UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDUARDO CRUZ MORAES

SELEÇÃO DE COMPOSTOS COMO CANDIDATOS PARA A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CINASES HUMANAS DA FAMÍLIA DAS NEKS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Eduardo Cruz Moraes e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M791s

Moraes, Eduardo Cruz, 1986-
Seleção de compostos como candidatos para a inibição da atividade de proteínas cinases humanas da família das Neks / Eduardo Cruz Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Jörg Kobarg.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inibição enzimática. 2. Fosfotransferases. 3. Desenho de drogas. I. Kobarg, Jörg. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Compound selection as candidates for inhibition of kinase activity of human Neks
Palavras-chave em Inglês:
Enzymatic inhibition
Phosphotransferases
Drug design
Área de concentração: Bioquímica
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular
Banca examinadora:
Jörg Kobarg [Orientador]
Ana Carolina Migliorini Figueira
Celso Eduardo Benedetti
Data da defesa: 14-05-2012
Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 14 de Maio de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador) _____
Assinatura

Prof[a]. Dr[a]. Ana Carolina Migliorini Figueira _____
Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti _____
Assinatura

Prof. Dr. Artur Torres Cordeiro _____
Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama _____
Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado **SELEÇÃO DE COMPOSTOS COMO CANDIDATOS PARA A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CINASES HUMANAS DA FAMÍLIA DAS NEKS**:

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. **JK 2.4**, Instituição: **ABTLus/CNPEM/LNBio**.

( ) 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.*

Eduardo Cruz Moraes

Aluno: Eduardo Cruz Moraes

Jörg Kobarg

Orientador: Jörg Kobarg

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: JK 2.4

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: