle layout. Clusters were assigned only to enriched biological processes containing at least

two proteins (biological processes of specific cell types were not considered); proteins belonging to more than one biological process were assigned to clusters with the best enrichment p-values. More specific biological processes are shown only for proteins with more specific annotation in GO database. The red nodes correspond to both Nek4 isoforms, the cyan nodes correspond to proteins identified in more than 2 IP-MS biological replicates (from 2 to 4 experiments) and yellow nodes correspond to proteins identified in only one biological replicate. In (A) Nek4.1 network, TRAP1 was assigned to “Apoptotic process” according to Gesualdi and co-workers [52]; and 5 proteins involved in different cilium functions [74,46,75,17,45] are depicted inside a blue circle: DFNB31, IFT172, MYO7A, RPGRIP1L and TTC21B. The protein-protein interaction networks were built using the IIS platform and visualized using the Cytoscape software.

Figure 4: Nek4 endogenous colocalization with different interaction partners identified by IP-MS. Endogenous Nek4 colocalizes with endogenous (A) TRAP1 (cytoplasm), (B) DFNB31 or whirlin (cytoplasm), (C) PCNA (nucleus) and (D) SLC25A6 (cytoplasm) in HEK293T cells, and with (E) YWHAE or 14-3-3 ϵ (cytoplasm) in HeLa cells, as visualized by indirect immunofluorescence microscopy. All cells were fixed with methanol and DNA was stained by DAPI.

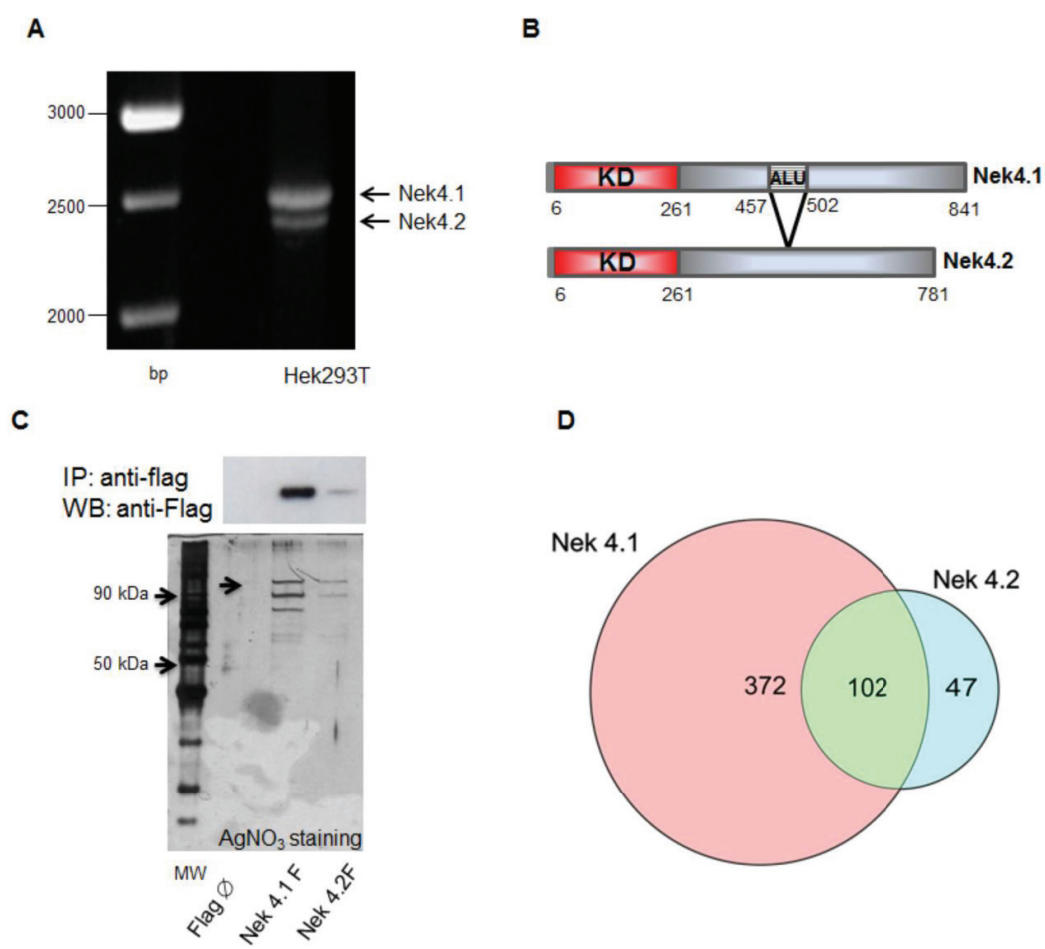


Figure 1

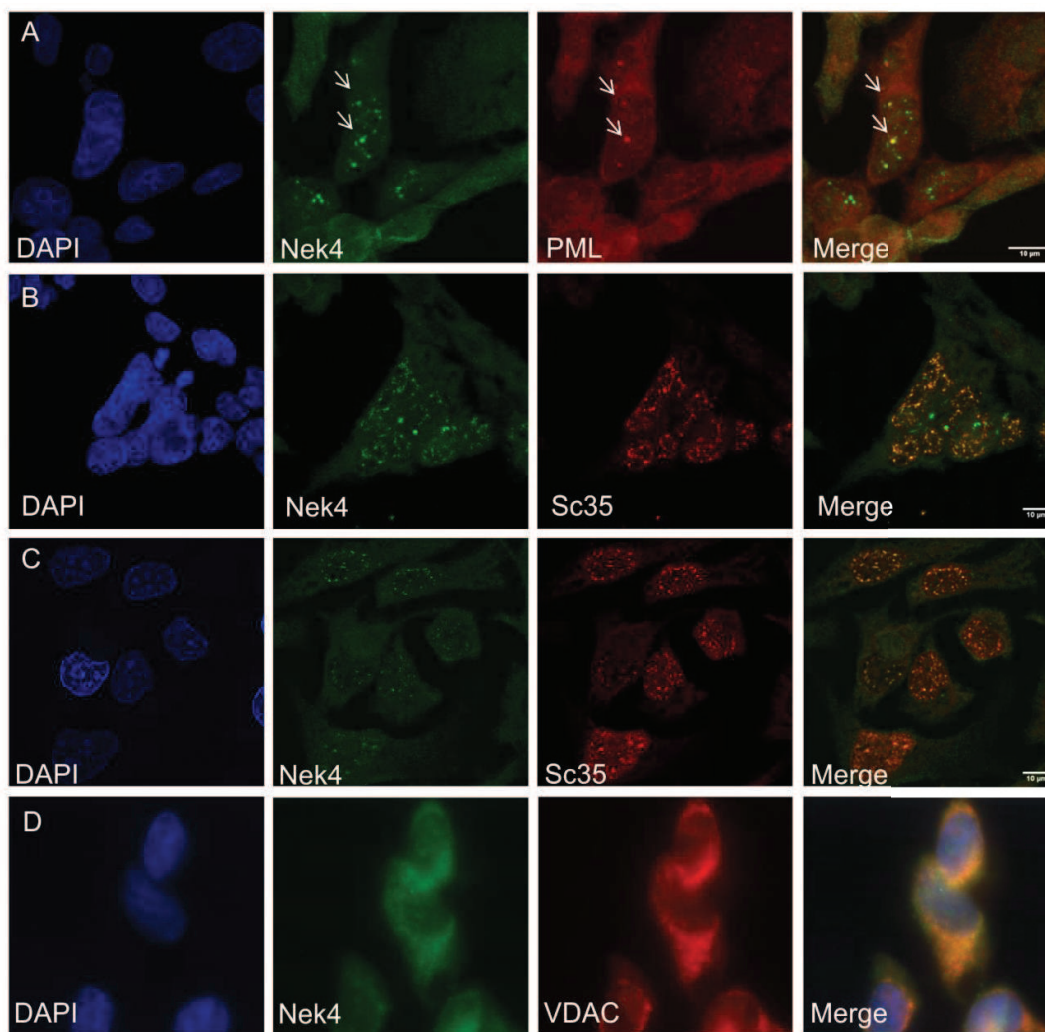


Figure 2

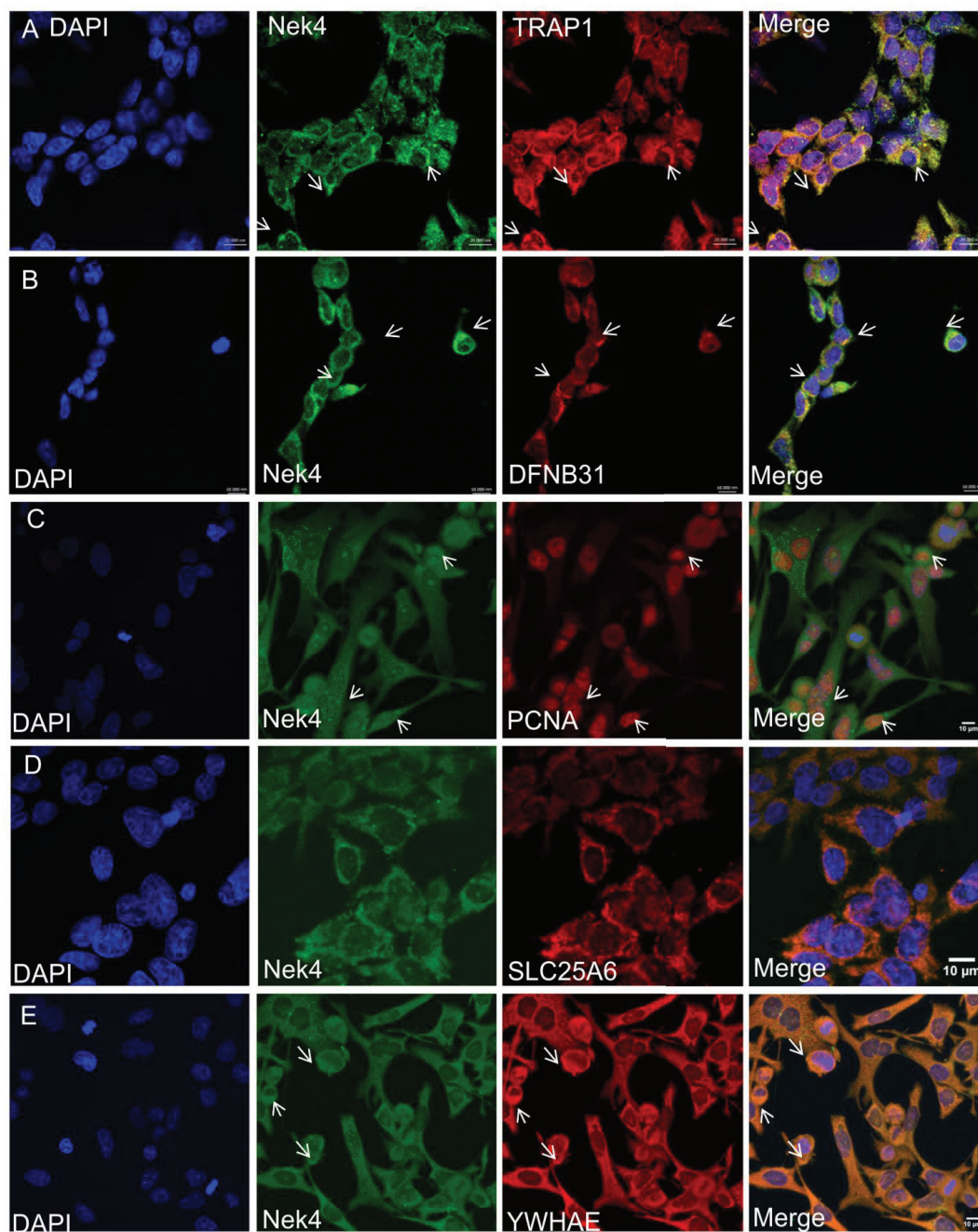


Figure 4

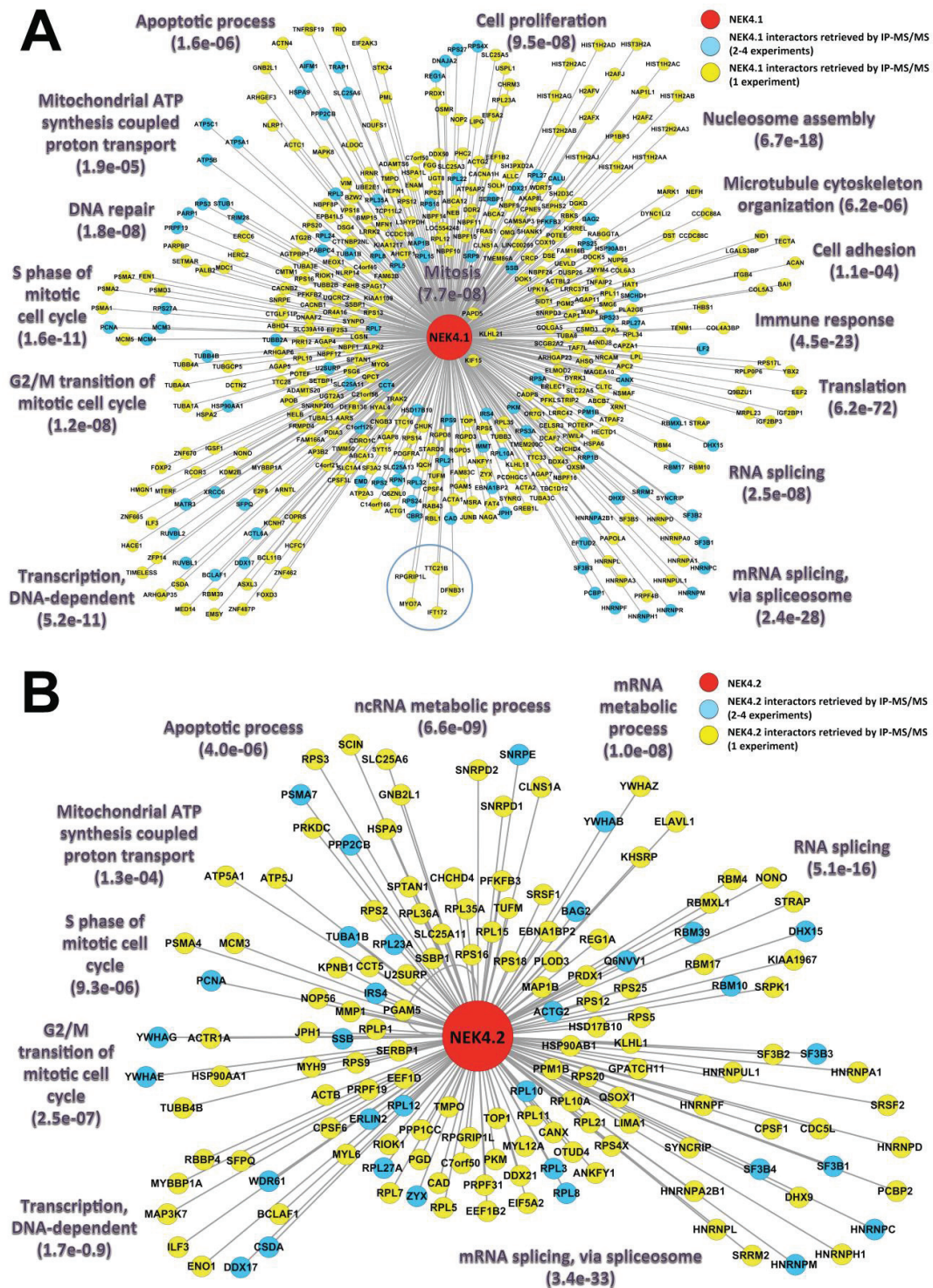


Figure 3

"Stop Ne(c)king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases

Gabriela Vaz Meirelles, Arina Marina Perez, Edmárcia Elisa de Souza, Fernanda Luisa Basei, Priscila Ferreira Papa, Talita Diniz Melo Hanchuk, Vanessa Bomfim Cardoso, Jörg Kobarg

Gabriela Vaz Meirelles, Arina Marina Perez, Edmárcia Elisa de Souza, Fernanda Luisa Basei, Priscila Ferreira Papa, Talita Diniz Melo Hanchuk, Vanessa Bomfim Cardoso, Jörg Kobarg, Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP 13084-971, Brazil

Edmárcia Elisa de Souza, Fernanda Luisa Basei, Talita Diniz Melo Hanchuk, Vanessa Bomfim Cardoso, Jörg Kobarg, Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13084-971, Brasil

Priscila Ferreira Papa, Jörg Kobarg, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes-Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13084-971, Brasil

Author contributions: Meirelles GV, Perez AM, de Souza EE, Basei FL, Papa PF, Melo Hanchuk TD, Cardoso VB, Kobarg J performed the literature search, analysis and interpretation of the data, and contributed specific parts of the manuscript; Meirelles GV and Kobarg J elaborated the figures; Kobarg J, Meirelles GV and Perez AM conceived the overall idea of the review, elaborated the final version of the text together, and supervised the project; all the authors read, revised and approved the final version.

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP, Grant No.2010/51730-0), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), and Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Correspondence to: Jörg Kobarg, PhD, Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P. 6192, Campinas, SP 13084-971, Brasil. jorg.kobarg@lnbio.cnpem.br

Telephone: +55-19-35121125 Fax: +55-19-35121006
Received: November 23, 2013 Revised: January 7, 2014

Accepted: February 16, 2014

Published online: May 26, 2014

in mitosis-gene A (NIMA)-related kinases (Neks). The founding member of this family is the sole member NIMA of *Aspergillus nidulans*, which is crucial for the initiation of mitosis in that organism. All 11 human Neks have been functionally assigned to one of the three core functions established for this family in mammals: (1) centrioles/mitosis; (2) primary ciliary function/ciliopathies; and (3) DNA damage response (DDR). Recent findings, especially on Nek 1 and 8, showed however, that several Neks participate in parallel in at least two of these contexts: primary ciliary function and DDR. In the core section of this in-depth review, we report the current detailed functional knowledge on each of the 11 Neks. In the discussion, we return to the cross-connections among Neks and point out how our and other groups' functional and interactomics studies revealed that most Neks interact with protein partners associated with two if not all three of the functional contexts. We then raise the hypothesis that Neks may be the connecting regulatory elements that allow the cell to fine tune and synchronize the cellular events associated with these three core functions. The new and exciting findings on the Nek family open new perspectives and should allow the Neks to finally claim the attention they deserve in the field of kinases and cell cycle biology.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key words: Cell cycle; Mitosis; DNA damage response; Protein interactions; Kinases

Core tip: Never in mitosis-gene A (NIMA)-related kinases (Neks) are a family of 11 human kinases involved in cell cycle regulation. This article represents an in-depth review of the current knowledge on the function of each of the 11 human Nek kinases. Furthermore, we present arguments in the discussion of how systems biology, especially interactomics, helped to uncover that the majority of Neks are involved in more than one of

Abstract

Aside from Polo and Aurora, a third but less studied kinase family involved in mitosis regulation is the never

the three Neks core functions: (1) centrioles/mitosis; (2) primary ciliary function/ciliopathies; and (3) the DNA damage response. Possibly, the Neks act on a higher regulatory level which may control the core functions.

Meirelles GV, Perez AM, de Souza EE, Basei FL, Papa PF, Melo Hanchuk TD, Cardoso VB, Kobarg J. "Stop Ne(c)king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World J Biol Chem* 2014; 5(2): 141-160 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v5/i2/141.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v5.i2.141>

INTRODUCTION

The never in mitosis-gene A (NIMA)-related kinases (Neks) represent, aside from the Polo and Aurora kinase families, a third family of mitotic kinases, but remain the least studied to date and hence least understood family of kinases involved in the regulation of the cell cycle. The founding member of this family of kinases is the *Aspergillus nidulans* NIMA, which exists as a single member in this fungus, is functionally involved in the initiation of mitosis and promotes the chromosome condensation by phosphorylation of histone H3^[1]. Humans have 11 members of the Nek family which show highly conserved kinase domains but differ significantly in the composition and length of their N- and especially C-terminal regulatory and docking domains (Figure 1).

Although some protein interaction partners have been described for the majority of the human Neks (Figure 2), the domain of interaction at the side of Neks has been mapped only for a smaller subset of interacting proteins (Figure 1). As we can see, most interactors are assigned to specific regions in the regulatory domains, which represent in most cases classical protein-protein interaction modules, such as coiled coil regions. Identification of interaction with the kinases domains have been scarce due to the transient and weak nature of these interactions and therefore the discovery and characterization of true *bona fide in vivo* substrates of Nek kinases remain one of the main challenges in the field. Among the interacting proteins identified by our^[2,3] and other groups, through both yeast two-hybrid screens and mass spectrometry analyses, there were hopefully not only those that regulate the Neks but maybe also candidate substrate proteins. The binding of these substrate proteins possibly contributes to "opening up" the Neks or to the activation of these kinases and then, as a consequence, these proteins may be phosphorylated by the Neks.

There has been a series of very good and concise reviews on NIMA and Neks in the past years^[4-8]. However, due to scarce or absent knowledge on several family members, including Nek5, 10 and 11 for instance, most reviews opted to focus on a subset of Neks or grouped them according to phylogenetic or functional relatedness. Here, we try to discuss all 11 human Neks in some depth

and to include all recent novelty on the least studied Neks as well as our own group's published and unpublished findings, with a special emphasis on the characterization of the functional context based on the identification of interacting proteins (interactomics). A point we would like to stress here is that most Neks interact with proteins of several of the classical functional contexts reported initially for a subset of specific Neks. In other words, we may characterize the following three areas as the main functional contexts of Neks: (1) centriolar function and mitosis regulation (Nek2, 6, 7 and 9); (2) primary ciliary function, ciliopathies and microtubule dynamics in general (Nek1, 4 and 8); and more recently (3) DDR and G₂/M checkpoint (Nek1, 4, 6, 8, 10 and 11)^[8,9].

However, published interactome data (Figure 2), as well as our group's efforts to identify new interacting proteins for all Neks, showed some surprising cross-connections and novelties, which we would like to point out here. Most of the above mentioned Neks seem to interact with proteins that are functionally linked to two or even all three of the above mentioned areas, thereby raising the possibility that these are somehow connected on a higher regulatory level and that the Neks may be key elements to understand how the regulation of these functional contexts is performed. A typical recently published example is the role of Nek8 in both primary ciliary function and DNA repair mechanisms^[10]. Our own studies revealed that Nek6, a kinase primarily associated with mitotic regulatory events^[11,12], also interacts with proteins involved in the DNA damage response, such as putative DNA repair and recombination protein RAD26-like (RAD26L) and PHD finger protein 1 (PHF1) (Figure 2)^[3]. In fact, for the majority of Neks we found interacting partners of the DDR or effector proteins of different DNA repair pathways, which clearly suggests a larger than initially imagined involvement of Neks in these biological processes. Other insights came from the identification of interacting proteins from the apoptosis regulatory pathways with several Neks (*e.g.*, Nek 1^[13] and 5). This suggests that, aside the well established mitotic context, we must be open minded about additional new roles for Neks (Table 1). Before we go into details of new cross-connections and suggested additional functional contexts in the final discussion, we will present each of the 11 human Neks in detail in the following section of this review.

NEK1

Although Nek1 is only the third most studied Nek family member after Nek2 and aside from Nek6, it is in many ways a representative member of this family of protein kinases. Along this line, Nek1 started to draw the attention of the kinase and signaling research communities, not only to itself but to the Nek family after the publication of the seminal article of Upadhyaya *et al* in 2000^[14]. It reported that deletion mutations in the Nek1 gene in mice caused polycystic kidney disease (PKD) among other pleiotropic effects, ranging from facial dysmorphism,

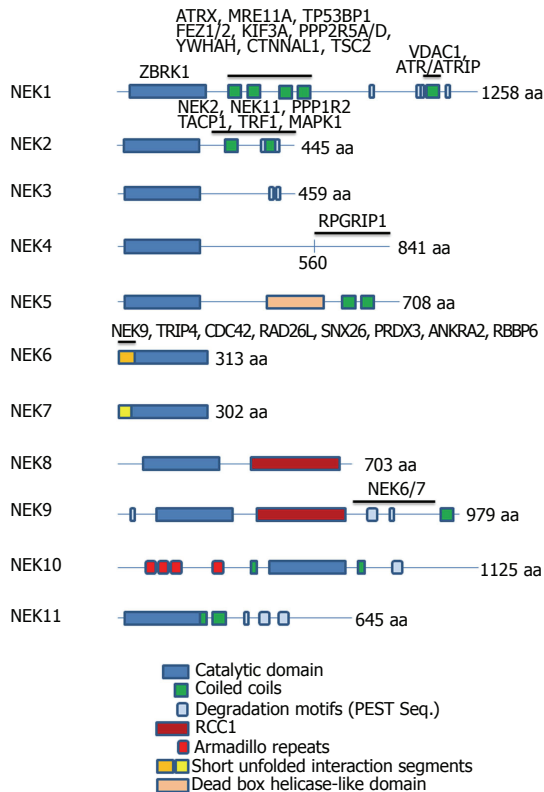


Figure 1 Representation of the domain organization of the eleven human Neks depicting the domain regions for selected protein interactions. The gene symbols corresponding to interacting proteins are shown above the Neks primary structure regions with which they have been found to interact. The list of interactors is not intended to be complete but is necessarily shorter than the list of all proteins known in the literature to interact with Neks (e.g., see Figure 2), since, for the majority of interactors, the location of interaction in the Neks has not been reported. Different repeated domains have been indicated by the color code at the bottom of the figure. The lengths of the full proteins are indicated by number of amino acids (aa) at the C-terminal of the proteins. At least two isoforms of Nek1, 2, 3 and three of Nek4 and 11, all generated by alternative splicing, have been reported and known functional distinctions have been briefly discussed in the text, where feasible. References for the proteins and their mapped interactors: Nek1^[2,13,25]; Nek2^[116,121-124]; Nek4^[53]; Nek6^[5]; Nek9^[66]. Nek: Never in mitosis-gene A-related kinases.

dwarfing, male sterility, anemia and cystic choroid plexus. The pleiotropic nature of these phenotypes suggested a role of Nek1 early on in basic cellular functions, possibly involved in signaling pathways associated with polycystin-1 and 2, whose mutations also cause PKD and signaling initiates at the renal epithelial cell's primary cilia^[13].

Recently, another set of insertion, non-sense and splice site mutations in the Nek1 gene were reported in Majewski type short-rib polydactyl syndrome (SRPS), an autosomal-recessive familial ciliopathy^[16,17]. Ciliopathies have been associated with a series of defects of proteins involved in intra-flagellar transport (IFT), as well as cilia, basal body and centrosome maintenance, and in the case of Nek1, SRPS also presents a broad phenotypic spectrum, including reduced cilia number and cell cycle associated cilia morphogenesis. This results ultimately in severe or lethal embryonic malformations and especially osteochondrodysplasia, shortened ribs and tibias, poly-

syndactyly, fused kidneys, heart defects and mouth clefts, among others^[17].

In terms of molecular functions, a first breakthrough came from a protein interactome study that shed light on the involvement of Nek1 in several pathways related to the above diseases, but also opened new avenues in the context of cell cycle regulation and DNA damage responses^[2]. These findings were later not only confirmed by functional studies but also extended to other Nek family members, including Nek4, 6, 10 and 11^[3,8,9,18]. The interactome study was a yeast two-hybrid assay using Nek1 as bait and a human fetal brain cDNA library as prey. Nek1 is a rather large, 1258 amino acids containing protein and interacts with these proteins mainly through the two N-terminals of its four coiled coil regions, which are located at the C-terminal of its kinase domain (Figure 1). Among the Nek1 interacting proteins were the kinesin-like protein KIF3A, tuberin and alpha-catulin, mutation in all three of these genes also have been reported to cause PKD. This suggests the existence of a multicomponent signaling or regulatory pathway, which regulates the kidney cell's proliferation and when affected by mutations may lead to PKD^[19-21]. Evidence in support for a major role of Nek1 in primary ciliary function also came from other model organisms, including *Chlamydomonas*^[22].

Surprising at that time was the discovery of interactions with several cell cycle regulatory proteins, 14-3-3 protein η (*eta*, YWHAH), tumor suppressor p53-binding protein 1 (TP53BP1), serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha/delta isoform (PPP2R5A/D) and especially with proteins involved in the DNA damage response, such as the double-strand break repair protein MRE11A (MRE11A) and the transcriptional regulator ATRX (ATRX)^[2]. Soon, additional experiments with the irradiation of wild-type and Nek1-/- cells revealed that Nek1 is over-expressed and activated in response to ionizing radiation (IR) and co-localizes to γ -H2AX positive DNA repair foci in the nucleus^[23]. Cells without Nek1 died in response to sub-lethal doses of IR and knockdown of Nek1 also diminished their capacity to clear DNA damage caused by chemical genotoxic agents, such as cisplatin and methyl-methanesulfonate (MMS)^[24]. This line of experiments culminated recently in a paper where the authors showed that Nek1 kinase is not only physically associated with ATR-ATRIP, but also required for ATR priming to allow an efficient DNA damage signaling^[25]. Furthermore, Nek1 has been indicated to act in apoptosis signaling, especially by phosphorylation of key mitochondrial proteins such as the voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1)^[13]. This is a pore complex that functions both as a voltage dependent anion channel and permeability pore that regulates cytochrome c leakage to the cytoplasm, which upon exit initiates apoptotic events^[13]. Nek1's activity to maintain cells in homeostasis is mediated through phosphorylation of a specific external VDAC1 Ser residue. Upon apoptotic stimuli, Nek1 is degraded and the lack of

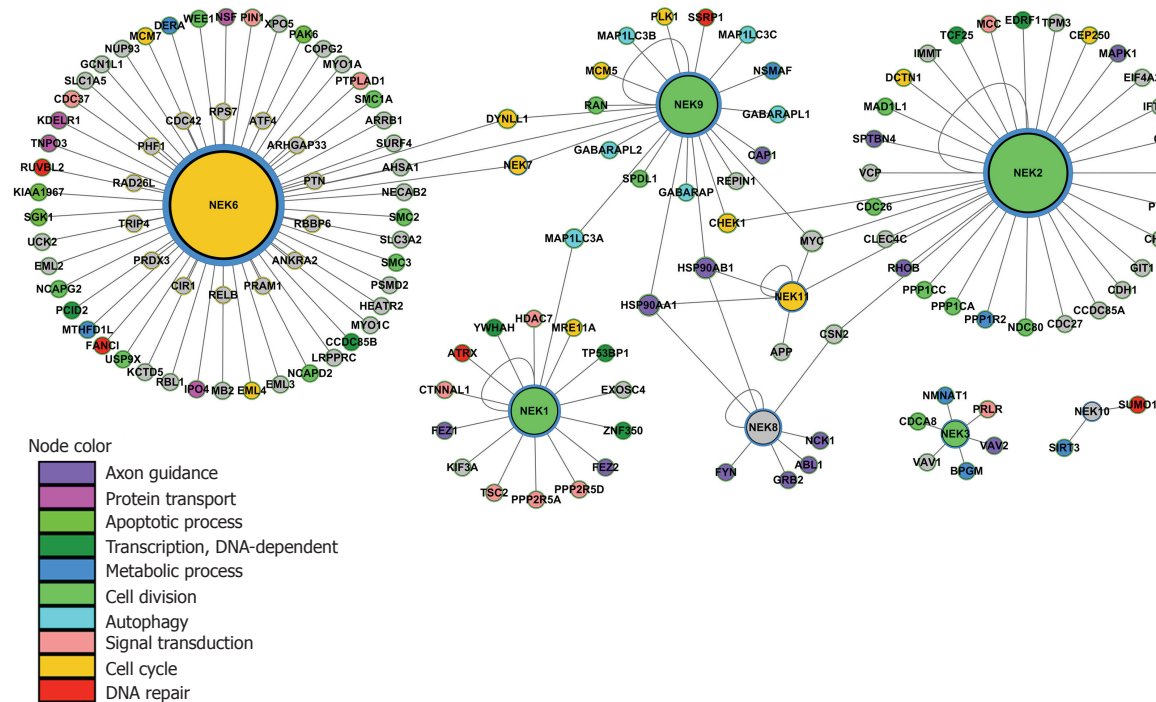


Figure 2 Global interactome of Nek1-11, involving their published interactors. The proteins color code refers to their main biological function given by the top enriched Gene Ontology^[126] biological processes ($P \leq 0.05$). Common interactors establish crosslinks between Neks, thereby emphasizing their common functional contexts. The protein sizes are depicted proportional to their connectivity degree. The protein-protein interaction network was built for the first neighbors of Neks using the Integrated Interactome System (IIS) platform, developed at National Laboratory of Biosciences, Brazil (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/lnbio/IIS/>) and visualized using the Cytoscape software^[126]. Nek: Never in mitosis-gene A-related kinases.

VDAC1 phosphorylation causes opening of the channel, loss of the membrane potential and leakage of cytochrome c to the cytoplasm.

Finally, Nek1 has been implicated in gametogenesis due to its high expression levels in meiotic tissues^[26]. In another interactome study, this time using a testicular tissue cDNA library, the protein Nurit was found to be an interactor of Nek1^[27]. Nurit is expressed in the late phase of spermatogenesis, has structural resemblance with leucine zippers and contains additional super helix domains, possibly involved in its homo-multimerization. Furthermore, the structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC3) was found to interact with Nek1, further implying important functions in meiotic events such as spindle assembly checkpoints^[28].

In summary, Nek1 has been functionally implied in three major functional contexts and their sub-functions: cilogenesis (PKD, SRPS), DNA damage response in a wider sense, also including cell cycle checkpoints and centrosome functions and, finally, gametogenesis. Unpublished recent mass spectrometry studies of the Nek1 interactome after challenging cells with genotoxic drugs identified a number of nuclear proteins, the majority of which were associated with DNA repair, replication and transcription regulation. This, together with a very recent article which reports on Nek1 interaction with NHEJ (Non homologous end joining) repair protein Ku80, clearly establishes Nek1 as a key player in DDR signaling^[29].

NEK2

Nek2 is the most studied and most well understood of the human Neks. In fact, it will be difficult to cover all of its aspects in the context of this review. Therefore, we focused on the most important features of Nek2 and would like to apologize to the many researchers whose work could not be covered here due to space restrictions.

Nek2 shares the highest sequence similarity with NIMA in its kinase domain and many biochemical, structural and functional features. This has led many researchers to believe that it may be the prototype NIMA among all vertebrate Neks and that Nek2 may maintain the primordial functions of NIMA in mitosis progression. For this reason, Nek2 became the most studied Nek family member in mammals^[6]. However, care must be taken with such an interpretation since Nek2 cannot rescue NIMA defective mutants and Nek1 also shares many NIMA characteristics^[30].

Nek2 expression varies during the cell cycle, being maximal between the S and G₂ phase, during which it localizes predominantly to the centrosome^[31,32]. Nek2 is a component of the MTOC (microtubule organization center) at mitosis entry and a core component of the centrosome, where it phosphorylates the centrosomal key components C-Nap1 and rootletin, which form the intercentriolar linker that holds the pair of centrioles physically together. This event in turn promotes centro-

Table 1 Subcellular localization, established and possible additional functions of human and mammalian Neks

Nek	Gene/ protein synonyms	Subcellular localization	Established function	Possible additional functions (under investigation)
1	NY-REN-55 SRPS2, SRPS2A, KIAA1901	Cytoplasm, cilia, centrosome, γ H2X positive DNA damage sites in nucleus	Stability and function of the primary cilium/polycystic kidney disease ^[14] , DNA damage response to IR and chemical mutagens ^[2,23-25]	Meiosis ^[26-28] , apoptosis mediated by mitochondria ^[13]
2	NEK2A, NLK1, RP67, HsPK21, SRPS2A	Centrosome	Regulation and promotion of centrosome segregation ^[33-35]	DNA damage response ^[127]
3	HSPK36, RP11-248G5.5	Cytoplasm	Regulation of prolactin response ^[41] , microtubule deacetylation in neurons ^[47]	?
4	STK2, NRK2, pp12301	Cilia/basal bodies	Microtubule stability (silencing alters sensitivity to vincristine/taxol) ^[54]	DNA damage response ^[9] , replicative senescence ^[9] , primary cilia function ^[53]
5	-	?	Skeletal muscle differentiation ^[60] , caspase-3 substrate/ apoptosis ^[60]	?
6	SID6-1512, RP11-101K10.6	Citotic spindle, centrosome	Mitotic spindle formation ^[11-12] , centrosome separation ^[69-70]	DNA damage response ^[18] , NF-kappa B signaling ^[3,71]
7	-	Spindle poles	Mitotic spindle formation ^[12,88] , centrosome separation ^[69-70]	DNA damage response? ¹
8	JCK, NEK12A, NPHP9, RHPD2	Centrosome, cilia, γ H2X positive DNA damage sites in nucleus	Stability and function of the primary cilium/polycystic kidney disease ^[95] , DNA damage response ^[10]	Integration of primary cilia function and DNA damage response ^[10]
9	NERCC, NERCC1, KIAA1995, (NEK8)	Spindle poles, centrosome, cytoplasm	Mitotic spindle formation ^[106] , centrosome separation ^[100]	?
10	-	Possible centrosome/pericentriolar localization (?)	DNA damage response after UV induced damage ^[74]	Centrosome function?
11	-	Nucleus, nucleoli	DNA damage response induced by IR ^[73]	?

¹Souza *et al.*, unpublished observation.

some separation itself^[33,34]. During the interphase, Nek2 is maintained in an inactive state by association with the protein kinase MST-2 and the phosphatase PP1, which keeps Nek2 dephosphorylated. After mitosis onset, polo-like kinase 1 (PLK1) phosphorylates MST-2, disrupting the trimeric complex and resulting in Nek2's activation through auto-phosphorylation. In addition, the centrosomal proteins Nlp (ninein-like protein) and centrobins contain coiled coils and are dislocated from the centrosomes in Nek2 overexpression conditions. In contrast, the Nek2 knockdown or inhibition of its catalytic activity results in the inhibition of the centrosome separation^[35].

A second important functional context for Nek2 is at the spindle assembly checkpoint, where through its interaction with the major kinetochore proteins Mad1/2 and the phosphorylation of the kinetochore core protein Hec1, Nek2 may be involved in the identification of unaligned sister chromatids^[36]. Failure at this checkpoint may lead to aneuploidy and other chromosomal abnormalities and knockdown or knockout of other Neks, including Nek7, has been reported to cause aneuploidy, pointing to a potential major involvement of the Nek family in the spindle assembly checkpoint^[37].

Another functional context for Nek2 is in the gametogenesis, where Nek2 acts in chromatin condensation reminiscent of the role of NIMA in *Aspergillus nidulans*. In spermatocytes, the architectural chromatin protein Hmg2 is under control through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase (MAPK) and possibly

also by Nek2^[38].

Finally, in *Drosophila*, Nek2 was detected at the mid-body in the late mitosis and overexpression of Nek2 led to actin and actin-binding protein dislocation and cytokinesis failure, among other phenotypic effects^[39].

NEK3

Nek3 is a 506 amino acid serine/threonine kinase^[40] and localizes both to the nucleus and cytoplasm^[41,42]. It is highly expressed in testis, prostate, ovary and brain, and shows moderate to low expression in lung and liver^[40]. Its gene localizes to chromosome 13q14.2 and its mRNA is expressed in tumor, normal prostate and blood control cell lines. Insertion/deletion polymorphisms were described, in which a stretch of adenines at the end of exon 9 leads to the introduction of a premature stop codon, resulting in a truncated protein that encodes only 298 or 299 of the protein amino acids. Interestingly, this polymorphism around 13q14 is a mutational hotspot for several cancer types^[43-45]. Moreover, human Nek3 has an N-terminal catalytic domain and a C-terminal regulatory domain and shares high amino acid sequence identities with mouse Nek3 (56%), but not with other NIMA-related kinases due to the absence of coiled coil regions (Figure 1)^[46]. This suggests that Nek3 and its orthologs constitute a separated sub-family of the Neks^[40].

Nek3 is involved in the invasion and motility of T47D cells (a human ductal breast epithelial tumor cell

line) through interaction with the guanine nucleotide exchange factor VAV2, which promotes both p21-Rac1 and transforming protein RhoA activation. These interactions are mediated by prolactin-induced association of Nek3 with the human prolactin receptor (PRLR). The signaling pathway resulting from prolactin's binding to its receptor promotes phosphorylation of paxillin, a cell adhesion mediator, and is dependent on Nek3's association with VAV2^[41,42].

In its C-terminal domain, Nek3 contains a PEST motif which contains Thr475, a residue that is phosphorylated upon activation. The Thr475 and the PEST domains are phylogenetically conserved, suggesting that they are important for Nek's regulation. Expression of mutants without the Thr475 or the PEST domain cause changes in cellular morphology and polarity of both epithelial and neuronal cells. Thus, Nek3 may also be crucial to the regulation of neuronal microtubules and in disorders which involve axonal degeneration, possibly through modification of its acetylation status^[47].

Another functional involvement of Nek3 with cytoskeleton components is mediated through its interaction with the EH domain-containing protein 2 (EHD2). EHD2 interacts with plasma membrane phospholipids, associates with VAV1, and forms the complex VAV1-NEK3-EHD2, which modulates p21-Rac1 activity, causing actin reorganization close to the plasma membrane at the initial stages of endocytosis^[48]. In summary, Nek3 plays a role in cytoskeleton organization and dynamics through actin re-organization and may be involved in the regulation of neuronal development, endocytosis, cell motility and invasiveness of breast cancer tumor cells.

NEK4

Nek4 was initially described as serine/threonine-protein kinase 2 (STK2) by Cance *et al.*^[49]. In a study of a kinase specific cDNA library in human breast cancer tumors or cell lines, they identified STK2 that showed homology to *Aspergillus nidulans* NIMA and expression levels that varied widely in human breast tumors. Later, Levedakou *et al.*^[50] showed that STK2 is highly expressed in the heart and that its mRNA level does not vary along the cell cycle. After studies characterizing the murine STK2 the nomenclature changed to Nek4^[51,52].

The human Nek4 gene is located on chromosome 3p21.1 and is transcribed into about 4kb mRNA, which encodes an 841 amino acid residue protein^[50]. It is constituted by a N-terminal kinase domain and a C-terminal regulatory domain (Figure 1). Hayashi *et al.*(1999)^[51] described a short and a long isoform for murine Nek4. The long mNek4 isoform differs from hNek4 due to the absence of a small fragment in the regulatory domain that corresponds to an *Alu* sequence^[51,52]. To date, three isoforms have been described for human Nek4. The longest canonical sequence (isoform 1: UniProt-Accession P51957-1, NCBI RefSeq NM_003157) was identified by the Cance and Levedakou groups^[49,50] and used to compare it to mNek4. The isoform 2 (UniProt

database (UniProt Accession P51957-2, KJ592714), is identical to mNek4 and lacks the *Alu* sequence. The isoform 3 (UniProtAccession P51957-3 and NCBI RefSeq NM_001193533) is the shortest one, with a smaller alternative N-terminal region.

Hayashi *et al.*^[51], (1999) showed that two isoforms of mNek4 are expressed in most tissues, except in the liver and heart where only a short isoform is expressed^[50]. Recently, hNek4 expression was also observed in ciliated tissues, such as the retina, kidney tubules, brain (specifically the ventricles), heart and testis^[53]. Expression in testis suggests a role in meiosis, as has been already reported for mNek4^[52]. Furthermore, these new functional studies demonstrated that hNek4 depletion does not alter the cell cycle^[53,54]. Therefore, as shown for other Nek family members, roles other than the regulation of the cell cycle can be attributed to Nek4, including microtubule stabilization, primary cilium assembly and, more recently, replicative senescence entry and DNA damage response^[9,53,54].

Interestingly, Nek4 activity is evidenced mainly in the presence of chemotherapeutic agents. For example, in lymphoma cells, a simple Nek4 knockdown is not enough to change cell cycle or microtubule dynamics, but Nek4 knockdown triggers taxol resistance and promotes sensitivity to vincristine in these cells^[54]. These results indicate that Nek4 has an effect on microtubule stability in the presence of these drugs and suggests that this particularity could be explored in therapies, depending on the patient's specific levels of Nek4 protein in the tumor cells.

Besides the direct role in microtubule polymerization, Nek4 is also important for primary cilium stabilization, as was already described for Nek1 and Nek8^[14,55,56]. Nek4 interacts with RPGR-interacting protein 1 (RPGRIP1) and RPGRIP1-like protein (RPGRIP1L)^[53], both associated with ciliopathies. Both the eye-restricted disease "Leber Congenital Amaurosis" and the "Joubert and Meckel syndrome", which affects multiple organs, are at the severe end of the ciliopathy spectrum. After Nek4 knockdown, the number of ciliated cells decreases, but this effect is apparently not related to RPGRIP1 and RPGRIP1L phosphorylation status. This suggests that Nek4 may act as a scaffold for other cilia signaling proteins^[53] and, together with Nek1 and Nek8, may be important to other ciliopathies such as PKD^[14,55,56].

More recently, the role of Nek4 was also connected to the DDR because Nek4 depleted cells were found to be resistant to DNA damaging agents, such as etoposide or bleomycin, and to γ -irradiation. Besides, Nek4 interacted with DNA-PKcs, Ku70 and Ku80, proteins that have important roles in the NHEJ (non-homologous end joining) repair pathway. Nek4 depleted cells also show a decrease of histone γ -H2AX activation, probably as a result of an impairment of the DNA-PKcs recruitment^[9].

NEK5

Among all members of the Nek family, Nek5 is the kinase with the least amount of information. Although identified in different organisms such as *Homo sapiens*,

Mus musculus, *Arabidopsis thaliana*, among others, there is little information about its function and localization. In humans, Nek5 is a protein of 708 amino acids, whose kinase domain is located at its N-terminus^[4,8]. According to Moniz *et al.*^[7], Nek5 is the only member of the Nek family that has a dead box domain (Figure 1). This domain is involved in cellular processes such as pre-mRNA processing, rearrangement of ribonucleoprotein (RNP) complexes and gene expression^[57]. In *Arabidopsis thaliana*, during epidermal cell expansion, Nek5 interacts with Nek4 and 6 and these interactions are important to regulate microtubule organization, probably through the phosphorylation of beta-tubulins^[58]. Therefore, Nek5 may be associated with the already established cascade consisting of Nek9, 6 and 7 (see details below). However, care must be taken because the evolutionary gap between mammals and flower-plants is too large to deduce direct conclusions and the functional information on Neks in plants is even scarcer than in mammals^[59]. In human cells, Nek5 is able to interact with caspase-3 and this interaction is important for skeletal muscle differentiation^[60]. Caspase-3 is a protease involved in mechanisms such as apoptosis and cell differentiation. It was proposed by Larsen *et al.*^[61] that caspase-3 activates caspase-activated DNase to promote and regulate DNA strand breaks introduced into promoter regions of genes encoding effector proteins such as p21 and that this process may represent a more general mechanism of genome alterations that occur during cell differentiation. Since Nek5 interacts with caspase-3 during cell differentiation, other members of this kinase family may also be involved in differentiation associated molecular events and this possibility should be explored in future experiments.

NEK6

Unlike the other Neks, Nek6 and Nek7 are the smallest and structurally the simplest Neks, consisting only of the catalytic domain with a relatively short N-terminal extension^[6]. Although they share significant similarity with each other, being about 86% identical within their catalytic domains, their N-terminal extensions are not conserved and it has been suggested that they may play a role in the differential regulation of these kinases^[3,62]. SAXS experiments, together with SEC-MALS and comparative molecular modeling performed by our group revealed that hNek6 is a monomeric kinase, slightly elongated, with a flexible and disordered N-terminal domain^[63].

Nek6 was initially identified in a classic biochemical screen for kinases capable of phosphorylating the hydrophobic regulatory site of the p70 ribosomal S6 kinase (S6K). Nek6 phosphorylated the Thr412 residue of S6K and other sites, *in vitro* and *in vivo*, suggesting it to be a possible regulator of this kinase^[64]. Subsequently, Nek6 was described as not seeming to be responsible for the physiological phosphorylation of S6K, SGK or PKB since it was characterized as having a high preference for a Leu three residues N-terminal to the phosphorylation

site of the substrate^[65], and more recent evidence supports a NIMA-like mitotic role for Nek6.

Both Nek6 and Nek7 co-purify with Nek9 as a result of specific interactions and strong binding to a region located between the RCC1 domain and coiled coil motif of Nek9^[66] (Figure 1). The endogenous Nek6 is activated during mitosis, concomitant with an increase in its level of expression, but this requires phosphorylation at the Ser206 residue, which is mediated through Nek9. Nek7 too is phosphorylated by Nek9 at Ser195 and both phosphorylation sites are found in the activation loops of these kinases^[67]. This information led to the construction of a model in which Nek6, 7 and 9 act as partners of the same signaling cascade^[67], with Nek6/7 being substrates of Nek9. However, Nek9 remains inactive during the interphase but is activated during mitosis, phosphorylating and activating Nek6/7, which, in turn, coordinates the organization and maintenance of the mitotic spindle^[66].

Overexpression of a catalytically inactive mutant of Nek6 generates cells displaying high mitotic index, defects in mitotic spindle, nuclear abnormalities and apoptosis^[11]. These phenotypes are also observed from the depletion of Nek6/7 in HeLa cells using siRNA, which causes retention of cells in metaphase, with a normal chromatin condensation and alignment, but an inability to complete the segregation of chromosomes. The activity of Nek6 and also 7, therefore, seems necessary for the progression of anaphase, where the cells are either retained at the spindle assembly checkpoint (SAC), or undergo apoptosis or complete mitosis, but with an elevated risk of acquiring chromosomal abnormalities during the process^[11,12]. Moreover, treatment of these depleted cells with an Aurora B inhibitor to bypass the SAC led to a reduction in the frequency of metaphase arrest, concomitant with an increase in the frequency of cells blocked in cytokinesis. Cells expressing the hypoactive mutants, even in the absence of the SAC inhibitor, also accumulated in cytokinesis. Therefore, Nek6 and Nek7 seem to have independent, non-redundant roles in mitotic spindle formation and cytokinesis: one at metaphase that requires a certain level of kinase activity and one in late mitosis that requires a higher level of activity^[12].

Intriguingly, using phospho specific antibodies that detect activated Nek6, Rapley *et al.*^[68] showed that Nek6 activity increased 2 h after release from a nocodazole arrest, when cells would be progressing through cytokinesis. In this same study, the kinesin-related motor protein Eg5, required for spindle bipolarity, has also been described as a substrate of Nek6. It phosphorylates Eg5 kinase *in vitro* at several residues, including Ser1033, which is also phosphorylated *in vivo* during mitosis at the spindle poles^[68]. A signaling cascade seems to occur where Nek2 first phosphorylates proteins at the intercentrosomal linker in G2 phase, resulting in their dissociation, followed by activation of Nek9 by the cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and the polo-like kinase 1 (PLK1) in early mitosis and subsequent activation of Nek6 and Nek7. These

kinases, in turn, phosphorylate Eg5 (previously phosphorylated by CDK1), promoting the separation of the centrosomes by the motor activity of Eg5 accumulated in the centrosomes^[69,70].

Apart from roles in mitosis, human Nek6 was recently reported by our group to have a broad set of protein partners involved in diverse biological processes^[3]. The hNek6 interactome showed that it is a high confidence hub kinase possibly involved in several known and novel cellular pathways, through interactions with and phosphorylation of diverse proteins. Figure 3 depicts some of the main cellular pathways identified for hNek6 based on the interacting proteins retrieved by our screenings. The novel putative pathways shown are the non-canonical Wnt signaling, Notch signaling and the actin cytoskeleton regulation, whereas the other pathways were already suggested by other studies: the nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling^[71] and the DNA damage response^[18]. In regard to the DNA damage response category identified in our work, many studies show its importance among the tasks triggered by Neks^[2, 8-10, 18, 23-25, 72-74].

On the other hand, Nek6 phosphorylates the transcription factor Oct-1 (POU2F1), a potent regulator of metabolism and tumorigenicity, at S335 in the DNA binding domain during mitosis, causing Oct-1 to dissociate from the chromatin and concentrate in the centrosomes, spindle poles, kinetochores and midbody^[75]. Furthermore, Nek6 phosphorylates histones H1 and H3 *in vitro*, possibly contributing to mitotic chromatin condensation^[76]. Nek6 finally also binds the BTB/POZ domain-containing protein KCTD5, which appears to have a role in cytokinesis^[77] and apoptosis^[78].

As the other human Neks, hNek6 was recently found to be linked to carcinogenesis. It shows an increased expression and activity in gastric cancer according to the progression of the disease^[79] and up-regulation of Nek6 mRNA correlates with the Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 up-regulation in 70% of hepatic cell carcinomas^[80]. The overexpression of a catalytically inactive Nek6 promotes cell cycle arrest in human breast cancer in metaphase and leads to apoptosis^[11], while its knockdown induces senescence and also apoptosis^[81]. In a large-scale screening of serine/threonine kinases on different types of human tumors, Nek6 was shown to be up-regulated in non-Hodgkin's lymphoma, breast, colorectal and lung tumors^[82]. Moreover, NEK6 gene, besides AURKA, has its expression increased in esophagitis and esophageal adenocarcinoma, representing a promising candidate marker of these diseases^[83]. Recently, it was demonstrated that transcript, protein and kinase activity levels of Nek6 were highly elevated in malignant tumors and human cancer cell lines compared with normal tissue and fibroblast cells, indicating an important role for Nek6 in tumorigenesis^[84]. Its phosphorylation at Thr210 and Ser206 is critical for the phosphorylation of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) at Ser727^[85]. Furthermore, its overexpression suppresses

p53-induced senescence in cancer cells: it inhibits the cell cycle arrest at both G₁ and G₂/M transition, the reduction in the Cdc2 and cyclin B levels and the increase in ROS levels induced by p53^[86]. Its overexpression also makes cancer cells resistant to premature senescence induced by the anti-cancer drugs camptothecin and doxorubicin^[87]. The inhibition of the Nek6 function sensitizes human tumor cells to premature senescence after anti-cancer drug treatment or serum depletion^[81], suggesting Nek6 to be a potential therapeutic target for various types of human cancers.

NEK7

Human Nek7 was originally described as a possible regulator of the p70 ribosomal S6 kinase^[64] and of important events in the mitotic progression^[12, 6, 67, 88] (see above for Nek6). These findings have led to studies on the regulatory effects of hNek7 in key functions of the cell cycle and in cancer. The siRNA-mediated down-regulation of hNek7 and expression of kinase inactive mutants reduced centrosomal γ -tubulin levels in interphase cells and caused prometaphase arrest with defects in mitotic spindles^[6, 88]. Nek7 overexpression in culture cells, on the other hand, resulted in multinucleated cells and a higher proportion of apoptotic cells^[89]. In the same line, the Nek7 depletion also decreased microtubule stability, while its ectopic overexpression rescued this phenotype^[90]. Furthermore, hNek7 deficient mice die early in development and, on a cellular level, lack of Nek7 led to decreased chromosome numbers, increased centrosome numbers, binucleation, micronuclei formation, cytokinesis failure, growth retardation or cell death^[37]. The PCM (centrosomal pericentriolar material) proteins do not accumulate at the centrosome in Nek7-depleted cells in the G₁/S and G₂/M transitions^[91], indicating that Nek7 is required for centriole duplication, centrosome maturation and mitotic spindle formation^[88].

The direct interaction of Nek7 with the non-catalytic domain of Nek9 allosterically activates Nek7 by interruption of its autoinhibitory conformation^[92]. Consistent with these findings, recent studies demonstrated that PLK1 and CDK1 control the centrosome separation through phosphorylation and activation of Nek9 during mitosis. This leads to the Nek6/7-dependent phosphorylation of kinesin Eg5, a key event for centrosome separation and mitosis^[69]. Thus, as in the case of Nek6, it is not surprising that cancer cells express elevated levels of Nek7, suggesting a role in tumor progression. Higher expression levels of Nek7 were found in larynx, breast, colorectal^[82] and gall bladder cancers^[93]. Taken together, these findings suggest Nek7 as a potentially important regulator of the cell cycle and reveal it as an essential component for growth and survival of mammalian cells. Furthermore, the linkage with a failure in centrosome biogenesis, chromosomal stability and ploidy, as well as the observed disturbance of microtubule dynamics connects Nek7 to hallmark features of oncogenesis.

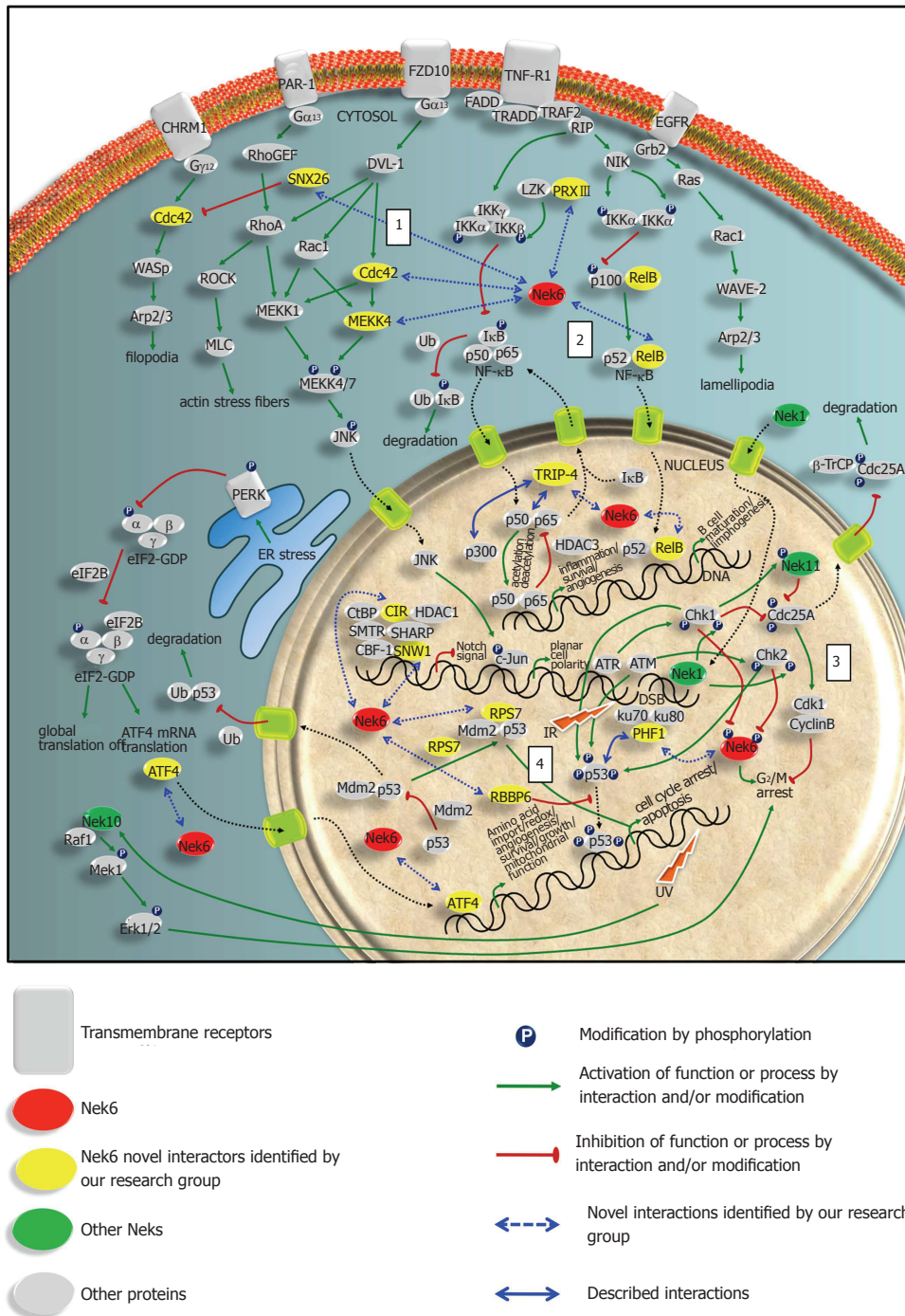


Figure 3 Nek6 interactome and the cellular functional contexts based on its interacting proteins. The four major pathways discussed in the text are: (1) actin cytoskeleton organization; (2) nuclear factor- κ B signaling; (3) DNA damage response; (4) p53 signaling (according to Meirelles *et al.*). See detailed legend for symbols at the bottom of the figure. IR: Ionizing radiation.

NEK8

Nek8 was first described as the mutated gene in murine autosomal recessive juvenile cystic kidney (*jk*) mice^[55]. As observed for Nek1, these mutational changes found in Nek8 C-terminal domain can cause genetic kidney diseases, including polycystic kidney disease (PKD)^[55].

PKD is one of the most frequent genetic kidney diseases and has a highly variable pathology, involving aberrant cell proliferation in the kidney and pleiotropic effects in multiple other organ systems, including the liver and the pancreas. Evidence that renal cyst formation is caused by defects in ciliogenesis or ciliary function is substantial^[56]. In mouse cells, Nek8 localizes to the proximal region of

the primary cilium and is not observed in dividing cells^[56]. In humans, Nek8 is overexpressed in primary breast tumors^[94] and localizes to centrosomes and the proximal region of cilia in dividing and ciliated cells, respectively. The localization of Nek8 to centrosomes and cilia is dependent on both the kinase activity and the C-terminal non-catalytic domain homologous to RCC 1 (regulator of chromosome condensation). It is capable of auto-phosphorylation in the non-catalytic C-terminal region to regulate its localization or activation. Its activity is not cell cycle regulated but, in the same way as observed for Nek3, activity levels are higher in G₀-arrested cells. The kinase domain alone, although catalytically active, does not localize correctly, while a fragment containing only the RCC1 domain shows correct localization and can also be phosphorylated by Nek8^[95].

Nek8 carries the causal mutations of two of the eight established mouse models of polycystic kidneys (*jk*). In these models, an abnormal interaction between Nek8 and the polycystin complex may give rise to PKD by disturbing microtubule dynamics, the mitotic spindle checkpoint and the cytoskeleton. Nek8 mutations cause overexpression of galectin-1, sorcin and vimentin and accumulation of the MUP (major urinary protein) in renal cysts of *jk* mice^[96].

The role of the RCC1 domain in Nek8 is yet unknown. However, a single G448V substitution is responsible for the *jk* phenotype^[55]. Overexpression of mutant forms of Nek8 (including G448V) in tissue culture cells leads to the formation of enlarged multinucleated cells and reduced numbers of actin stress fibers, although tubule cells in *jk* mice are not multinucleated, suggesting that the cellular role of Nek8 may be related to the regulation of the cytoskeleton^[55].

Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that Nek8 interacts with polycystin-2 (PKD2), a mechanosensing receptor protein, involved in the regulation of the cilium length. However, the *jk* mutation of Nek8 did not apparently affect this interaction directly. These data suggest that Nek8 interferes with the polycystic signal transduction pathways and/or the control of the targeting process of these ciliary proteins. Dysfunction of Nek8 may lead to cystogenesis by altering the structure and function of cilia in cells located at the distal nephron^[97].

Recent results suggest that Nek8 has a function in the maintenance of genomic stability^[10]. Loss of Nek8 leads to spontaneous DNA damage and a defect in the response of cells to replication stress. Furthermore, Nek8 interacts physically and functionally with components of the ATR-mediated DDR. The disease-related *jk* mutant of Nek8 fails to both interact with the ATR pathway proteins and to rescue the genome maintenance defects associated with Nek8 knockdown. Thus, Nek8 is a critical component of the DDR that links replication stress with primary ciliary functions and the related cystic kidney disorders^[10].

NEK9

Nek9, also called Nercc1, is one of the largest Neks with 979 amino acids, with an extensive C-terminal regulatory domain, which contains seven RanGEF homology repeats, an RCC1 domain, a segment rich in Ser/Thr/Pro residues and, like in Nek2, a coiled coil dimerization motif (Figure 1)^[66,98].

Nek9 was first described as Nek8 and isolated with a catalytic activity against beta-casein in rabbit lung extracts treated with IL-1, revealing the co-chromatography of a second protein homologous to the *Drosophila* bicaudal D protein, Bcd2, which is *in vitro* phosphorylated by Nek9 and resembles a cytoskeleton structure^[99]. Moreover, Nek9 immunoprecipitation of *Xenopus laevis* egg extracts showed γ -tubulin and other members of the γ -tubulin ring complex (γ -TuRC), which are essential for the microtubule nucleating activity of the centrosome^[98]. Centrosomal γ -tubulin recruitment depends on the adaptor protein NEDD1 and is controlled by PLK1. In a recent study by Sdelci *et al.*^[100], it was reported that PLK1 activates Nek9, which phosphorylates the Ser377 in NEDD1, promoting its recruitment together with γ -tubulin to the centrosomes of dividing cells (independently of Nek6/7). Furthermore, the microinjection of anti-Nek9 in human cells during prophase, after the chromosomes condensation, interferes in the organization of the spindles and the proper segregation of chromosomes, resulting in cell cycle arrest in prometaphase or aneuploidy^[66].

Nek9 expression remains constant in different cell cycle phases (G₁/S, G₂, M, G₁); however, as observed for NIMA, there is a specific increase in its catalytic activity during mitosis, which was found to be triggered by *in vitro* and *in vivo* phosphorylation events^[66]. The recombinant wild-type Nek9 shows reduced activity when extracted from exponentially growing cells, but its pre-incubation with ATP and Mg²⁺ induces its autophosphorylation at its activation loop Thr210 residue and its activation, whereas mutants lacking the coiled coil dimerization motif show significantly reduced activity^[66,98]. Interestingly, the deletion of the RCC1 region leads to a catalytic hyperactivity, indicating that this region may be required for Nek9 autoinhibition^[66]. Moreover, Nek9 binds to dynein light chain 1, cytoplasmic (DYNLL1), a highly conserved protein originally described as a component of the dynein complex, *via* its C-terminal (K/R) XTQT motif adjacent to Nek9 C-terminal coiled coil motif, resulting in Nek9 oligomerization, an increase in its autoactivation rate and a reduction in its binding to Nek6^[101].

It is possible that Nek9 activation in mitosis involves a very small percentage (< 5%) of the total expressed protein, and in contrast with the vast majority of inactive protein, the active Nek9 (Thr210P) is first evident during prophase, concentrated at the centrosome, where it can be phosphorylated by CDK1/cyclin-B^[102], until metaphase is reached. During the transition to anaphase, the immunoreactivity of Nek9 (Thr210P) decreases at the centrosomes and becomes detectable at the chromo-

somes, which is evident until telophase. Before disappearing, the active Nek9 is detected at the midbody as two points flanking the cleavage furrow during cytokinesis^[98].

Due to its possible roles in the mitotic spindle organization and chromosome segregation through its activation during mitosis and interaction with Nek6/7, it is possible that most of the phenotypes observed with the microinjection of anti-Nek9 antibodies in human cells are caused by interference with Nek6/7 function^[66]. Taken together, the data suggest that Nek9 is a positive upstream regulator of Nek6/7.

Among other kinases, Nek9 was recently identified by quantitative chemical proteomics as a possible marker for the diagnosis and therapy of head and neck tumors^[103]. Moreover, Nek9 shows, along with other kinases implicated in cancer, its activity inhibited by the drug quercetin^[104]. Its expression is increased in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib^[105], indicating that its up-regulation could be involved in chemotherapy resistance mechanisms. Depletion of Nek9 in glioblastoma (U1242) and renal carcinoma (Caki2) cells results in failures in cytokinesis and cell death in Caki2 cells, after overriding mitosis, and incorrect alignment of chromosomes and micronuclei formation. Therefore, it is suggested that inhibition of Nek9 is a potential anti-cancer therapeutic strategy by induction of mitotic catastrophe *via* reduced dynamics of the spindle, cytokinesis and mitotic checkpoint control^[106].

NEK10

One of the most intriguing but less studied members of the Nek family is Nek10 since it has its catalytic domain flanked by two regulatory domains (Figure 1). Each of these two regulatory domains has their own peculiarities. As NIMA and Neks 1, 2, 5, 9 and 11, Nek10 also has coiled coil regions closely located to the kinase domains^[8]. Furthermore, four repetitions of an armadillo repeat motif in its N-terminal regulatory domain may serve as an important region for protein-protein interactions, as has been reported for other proteins^[107]. In the case of its C-terminus, a PEST region may be important to the proteolytic regulation of the protein's abundance. There are some contradictions and a debate about Nek10's full length since several different cDNAs have been deposited that differ in the C-terminal domain length.

Mutations in the Nek10 gene locus have been linked to breast cancer in different studies that were trying to find new polymorphisms in carriers of mutations in BRCA1/2 (breast cancer type 1/2 susceptibility protein)^[108-110]. Moniz *et al.*^[74] have shown an important role for Nek10, comparing normal and tumor mammary gland cell lines. They found that Nek10 affects the ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) signaling pathway, after activation with UV radiation. Nek10 has been shown to form a functional complex with RAF1 and MEK1 (dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1). In this sense, cell cycle arrest in G₂/M

was observed and Nek10 caused both MEK1 activation and the ERK1/2 phosphorylation. However, these preliminary data suggest a possible involvement of Nek10 in the DDR, as already demonstrated for Nek1, 4, 6, 8 and 11^[2,8-10,18,23-25,72-73]. Moreover, like BRCA1 and BRCA2, Nek10 may be a therapeutic target in breast cancer.

NEK11

Nek11 is one of the least studied Nek family members and has the highest sequence similarity to Nek4. Its gene is present on the same chromosome as that of Nek4 but on the long arm (3q22-1). Nek11 was first identified by Noguchi *et al.* (2002)^[111] and shows a high sequence similarity with Nek4 and 3 in its kinase domain, but is more similar to Nek2 in its regulatory region (Figure 1). Interestingly, Noguchi *et al.*^[111] have not found Nek4/11-related kinases in *C. elegans* or *D. melanogaster*, suggesting that the Nek11-containing subfamily may have only appeared through gene or genome duplication after separation of the deuterostome branch in the animal kingdom^[111].

Noguchi *et al.*^[111] (2002) described two isoforms for Nek11. The longer isoform (Nek11L) is composed of 645 residues, while the shorter one (Nek11S) contains only 470 residues. Nek11 shows a N-terminal kinase domain and a C-terminal regulatory domain with a coiled coil and three PEST sequences, suggesting a proteolytic, cell cycle specific regulation of its expression. Nek11, different from Nek1, 2 and 4, is not present in a higher quantity in the testis or ovary, but its mRNA is found in the brain's cerebellum, trachea, lung, appendix and uterus^[111]. Another important difference to Nek4 is that Nek11 shows a timely cell cycle related expression pattern, relating it closer to Nek2, with both showing an expression peak at the G₂/M transition.

The first indication that Nek11 could be important in the regulation of cell cycle checkpoints was the identification of histones H1, H2A and H3 as Nek11 phosphorylation substrates. Furthermore, in the presence of genotoxic agents, Nek11 showed both an increased expression and activity at the G₂/M transition. Although this is decreased by caffeine, suggesting that Nek11 DDR may be associated with the ATM/ATR pathways, which also showed the same inhibition by caffeine^[111].

Another common point between Nek11 and Nek2 is their localization to the nucleolus. In the study of Noguchi *et al.*^[112] (2004), it was observed that in U2OS cells Nek11L is present in the nucleolus during interphase and telophase and that it probably interacts with Nek2A in the nucleolus. Moreover, Noguchi *et al.*^[112] speculated that Nek2A could phosphorylate Nek11L C-terminal and, in this way, antagonize its auto-inhibitory function, which would cause Nek11 activation in G₁/S arrested cells^[112].

Recently, some of Noguchi's results were followed up by Melixetian *et al.*^[73]. This study points to Nek11 as an important player in cancer development. Melixetian *et al.*^[73] observed that Nek11 depleted U2OS cells lose an important G₂/M checkpoint after IR. In this way, it was

verified that after IR Chk1 phosphorylates both M-phase inducer phosphatase 1 (CDC25A) and Nek11. Nek11 in turn also phosphorylates CDC25A, leading to its proteasomal degradation and subsequent inhibition of cyclins followed by a cell cycle arrest at the G₂/M transition.

The studies involving Nek11 so far point to it as an important protein for the cell cycle regulation in the context of the DDR. However, more interactome studies are required to clarify other possible functions of Nek11 in the cell.

DISCUSSION

After knowing sufficient details on all of the eleven individual Neks, we will now return to a more general and integrative approach and try to find common functional contexts for the family as a whole in human cells. As pointed out in the introduction, Neks may be assigned to three major functional contexts: (1) centrioles and mitotic spindle functions; (2) primary ciliary function; and (3) G₂/M phase associated DDR. Although most individual Neks have been associated with one main context, recent functional data as well as the identification of interaction partners for several Neks from two or even all three contexts may suggest that Neks have a broader function, possibly on a regulatory level, that consequently affects the three main functions. A first way of looking at this is by comparing the interaction profiles and functional contexts of the published interacting partners, summarized in Figure 2, which shows the Neks global interaction profile and the possible new biological processes in which they are involved due to their interaction with multiple proteins.

Several protein interactors with violet color interact with Nek1, 2, 3, 8, 9 and 11 and can be described as associated with the “axon guidance”/transport processes. They include, for example, fasciculation and elongation protein zeta (FEZ)-1 and 2 that interact with Nek1^[2,113,114].

Several proteins associated with apoptotic processes interact with Nek6: serine/threonine-protein kinase PAK 6 (PAK6), serine/threonine-protein kinase Sgk1 (SGK1) and DBIRD complex subunit KIAA1967 (KIAA1967) (darker green color).

Nek9 interacts with several proteins from the autophagy-related protein 8 family (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, MAP1LC3A, MAP1LC3B and MAP1LC3C) (light blue).

Several proteins from DNA repair processes interact with either Nek1, 6, 9 or 10: RuvB-like 2 (RUVBL2), Fanconi anemia group I protein (FANCI), transcriptional regulator ATRX (ATRX), FACT complex subunit SSRP1 (SSRP1) and SUMO-1 (SUMO1) (red). The putative DNA repair and recombination protein RAD26-like (RAD26L), the PHD finger protein 1 (PHF1), and also the double-strand-break repair protein rad21 homolog (RAD21, not shown in Figure 2), all identified as Nek6 interactors in our yeast two-hybrid screens^[3], are also possibly involved in the DDR^[115,116].

In order to demonstrate the potential discovery of additional functional contexts through interactomics studies, we will now have a closer look at the Nek6 interactome as described by our group^[3] (Figure 3). Novel Nek6 interacting partners are indicated by yellow ellipses and suggest the following new functional contexts: (1) Nek6 is possibly involved in actin cytoskeleton organization through its interaction with cell division control protein 42 homolog (CDC42) and sorting nexin-26 (SNX26)^[3]. Since SNX26 has a negative regulatory role on CDC42 and Nek6 interacts with both of them, the final output of Nek6 must be addressed by future experiments. However, these findings are supported by the fact that for Nek3 a clear involvement in related processes has been reported (see Nek3 section above); (2) Nek6 may be involved in the activation of the NF- κ B signaling on multiple layers, since it interacts with the transcription factor RelB, Prx-III and/or TRIP-4^[3,71]. Matsuda *et al.*^[71] found Nek6 as an activating protein in a siRNA knockdown screen to identify proteins that participate in the regulation of cellular survival transcription factor NF- κ B^[71]. The regulation may occur on several levels: through direct phosphorylation, interaction or regulation of the nuclear translocation of key components of the NF- κ B complex, like RelB, or even on the transcriptional level. The latter seems likely, since Nek6 also interacts with SNW domain-containing protein 1 (SNW1) and a PHF domain containing protein (PHF1)^[3], both of which have been recently identified as key components involved in the complex, multiprotein machinery involved in the transcriptional activation of the NF- κ B gene^[117]. Again, Nek6 regulatory role here may be mediated through interaction and/or phosphorylation; (3) the IR-induced DNA damage response is mediated by Nek1, 6 and 11, leading to cell cycle arrest^[18,23,25,72,73]. The UV-induced DNA damage response is mediated by Nek10, also leading to cell cycle arrest^[74]. This may suggest that different Neks may have specialized to mediate different forms of DNA damage responses; and (4) it is known that Nek6 can counteract p53 induced senescence^[86]. As we can observe in Figure 3, this may occur indirectly through Nek6 modulation of p53 interactors 40S ribosomal protein S7 (RPS7) and/or E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6 (RBBP6). It is worth noting here that Nek4 has the opposite effect of Nek6. Nek4 seems to be required for the cell to enter in senescence^[9].

Another important point is the finding that certain functions first only described for isolated specific Neks have been later confirmed for most if not all other Neks. Nek1 was the first family member to be associated with DDR signaling events^[23]. In our yeast two-hybrid screen to identify Nek1 interacting proteins, we identified proteins involved in the repair process itself (MRE11A) and in different signaling pathways associated with it (ATRX, PPP2R5 A/D, YWHAH, TP53BP1) (Figure 4).

Nek4, 6, 8, 10 and 11 have also been reported to physically interact with key members of DDR pathways or to interfere functionally in signaling cascades in a

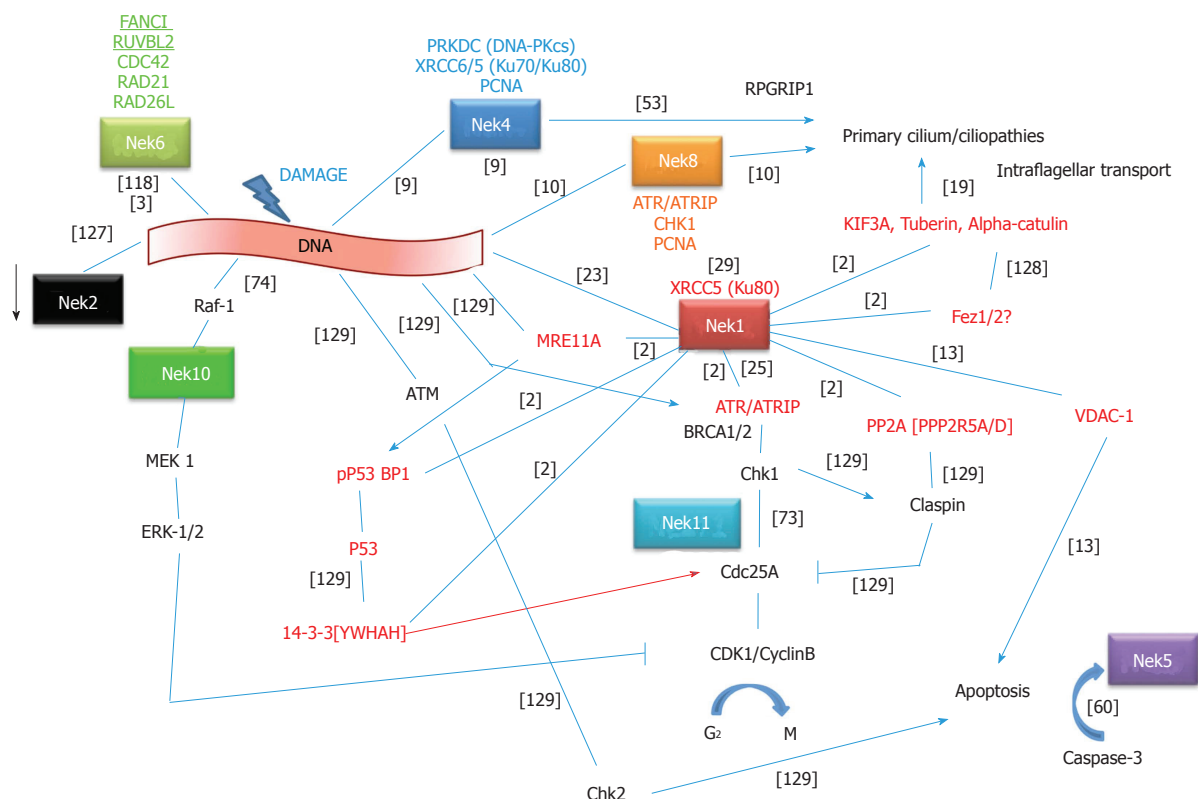


Figure 4 Nek1 interactome and crosstalk with other Neks and protein interactors in the context of the DNA damage response pathways. Interactions between proteins are depicted as simple lines, activation is depicted as an arrow and inhibition as an arrow with a line as arrowhead. A red arrow for 14-3-3 means that it causes activation by the transport of CDC25 to the nucleus. Nek1 interacted with a specific 14-3-3 isoform called YWHAH^[2] (gene symbols inside brackets correspond to the isoforms of those proteins which were described to interact with Nek1). Not necessarily the same specific 14-3-3 protein promotes the indicated functions. Rather, a family characteristic is intended to be assigned. Nek2 kinase activity is inhibited after DNA damage (arrow)^[127]. The red protein names are those that have been identified to directly interact with Nek1 as identified by the yeast two-hybrid system^[2] or other as indicated in the figure. Gene symbols above/under protein names represent other interactors of those proteins. Nek4 interactors have been identified by mass spectrometry^[9]. As can be seen, all but three Neks (Nek3, 7 and 9) seem to be directly linked to the DNA damage response. Most strikingly, we can see a direct connection for Nek8, 4 and 1 between DDR and primary cilium function and ciliopathies. New connections to apoptosis have been recently pointed out for Nek1 and 5. References for interactions are depicted in brackets: Nek6^[5,53], Nek1^[2,13,25], Nek4^[9,53], Nek8^[10], Nek11^[73], Nek10^[74], Nek2^[127], Nek5^[60], KIF3A^[19], Fez1/2^[128], various known interactions^[129].

broader context of the G₂/M transition^[8-10,18,73-74]. As described above for Nek6, the interactors RAD26L, PHF1, RAD21^[3], FANCI and RUVBL2^[118] are all associated with the DDR. Together with the relatively recent work by Lee *et al* (2008)^[18], this suggests Nek6 may also interfere in DDR. However, the stimuli that activate such possible pathways *via* Nek6 are still unknown. In further yeast two-hybrid screens and mass spectrometry interactomics studies we found other DDR members interacting with Nek3, 4, 5, 7, 8, and 10 (unpublished data). Recent publications clearly confirmed part of those findings or went beyond them by characterizing this new involvement not only functionally, but also establishing possible cross-connections between primary cilia signaling and DDR in the case of Nek8^[10]. For Nek4, an involvement in senescence signaling was established and in mass spectrometry experiments, several DDR proteins such as DNA-PKcs (PRKDC), Ku70/Ku80 (XRCC6/5) and PCNA were identified as Nek4 interacting proteins (Figure 4)^[9]. Furthermore, Nek4 has been reported to interact with RPRGRIP at the primary cilium^[53], thereby establishing an

other link between DDR and primary cilium function.

A new role for Nek5 in differentiation and apoptosis signaling has been identified and characterized through its interaction with and proteolytic processing by caspase-3^[60]. Evidently, apoptosis signaling is closely related to DDR and the G₂/M checkpoint because cells unable to repair major DNA damage must either halt in the cycle or be dispatched by apoptosis. The link between Neks, DDR and apoptosis is not new as Chen *et al*^[13] had also already reported an interaction of Nek1 with mitochondrial VDAC1. Nek1 phosphorylates VDAC1 and prevents apoptosis by avoiding VDAC1 opening and leakage of cytochrome c, which would activate apoptotic caspases. The down-regulation of Nek1 protein level or kinase activity through apoptosis signaling decreases VDAC1 phosphorylation and results in its opening and leakage of cytochrome c, thereby activating the apoptosis program.

For Nek1, the coexistence of functional roles in both DDR and ciliopathies and primary cilia function has been long established (Figure 4). Nek1 interacts with several proteins involved in the primary cilia function

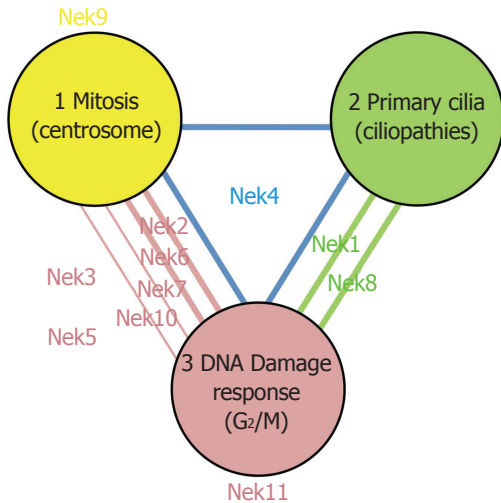


Figure 5 Functional overlap in the human Nek kinase family: seven of eleven Neks participate in two and one Nek in all three of the main core functions of the Nek family (centrosome-related mitosis, primary cilia and DNA damage response). The three corners of the triangle represent each a key concept function for the Nek family, e.g., Nek9 and 11 sole involvement in mitosis^[66,67] and DDR^[73] respectively, has been well documented. The Nek names and bold lines represent cases where accumulated experimental evidence strongly suggests a regulatory role for that Nek in that context or in both of the contexts the line connects: Nek1^[2,22,23], Nek2^[123], Nek4^[19,53] (Basei *et al* unpublished); Nek6^[3], Nek7^[67], Nek8^[8,10], Nek10^[74]. The thinner lines represent our own group's preliminary or unpublished interaction data (both from yeast two-hybrid system and immunoprecipitation coupled to mass spectrometry analysis data), suggestive of a participation of that Nek in both connected functions (Nek7: Souza *et al*, unpublished).

and especially in kidney duct mechanosensing (KIF3A, tuberin, alpha-catulin, polycystin 1/2). Mutations in the genes that encode all of these proteins like those that cause expression of truncated non-functional Nek1 itself, cause PKD^[14]. Since Nek8 is functionally and evolutionary most closely related to Nek1 among the Nek family, it came as no surprise that Nek8 mutations were also found to cause ciliopathies and cystic kidney disease. Moreover, Nek8 interacts with some key DDR proteins, including ATR, Chk1 and PCNA, just like Nek1^[10]. What is new in these milestone discoveries, however, is the possibility that somehow these two pathways are causative or coincidentally connected. Choi *et al*^[10] made the observation that mice cells with diminished Nek8 kinase activity, simulating a kidney ciliopathy, already show a constitutive activation of DDR pathways in the embryonic phase, as evidenced by repair foci in their kidney cells nuclei. This raises a couple of possibilities to consider: either the cilia have some function in the sensing of DNA damage or in transmitting downstream events, or otherwise, the cilia defects somehow transduce (*via* Nek8) to a possible lack of repair of replication defects. Of course a simpler explanation could be that both phenomena are affected simply because Nek8 participates in both of them simultaneously. However, an additional possibility is that Nek8 acts on a higher regulatory level that coordinates both pathways based on the necessity of the cell to coordinate these events closely during the course of the cell cycle.

Clearly, further studies are necessary to evaluate these new possibilities. However, it seems to be clear now that the three central functions controlled by Neks, mitosis, primary cilia and DDR, are more connected than previously expected and that several if not all Neks participate in more than one of them.

A possibility exists that the Neks *per se* are the key regulatory elements that may connect these three functions. The seemingly functional redundancy may in fact rather represent connecting elements between hitherto non-connected regulatory circuits (Figure 5), e.g., between primary ciliary function and DDR for Nek8^[10] and Nek1^[2,23,14]. Furthermore, these circuits may cooperate in a concerted one or two-directional fashion (Nek8).

Most interestingly, from a cilium perspective, recent evidence also indicates a strong link between cilia, stress responses and DNA damage repair processes. A recent study showed that environmental stresses, including UV and IR, result in altering the protein composition of centriolar satellites, thereby promoting *de novo* ciliogenesis^[119]. Together with the recent findings that ciliopathy-associated mutations in DNA damage key regulators (e.g., Mre, Znf423) also connect cilia and DDR^[12,124], it is tempting to speculate that cilia may act as platforms for cell cycle checkpoints or the DDR.

CONCLUSION

Clearly, the past 10 years have provided new and exciting insights into the multifaceted functions of this interesting protein kinase family and the future promises to hold more surprises and the discovery of new functional connections. An exciting time has come to the field of Nek research and the Neks are ready to step out of the shade and take a main role along the other important cell cycle regulatory kinases: Polo-like kinases, Aurora kinases and Cyclin-dependent kinases. It is time to stop Ne(c)king around with them and allow them to enter the spot light in the field of cell cycle biology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Maria Eugênia Camargo for technical assistance.

REFERENCES

- 1 De Souza CP, Horn KP, Masker K, Osmani AS. The SNOB (NUP98) nucleoporin interact with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2003; **165**: 1071-1081 [PMID: 14668365]
- 2 Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* 2003; **42**: 15369-15376 [PMID: 14690447 DOI: 10.1021/bi034575v]
- 3 Vaz Meirelles G, Ferreira Lanza DC, da Silva JC, Santana Bernachi J, Paes Leme AF, Kobarg J. Characterization of hNek6 interactome reveals an important role for its short N-terminal domain and colocalization with proteins at the centrosome. *J Proteome Res* 2010; **9**: 6298-6316 [PMID: 20873783 DOI: 10.1021/pr100562w]

- 4 **O'Connell MJ**, Krien MJ, Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 221-228 [PMID: 12742165 DOI: 10.1016/S0962-8924(03)00056-4]
- 5 **Quarmby LM**, Mahjoub MR. Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5161-5169 [PMID: 16280549 DOI: 10.1242/jcs.02681]
- 6 **O'regan L**, Blot J, Fry AM. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div* 2007; **2**: 25 [PMID: 17727698 DOI: 10.1186/1747-1028-2-25]
- 7 **Moniz L**, Dutt P, Haider N, Stambolic V. Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. *Cell Div* 2011; **6**: 18 [PMID: 22040655 DOI: 10.1186/1747-1028-6-18]
- 8 **Fry AM**, O'Regan L, Sabir SR, Bayliss R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J Cell Sci* 2012; **125**: 4423-4433 [PMID: 23132929 DOI: 10.1242/jcs.111195]
- 9 **Nguyen CL**, Possemato R, Bauerlein EL, Xie A, Scully R, Hahn WC. Nek4 regulates entry into replicative senescence and the response to DNA damage in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 3963-3977 [PMID: 22851694 DOI: 10.1128/MCB.00436-12]
- 10 **Choi HJC**, Lin JR, Vannier JB, Slaats GG, Kile AC, Paulsen RD. NEK8 Links the ATR-Regulated Replication Stress Response and S Phase CDK Activity to Renal Ciliopathies. *Molecular Cell* 2013; **51**: 423-439 [DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.006]
- 11 **Yin MJ**, Shao L, Voehringer D, Smeal T, Jallal B. The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 52454-52460 [PMID: 14563848 DOI: 10.1074/jbc.M308080200]
- 12 **O'Regan L**, Fry AM. The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 3975-3990 [PMID: 19414596 DOI: 10.1128/MCB.01867-08]
- 13 **Chen Y**, Craigen WJ, Riley DJ. Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle* 2009; **8**: 257-267 [PMID: 19158487 DOI: 10.4161/cc.8.2.7551]
- 14 **Upadhyay 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 USA* 2000; **97**: 217-221 [PMID: 10618398 DOI: 10.1073/pnas.97.1.217]
- 15 **Wilson PD**. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 1868-1873 [PMID: 15203099]
- 16 **Thiel C**, Kessler K, Giessl A, Dimmler A, Shalev SA, von der Haar S, Zenker M, Zahnleiter D, Stöss H, Beinder E, Abou Jamra R, Ekici AB, Schröder-Kress N, Aigner T, Kirchner T, Reis A, Brandstätter JH, Rauch A. NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am J Hum Genet* 2011; **88**: 106-114 [PMID: 21211617]
- 17 **Chen CP**, Chang TY, Tzen CY, Wang W. Second-trimester sonographic detection of short rib-polydactyly syndrome type II (Majewski) following an abnormal maternal serum biochemical screening result. *Prenat Diagn* 2003; **23**: 353-355 [PMID: 12673646 DOI: 10.1002/pd.574]
- 18 **Lee MY**, Kim HJ, Kim MA, Jee HJ, Kim AJ, Bae YS, Park JI, Chung JH, Yun J. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2705-2709 [PMID: 18728393 DOI: 10.4161/cc.7.17.6551]
- 19 **Lin F**, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5286-5291 [PMID: 12672950 DOI: 10.1073/pnas.0836980100]
- 20 **Kleymenova E**, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Kugoh H, Everitt J, Xu H, Kiguchi K, Landes G, Harris P, Walker C. Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. *Mol Cell* 2001; **7**: 823-832 [PMID: 11336705 DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00226-X]
- 21 **Huan Y**, van Adelsberg J. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1459-1468 [PMID: 10562308 DOI: 10.1172/JCI51111]
- 22 **Mahjoub MR**, Qasim Rasi M, Quarmby 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; **15**: 5172-5186 [PMID: 15371535 DOI: 10.1091/mbc.E04-07-0571]
- 23 **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 Res* 2004; **64**: 8800-8803 [PMID: 15604234 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2243]
- 24 **Pelegrini AL**, Moura DJ, Brenner BL, Ledur PF, Maques GP, Henriques JA, Saffi J, Lenz G. Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis* 2010; **25**: 447-454 [PMID: 20501547 DOI: 10.1093/mutage/geq026]
- 25 **Liu S**, Ho CK, Ouyang J, Zou L. Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 2175-2180 [PMID: 23345434 DOI: 10.1073/pnas.1217781110]
- 26 **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; **11**: 3521-3531 [PMID: 1382974]
- 27 **Feige E**, Chen A, Motro B. Nurit, a novel leucine-zipper protein, expressed uniquely in the spermatid flower-like structure. *Mech Dev* 2002; **117**: 369-377 [PMID: 12204287 DOI: 10.1016/S0925-4773(02)00217-4]
- 28 **Holloway K**, Roberson EC, Corbett KL, Kolas NK, Nieves E, Cohen PE. NEK1 Facilitates Cohesin Removal during Mammalian Spermatogenesis. *Genes (Basel)* 2011; **2**: 260-279 [PMID: 21931878]
- 29 **Patil M**, Pabla N, Ding HF, Dong Z. Nek1 interacts with Ku80 to assist chromatin loading of replication factors and S-phase progression. *Cell Cycle* 2013; **12**: 2608-2616 [PMID: 23851348 DOI: 10.4161/cc.25624]
- 30 **Feige E**, Shalom O, Tsuril S, Yissachar N, Motro B. Nek1 shares structural and functional similarities with NIMA kinase. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763**: 272-281 [PMID: 16603261 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.01.009]
- 31 **Fry AM**, Schultz SJ, Bartek J, Nigg EA. Substrate specificity and cell cycle regulation of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 12899-12905 [PMID: 7759549 DOI: 10.1074/jbc.270.21.12899]
- 32 **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; **274**: 16304-16310 [PMID: 10347187 DOI: 10.1074/jbc.274.23.16304]
- 33 **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; **141**: 1563-1574 [PMID: 9647649 DOI: 10.1083/jcb.141.7.1563]
- 34 **Yang J**, Adamian M, Li T. Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 1033-1040 [PMID: 16339073 DOI: 10.1091/mbc.E05-10-0943]
- 35 **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; **282**: 6833-6842 [PMID: 17197699 DOI: 10.1074/jbc.M609721200]
- 36 **Wei R**, Ngo B, Wu G, Lee WH. Phosphorylation of the Ndc80 complex protein, HEC1, by Nek2 kinase modulates chromosome alignment and signaling of the spindle assembly checkpoint. *Mol Biol Cell* 2011; **22**: 3584-3594 [PMID: 21832156 DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0012]
- 37 **Salem H**, Rachmin I, Yissachar N, Cohen S, Amiel A, Haffner R, Lavi L, Motro B. Nek7 kinase targeting leads to early mortality, cytokinesis disturbance and polyploidy. *Oncogene* 2010; **29**: 4046-4057 [PMID: 20473324 DOI: 10.1038/onc.2010]
- 38 **Di Agostino S**, Fedele M, Chieffi P, Fusco A, Rossi P, Geremia R, Sette C. Phosphorylation of high-mobility group protein A2 by Nek2 kinase during the first meiotic division in mouse spermatocytes. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 1224-1232 [PMID: 14668482 DOI: 10.1091/mbc.E03-09-0638]
- 39 **Prigent C**, Glover DM, Giet R. Drosophila Nek2 protein kinase knockdown leads to centrosome maturation defects while overexpression causes centrosome fragmentation and cytokinesis failure. *Exp Cell Res* 2005; **303**: 1-13 [PMID: 15572022 DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.04.052]
- 40 **Kimura M**, Okano Y. Molecular cloning and characterization of the human NIMA-related protein kinase 3 gene (NEK3). *Cytogenet Cell Genet* 2001; **95**: 177-182 [PMID: 12063396 DOI: 10.1074/jbc.274.19.13491]
- 41 **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; **19**: 939-949 [PMID: 15618286 DOI: 10.1210/me.2004-0443]
- 42 **Miller SL**, Antico G, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Clevenger CV. Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells. *Oncogene* 2007; **26**: 4668-4678 [PMID: 17297458 DOI: 10.1038/sj.onc.1210264]
- 43 **Hernández M**, Almeida TA. Is there any association between nek3 and cancers with frequent 13q14 deletion? *Cancer Invest* 2006; **24**: 682-688 [PMID: 17118778 DOI: 10.1080/0735790060981364]
- 44 **Kytölä S**, Farnebo F, Obara T, Isola J, Grimelius L, Farnebo LO, Sandelin K, Larsson C. Patterns of chromosomal imbalances in parathyroid carcinomas. *Am J Pathol* 2000; **157**: 579-586 [PMID: 10934160 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64568-3]
- 45 **Shaughnessy J**, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000; **96**: 1505-1511 [PMID: 10942398]
- 46 **Schultz SJ**, Fry AM, Sütterlin C, Ried T, Nigg EA. Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ* 1994; **5**: 625-635 [PMID: 7522034]
- 47 **Chang J**, Baloh RH, Milbrandt J. The NIMA-family kinase Nek3 regulates microtubule acetylation in neurons. *J Cell Sci* 2009; **122**: 2274-2282 [PMID: 19509051 DOI: 10.1242/jcs.048975]
- 48 **Benjamin S**, Weidberg H, Rapaport D, Pekar O, Nudelman M, Segal D, Hirschberg K, Katzav S, Ehrlich M, Horowitz M. EHD2 mediates trafficking from the plasma membrane by modulating Rac1 activity. *Biochem J* 2011; **439**: 433-442 [PMID: 21756249 DOI: 10.1042/BJ20111010]
- 49 **Cance WG**, Craven RJ, Weiner TM, Liu ET. Novel protein kinases expressed in human breast cancer. *Int J Cancer* 1993; **54**: 571-577 [PMID: 8099900 DOI: 10.1002/ijc.2910540409]
- 50 **Levedakou EN**, He M, Baptist EW, Craven RJ, Cance WG, Welch PL, Simmons A, Naylor SL, Leach RJ, Lewis TB. Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating *Xenopus* MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern. *Oncogene* 1994; **9**: 1977-1988 [PMID: 8208544]
- 51 **Hayashi K**, Igarashi H, Ogawa M, Sakaguchi N. Activity and substrate specificity of the murine STK2 Serine/Threonine kinase that is structurally related to the mitotic regulator protein NIMA of *Aspergillus nidulans*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 449-456 [PMID: 10529384 DOI: 10.1006/bbrc.1999.1536]
- 52 **Chen A**, Yanai A, Arama E, Kilfin G, Motro B. NIMA-related kinases: isolation and characterization of murine nek3 and nek4 cDNAs, and chromosomal localization of nek1, nek2 and nek3. *Gene* 1999; **234**: 127-137 [PMID: 10393247 DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00165-1]
- 53 **Coene KL**, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, Roosing S, Letteboer SJ, Peters TA, Cremers FP, Ueffing M, Roepman R. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 3592-605 [PMID: 21685204 DOI: 10.1093/hmg/ddr280]
- 54 **Doles J**, Hemann MT. Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. *Cancer Res* 2010; **70**: 1033-1041 [PMID: 20103636 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2113]
- 55 **Liu S**, Lu W, Obara T, Kuida S, Lehoczy J, Dewar K, Drummond IA, Beier DR. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 2002; **129**: 5839-5846 [PMID: 12421721 DOI: 10.1242/dev.00173]
- 56 **Mahjoub MR**, Trapp ML, Quarmby LM. NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3485-3489 [PMID: 16267153]
- 57 **Young CL**, Khoshnevis S, Karbstein K. Cofactor-dependent specificity of a DEAD-box protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E2668-E2676 [PMID: 23630256 DOI: 10.1073/pnas.1302577110]
- 58 **Motose H**, Hamada T, Yoshimoto K, Murata T, Hasebe M, Watanabe Y, Hashimoto T, Sakai T, Takahashi T. NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2011; **67**: 993-1005 [PMID: 21605211 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04652.x]
- 59 **Vigneault F**, Lachance D, Cloutier M, Pelletier G, Levasseur C, Séguin A. Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice. *Plant J* 2007; **51**: 575-588 [PMID: 17886359 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03161.x]
- 60 **Shimizu K**, Sawasaki T. Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. *FEBS Lett* 2013; **587**: 2219-2225 [PMID: 23727203 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.05.049]
- 61 **Larsen BD**, Rampalli S, Burns LE, Brunette S, Dilworth FJ, Megeney LA. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 4230-4235 [PMID: 20160104]
- 62 **Minoguchi S**, Minoguchi M, Yoshimura A. Differential control of the NIMA-related kinases, Nek6 and Nek7, by serum stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **301**: 899-906 [PMID: 12589797 DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00049-4]
- 63 **Meirelles GV**, Silva JC, Mendonça Y de A, Ramos CH, Torriani IL, Kobarg J. Human Nek6 is a monomeric mostly globular kinase with an unfolded short N-terminal domain. *BMC Struct Biol* 2011; **11**: 12 [PMID: 21320329]
- 64 **Belham C**, Comb MJ, Avruch J. Identification of the NIMA family kinases NEK6/7 as regulators of the p70 ribosomal S6 kinase. *Curr Biol* 2001; **11**: 1155-1167 [PMID: 11516946 DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00369-4]
- 65 **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; **277**: 27839-27849 [PMID: 12023960 DOI: 10.1074/jbc.M202042200]
- 66 Roig J, Mikhailov A, Belham C, Avruch J. Nerccl, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev* 2002; **16**: 1640-1658 [PMID: 12101123 DOI: 10.1101/gad.972202]
- 67 Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp BE, Comb M, Avruch J. A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nerccl1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34897-34909 [PMID: 12840024 DOI: 10.1074/jbc.M303663200]
- 68 Rapley J, Nicolàs M, Groen A, Regué L, Bertran MT, Caelles C, Avruch J, Roig J. The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. *J Cell Sci* 2008; **121**: 3912-3921 [PMID: 19001501 DOI: 10.1242/jcs.035360]
- 69 Bertran MT, Sdelci S, Regué L, Avruch J, Caelles C, Roig J. Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J* 2011; **30**: 2634-2647 [PMID: 21642957 DOI: 10.1038/emboj.2011.179]
- 70 Sdelci S, Bertran MT, Roig J. Nek9, Nek6, Nek7 and the separation of centrosomes. *Cell Cycle* 2011; **10**: 3816-3817 [PMID: 22064517 DOI: 10.4161/cc.10.22.18226]
- 71 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003; **22**: 3307-3318 [PMID: 12761501 DOI: 10.1038/sj.onc.1206406]
- 72 Chen Y, Chen PL, Chen CF, Jiang X, Riley DJ. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3194-3201 [PMID: 18843199 DOI: 10.4161/cc.7.20.6815]
- 73 Melixetian M, Klein DK, Sørensen CS, Helin K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1247-1253 [PMID: 19734889 DOI: 10.1038/ncb1969]
- 74 Moniz LS, Stambolic V. Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 30-42 [PMID: 20956560 DOI: 10.1128/MCB.00648-10]
- 75 Kang J, Goodman B, Zheng Y, Tantin D. Dynamic regulation of Oct1 during mitosis by phosphorylation and ubiquitination. *PLoS One* 2011; **6**: e23872 [PMID: 21897860 DOI: 10.1371/journal.pone.0023872]
- 76 Hashimoto Y, Akita H, Hibino M, Kohri K, Nakanishi M. Identification and characterization of Nek6 protein kinase, a potential human homolog of NIMA histone H3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 753-758 [PMID: 12054534 DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00297-8]
- 77 Skoblov M, Marakhonov A, Marakasova E, Guskova A, Chandhoke V, Bilerdinc A, Baranova A. Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development. *Bioessays* 2013; **35**: 586-596 [PMID: 23592240 DOI: 10.1002/bies.201300002]
- 78 Lee EJ, Hyun SH, Chun J, Kang SS. Human NIMA-related kinase 6 is one of the Fe65 WW domain binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **358**: 783-788 [PMID: 17512906 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.04.203]
- 79 Takeno A, Takemasa I, Doki Y, Yamasaki M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Matsubara K, Monden M. Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer* 2008; **99**: 1307-1315 [PMID: 18827816 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604682]
- 80 Chen J, Li L, Zhang Y, Yang H, Wei Y, Zhang L, Liu X, Yu L. Interaction of Pin1 with Nek6 and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **341**: 1059-1065 [PMID: 16476580 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.228]
- 81 Jee HJ, Kim HJ, Kim AJ, Song N, Kim M, Lee HJ, Yun J. The inhibition of Nek6 function sensitizes human cancer cells to premature senescence upon serum reduction or anticancer drug treatment. *Cancer Lett* 2013; **335**: 175-182 [PMID: 23416273 DOI: 10.1016/j.canlet.2013.02.012]
- 82 Capra M, Nuciforo PG, Confalonieri S, Quarto M, Bianchi M, Nebuloni M, Boldorini R, Pallotti F, Viale G, Gishizky ML, Draetta GF, Di Fiore PP. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res* 2006; **66**: 8147-8154 [PMID: 16912193 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3489]
- 83 Kasap E, Boyacioglu SO, Korkmaz M, Yuksel ES, Unsal B, Kahraman E, Ozütemiz O, Yuceyar H. Aurora kinase A (AURKA) and never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) genes are upregulated in erosive esophagitis and esophageal adenocarcinoma. *Exp Ther Med* 2012; **4**: 33-42 [PMID: 23060919 DOI: 10.3892/etm.2012.561]
- 84 Nassirpour R, Shao L, Flanagan P, Abrams T, Jallal B, Smeal T, Yin MJ. Nek6 mediates human cancer cell transformation and is a potential cancer therapeutic target. *Mol Cancer Res* 2010; **8**: 717-728 [PMID: 20407017 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0291]
- 85 Jeon YJ, Lee KY, Cho YY, Pugliese A, Kim HG, Jeong CH, Bode AM, Dong Z. Role of NEK6 in tumor promoter-induced transformation in JB6 C141 mouse skin epidermal cells. *J Biol Chem* 2010; **285**: 28126-28133 [PMID: 20595392 DOI: 10.1074/jbc.M110.137190]
- 86 Jee HJ, Kim AJ, Song N, Kim HJ, Kim M, Koh H, Yun J. Nek6 overexpression antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. *Cell Cycle* 2010; **9**: 4703-4710 [PMID: 21099361 DOI: 10.4161/cc.9.23.14059]
- 87 Jee HJ, Kim HJ, Kim AJ, Song N, Kim M, Yun J. Nek6 suppresses the premature senescence of human cancer cells induced by camptothecin and doxorubicin treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **408**: 669-673 [PMID: 21539811 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.083]
- 88 Kim S, Lee K, Rhee K. NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **360**: 56-62 [PMID: 17586473 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.05.206]
- 89 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; **580**: 6489-6495 [PMID: 17101132 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.069]
- 90 Cohen S, Aizer A, Shav-Tal Y, Yanai A, Motro B. Nek7 kinase accelerates microtubule dynamic instability. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 1104-1113 [PMID: 23313050 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.021]
- 91 Kim S, Kim S, Rhee K. NEK7 is essential for centriole duplication and centrosomal accumulation of pericentriolar material proteins in interphase cells. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3760-3770 [PMID: 22100915 DOI: 10.1242/jcs.078089]
- 92 Richards MW, O'Regan L, Mas-Droux C, Blot JM, Cheung J, Hoelder S, Fry AM, Bayliss R. An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycle-regulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. *Mol Cell* 2009; **36**: 560-570 [PMID: 19941817 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.038]
- 93 Wang R, Song Y, Xu X, Wu Q, Liu C. The expression of Nek7, FoxM1, and Plk1 in gallbladder cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Clin Transl Oncol* 2013; **15**: 626-632 [PMID: 23359173 DOI: 10.1007/s12094-012-0978-9]
- 94 Bowers AJ, Boylan JF. Nek8, a NIMA family kinase mem-

- ber, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene* 2004; **328**: 135-142 [PMID: 15019993 DOI: 10.1016/j.gene.2003.12.002]
- 95 **Zalli D**, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis. *Human Molecular Genetics* 2012; **21**: 1155-1171 [DOI: 10.1093/hmg/ddr544]
- 96 **Valkova N**, Yunis R, Mak SK, Kang K, Kultz D. Nek8 Mutation Causes Overexpression of Galectin-1, Sorcin, and Vimentin and Accumulation of the Major Urinary Protein in Renal Cysts of jck Mice. *Molecular Cellular Proteomics* 2005; **4**: 1007-1009 [DOI: 10.1074/mcp.M500091 MCP200]
- 97 **Sohara E**, Luo Y, Zhang J, Manning DK, Beier DR, Zhou J. Nek8 Regulates the Expression and Localization of Polycystin-1 and Polycystin-2. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 469-476 [DOI: 10.1681/ASN.2006090985]
- 98 **Roig J**, Groen A, Caldwell J, Avruch J. Active Nerccl protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 4827-4840 [PMID: 16079175 DOI: 10.1091/mbc.E05-04-0315]
- 99 **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 Bcd2. *J Biol Chem* 2002; **277**: 16229-16240 [PMID: 11864968 DOI: 10.1074/jbc.M108662200]
- 100 **Sdelci S**, Schütz M, Pinyol R, Bertran MT, Regué L, Caelles C, Vernos I, Roig J. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of γ -tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr Biol* 2012; **22**: 1516-1523 [PMID: 22818914 DOI: 10.1016/j.cub.2012.06.027]
- 101 **Regué L**, Sdelci S, Bertran MT, Caelles C, Reverter D, Roig J. DYNLL/LC8 protein controls signal transduction through the Nek9/Nek6 signaling module by regulating Nek6 binding to Nek9. *J Biol Chem* 2011; **286**: 18118-18129 [PMID: 21454704 DOI: 10.1074/jbc.M110.209080]
- 102 **Jackman M**, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 143-148 [PMID: 12524548 DOI: 10.1038/ncb918]
- 103 **Wu Z**, Doondea JB, Gholami AM, Janning MC, Lemeer S, Kramer K, Eccles SA, Gollin SM, Grenman R, Walch A, Feller SM, Kuster B. Quantitative chemical proteomics reveals new potential drug targets in head and neck cancer. *Mol Cell Proteomics* 2011; **10**: M111.011635 [PMID: 21955398 DOI: 10.1074/mcp.M111.011635]
- 104 **Boly R**, Gras T, Lamkani T, Guissou P, Serteyn D, Kiss R, Dubois J. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol* 2011; **38**: 833-842 [PMID: 21206969 DOI: 10.3892/ijo.2010.890]
- 105 **Cooper MJ**, Cox NJ, Zimmerman EI, Dewar BJ, Duncan JS, Whittle MC, Nguyen TA, Jones LS, Ghose Roy S, Smalley DM, Kuan PF, Richards KL, Christopherson RL, Jin J, Frye SV, Johnson GL, Baldwin AS, Graves LM. Application of multiplexed kinase inhibitor beads to study kinome adaptations in drug-resistant leukemia. *PLoS One* 2013; **8**: e66755 [PMID: 23826126 DOI: 10.1371/journal.pone.0066755]
- 106 **Kaneta Y**, Ullrich A. NEK9 depletion induces catastrophic mitosis by impairment of mitotic checkpoint control and spindle dynamics. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **442**: 139-146 [PMID: 23665325 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.105]
- 107 **Huber AH**, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997; **90**: 871-882 [PMID: 9298899 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80352-9]
- 108 **Antoniou AC**, Beesley J, McGuffog L, Sinilnikova OM, Healey S, Neuhausen SL, Ding YC, Rebbeck TR, Weitzel JN, Lynch HT, Isaacs C, Ganz PA, Tomlinson G, Olopade OI, Couch FJ, Wang X, Lindor NM, Pankratz VS, Radice P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Barile M, Viel A, Allavena A, Dall'Olio V, Peterlongo P, Szabo CI, Zikan M, Claes K, Poppe B, Foretova L, Mai PL, Greene MH, Rennert G, Lejbkiewicz F, Glendon G, Ozelik H, Andrulis IL, Thomassen M, Gerdes AM, Sunde L, Cruger D, Birk Jensen U, Caligo M, Friedman E, Kaufman B, Laitman Y, Milgrom R, Dubrovsky M, Cohen S, Borg A, Jernström H, Lindblom A, Rantala J, Stenmark-Askmal M, Melin B, Nathanson K, Domchek S, Jakubowska A, Lubinski J, Huzarski T, Osorio A, Lasa A, Durán M, Tejada MI, Godino J, Benitez J, Hamann U, Krieger M, Hoogerbrugge N, van der Luijt RB, van Asperen CJ, Devilee P, Meijers-Heijboer EJ, Blok MJ, Aalfs CM, Hogervorst F, Rookus M, Cook M, Oliver C, Frost D, Conroy D, Evans DG, Lalloo F, Pichert G, Davidson R, Cole T, Cook J, Paterson J, Hodgson S, Morrison PJ, Porteous ME, Walker L, Kennedy MJ, Dorkins H, Peock S, Godwin AK, Stoppa-Lyonnet D, de Pauw A, Mazoyer S, Bonadona V, Lasset C, Dreyfus H, Leroux D, Hardouin A, Berthet P, Faivre L, Loustalot C, Noguchi T, Sobol H, Rouleau E, Nogues C, Frénay M, Vénat-Bouvet L, Hopper JL, Daly MB, Terry MB, John EM, Buys SS, Yassin Y, Miron A, Goldgar D, Singer CF, Dressler AC, Gschwanter-Kaulich D, Pfeiler G, Hansen TV, Jønson L, Agnarsson BA, Kirchhoff T, Offit K, Devlin V, Dutra-Clarke A, Piedmonte M, Rodriguez GC, Wakeley K, Boggess JF, Basil J, Schwartz PE, Blank SV, Toland AE, Montagna M, Casella C, Imyanitov E, Tihomirova L, Blanco I, Lazaro C, Ramus SJ, Sucheston L, Karlan BY, Gross J, Schmutzler R, Wappenschmidt B, Engel C, Meindl A, Lochmann M, Arnold N, Heidemann S, Varon-Mateeva R, Niederacher D, Sutter C, Deissler H, Gadzicki D, Preisler-Adams S, Kast K, Schönbuchner I, Caldes T, de la Hoya M, Aittomäki K, Nevanlinna H, Simard J, Spurdle AB, Holland H, Chen X, Platte R, Chenevix-Trench G, Easton DF. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res* 2010; **70**: 9742-9754 [PMID: 21118973 DOI: 10.1158/0008-5472]
- 109 **Ahmed S**, Thomas G, Ghoussaini M, Healey CS, Humphreys MK, Platte R, Morrison J, Maranian M, Pooley KA, Luben R, Eccles D, Evans DG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Peto J, Stratton MR, Rahman N, Jacobs K, Prentice R, Anderson GL, Rajkovic A, Curb JD, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver WR, Bojesen S, Nordestgaard BG, Flyger H, Dörk T, Schürmann P, Hillemanns P, Karstens JH, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Zalutsky IV, Bermisheva M, Fedorova S, Khushnudinova E, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Devilee P, van Asperen CJ, Tollenaar RA, Seynaeve C, Garcia-Closas M, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Nevanlinna H, Heikkinen T, Aittomäki K, Blomqvist C, Hopper JL, Southey MC, Smith L, Spurdle AB, Schmidt MK, Broeks A, van Hien RR, Cornelissen S, Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Benitez J, Schmutzler RK, Burwinkel B, Bartram CR, Meindl A, Brauch H, Justenhoven C, Hamann U, Chang-Claude J, Hein R, Wang-Gohrke S, Lindblom A, Margolin S, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Olson JE, Wang X, Fredericksen Z, Giles GG, Severi G, Baglietto L, English DR, Hankinson SE, Cox DG, Kraft P, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Hoening MJ, van den Ouweland AM, Oldenburg RA, Schutte M, Hall P, Czene K, Liu J, Li Y, Cox A, Elliott G, Brock I, Reed MW, Shen CY, Yu JC, Hsu GC, Chen ST, Anton-Culver H, Ziogas A, Andrulis IL, Knight JA, Beesley J, Goode EL, Couch F, Chenevix-Trench G, Hoover RN, Ponder BA, Hunter DJ, Pharoah PD, Dunning AM, Chanock SJ, Easton DF. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 2009; **41**: 585-590 [PMID: 19330027 DOI: 10.1038/ng.354]
- 110 **Mulligan AM**, Couch FJ, Barrowdale D, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Robson M, Sherman M, Spurdle AB, Wappenschmidt B, Lee A, McGuffog L, Healey

- S, Sinilnikova OM, Janavicius R, Hansen Tv, Nielsen FC, Ejlersen B, Osorio A, Muñoz-Repeto I, Durán M, Godino J, Pertesi M, Benítez J, Peterlongo P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Cattaneo E, Bonanni B, Viel A, Pasini B, Papi L, Ottini L, Savarese A, Bernard L, Radice P, Hamann U, Verheus M, Meijers-Heijboer HE, Wijnen J, Gómez García EB, Nelen MR, Kets CM, Seynaeve C, Tilanus-Linthorst MM, van der Luijt RB, van Os T, Rookus M, Frost D, Jones JL, Evans DG, Laloo F, Eeles R, Izatt L, Adlard J, Davidson R, Cook J, Donaldson A, Dorkins H, Gregory H, Eason J, Houghton C, Barwell J, Side LE, McCann E, Murray A, Peock S, Godwin AK, Schmutzler RK, Rhiem K, Engel C, Meindl A, Ruehl I, Arnold N, Niederacher D, Sutter C, Deissler H, Gadzicki D, Kast K, Preisler-Adams S, Varon-Mateeva R, Schoenbuchner I, Fiebig B, Heinritz W, Schäfer D, Gevensleben H, Caux-Moncoutier V, Fassy-Colcombet M, Cornelis F, Mazoyer S, Léoné M, Boutry-Kryza N, Hardouin A, Berthet P, Muller D, Fricker JP, Mortemousque I, Pujol P, Coupier I, Lebrun M, Kientz C, Longy M, Sevenet N, Stoppa-Lyonnet D, Isaacs C, Caldes T, de la Hoya M, Heikkinen T, Aittomäki K, Blanco I, Lazaro C, Barkardottir RB, Soucy P, Dumont M, Simard J, Montagna M, Tognazzo S, D'Andrea E, Fox S, Yan M, Rebbeck T, Olopade O, Weitzel JN, Lynch HT, Ganz PA, Tomlinson GE, Wang X, Fredericksen Z, Pankratz VS, Lindor NM, Szabo C, Offit K, Sakr R, Gaudet M, Bhatia J, Kauff N, Singer CF, Tea MK, Gschwanter-Kaulich D, Fink-Retter A, Mai PL, Greene MH, Imyanitov E, O'Malley FP, Ozelik H, Glendon G, Toland AE, Gerdes AM, Thomassen M, Kruse TA, Jensen UB, Skytte AB, Caligo MA, Soller M, Henriksson K, Wachenfeldt vA, Arver B, Stenmark-Askmal M, Karlsson P, Ding YC, Neuhausen SL, Beattie M, Pharoah PD, Moysich KB, Nathanson KL, Karlan BY, Gross J, John EM, Daly MB, Buys SM, Southey MC, Hopper JL, Terry MB, Chung W, Miron AF, Goldgar D, Chenevix-Trench G, Easton DF, Andrulis IL, Antoniou AC. Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumour subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Res* 2011; **13**: R110 [PMID: 22053997 DOI: 10.1186/bcr3052.]
- 111 **Noguchi K**, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J Biol Chem* 2002; **277**: 39655-39665 [PMID: 12154088]
 - 112 **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; **279**: 32716-32727 [PMID: 15161910]
 - 113 **Alborghetti MR**, Furlan AS, Kobarg J. FEZ2 has acquired additional protein interaction partners relative to FEZ1: functional and evolutionary implications. *PLoS One* 2011; **6**: e17426 [PMID: 21408165 DOI: 10.1371/journal.pone.0017426]
 - 114 **Lanza DC**, Meirelles GV, Alborghetti MR, Abrile CH, Lenz G, Kobarg J. FEZ1 interacts with CLASP2 and NEK1 through coiled-coil regions and their cellular colocalization suggests centrosomal functions and regulation by PKC. *Mol Cell Biochem* 2010; **338**: 35-45 [PMID: 19924516 DOI: 10.1007/s11010-009-0317-9]
 - 115 **Hong Z**, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H, Yasui A. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 2939-2947 [PMID: 18385154 DOI: 10.1093/nar/gkn146]
 - 116 **Sonoda E**, Matsusaka T, Morrison C, Vagnarelli P, Hoshi O, Ushiki T, Nojima K, Fukagawa T, Waizenegger IC, Peters JM, Earnshaw WC, Takeda S. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* 2001; **1**: 759-770 [PMID: 11740938 DOI: 10.1016/S1534-5807(01)00088-0]
 - 117 **Ishizaka A**, Mizutani T, Kobayashi K, Tando T, Sakurai K, Fujiwara T, Iba H. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer. *J Biol Chem* 2012; **287**: 11924-11933 [PMID: 22334708 DOI: 10.1074/jbc.M111.322792]
 - 118 **Ewing RM**, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBrook-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 2007; **3**: 89 [PMID: 17353931 DOI: 10.1038/msb4100134]
 - 119 **Villumsen BH**, Danielsen JR, Povlsen L, Sylvestersen KB, Merdes A, Beli P, Yang YG, Choudhary C, Nielsen ML, Mailand N, Bekker-Jensen S. A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and cilio-genesis. *EMBO J* 2013; **32**: 3029-3040 [PMID: 24121310 DOI: 10.1038/emboj.2013.223]
 - 120 **Chaki M**, Airik R, Ghosh AK, Giles RH, Chen R, Slaats GG, Wang H, Hurd TW, Zhou W, Cluckey A, Gee HY, Ramaswami G, Hong CJ, Hamilton BA, Cervenka I, Ganji RS, Bryja V, Arts HH, van Reeuwijk J, Oud MM, Letteboer SJ, Roepman R, Husson H, Ibraghimov-Beskrovnaia O, Yasunaga T, Walz G, Eley L, Sayer JA, Schermer B, Liebau MC, Benzinger T, Le Corre S, Drummond I, Janssen S, Allen SJ, Natarajan S, O'Toole JF, Attanasio M, Saunier S, Antigiac C, Koenekoop RK, Ren H, Lopez I, Nayir A, Stoetzel C, Dollfus H, Mas-soudi R, Gleeson JG, Andreoli SP, Doherty DG, Lindstrad A, Golzio C, Katsanis N, Pape L, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Lewis RA, Omran H, Lee EY, Wang S, Sekiguchi JM, Saunders R, Johnson CA, Garner E, Vanselow K, Andersen JS, Shlomai J, Nurnberg G, Nurnberg P, Levy S, Smogorzewska A, Otto EA, Hildebrandt F. Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell* 2012; **150**: 533-548 [PMID: 22863007 DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.028]
 - 121 **Zhu YY**, Lan JP, Yu J. Interaction between a novel centrosomal protein TACP1 and mitotic kinase Nek2A [Article in Chinese]. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixueban* 2007; **36**: 337-42 [PMID: 17717823]
 - 122 **Prime G**, Markie D. The telomere repeat binding protein Trf1 interacts with the spindle checkpoint protein Mad1 and Nek2 mitotic kinase. *Cell Cycle* 2005; **4**: 121-124 [PMID: 15611654]
 - 123 **Lou Y**, Xie W, Zhang DF, Yao JH, Luo ZF, Wang YZ, Shi YY, Yao XB. Nek2A specifies the centrosomal localization of Erk2. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 495-501 [PMID: 15358203]
 - 124 **Helps NR**, Luo X, Barker HM, Cohen PT. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J* 2000; **349**: 509-518 [PMID: 10880350]
 - 125 **Ashburner M**, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; **25**: 25-29 [PMID: 10802651 DOI: 10.1038/75556]
 - 126 **Shannon P**, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; **13**: 2498-2504 [PMID: 14597658]
 - 127 **Mi J**, Guo C, Brautigan DL, Larner JM. Protein phosphatase-1 α regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res* 2007; **67**: 1082-1089 [PMID: 17283141 DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-06-2585]

- 10.1158/0008-5472.CAN-06-3071]
- 128 **Sann S**, Wang Z, Brown H, Jin Y. Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends Cell Biol* 2009; **19**: 317-324 [PMID: 19540123 DOI: 10.1016/j.tcb.2009.05.001]
- 129 **Pelengaris S**, Khan M. The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 324
- P- Reviewers:** Benke D, Gurevich VV, Zheng J **S- Editor:** Qi Y
L- Editor: Roemmele A **E- Editor:** Lu YJ



8.7. Declaração de autorização do Comitê de Biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada:
"Caracterização do perfil de interação da proteína humana Nek4 e sua contextualização funcional"

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto **No. JK2.2**, Instituição: **Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira De Tecnologia de Luz Síncrotron.**

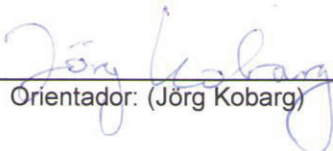
() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



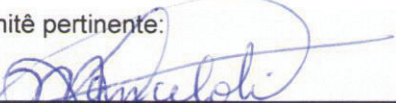
Aluno: (Fernanda Luisa Basei)



Orientador: (Jörg Kobarg)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI

Carimbo e assinatura

Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

JK 2.2

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Caracterização das vias de sinalização das proteínas humanas Nek11 e Nek4 – um estudo bioquímico e funcional

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Experimentador: Fernanda Luisa Basei

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, []-mestrado, [X]-doutorado, []-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

As Neks são proteínas quinases similares a NIMA, proteína que é indispensável para a entrada em mitose de células de leveduras. Em humanos foram identificadas 11 Neks (1-11), sendo que para algumas a estrutura já foi determinada bem como a relevância fisiopatológica. Devido à participação na regulação do ciclo celular, como na organização de microtúbulos e ainda vias de sinalização de reparo ao DNA, para algumas já foi também observado a importância dessas vias no desenvolvimento de células tumorais. As Neks11 e 4 são proteínas até então pouco investigadas, sendo que para a primeira já se sabe que está envolvida na via de reparo do DNA e está presente em diferentes tecidos, embora pouco se conheça sobre sua estrutura e sobre as proteínas com as quais interage. Entre as Neks humanas, a Nek4 é menos investigada, sendo que aparentemente sua participação é importante para a gametogênese em camundongos e, embora apresente bastante semelhança estrutural com a Nek1 murina, não parece estar diretamente envolvida na regulação do ciclo celular. Diante disso, nesse projeto pretendemos identificar as proteínas que interagem com a Nek11, caracterizar sua atividade fisiopatológica bem como as vias de sinalização das quais participa durante o reparo ao DNA. Para Nek4, pretendemos expressar e purificá-la para melhor caracterizá-la estrutural e funcionalmente.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 3.3.2010.

Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários abaixo:

Jörg Kobarg
Presidente de CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Jörg Kobarg

Celso Benedetti
Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Andrea Balan
Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Andrea Balan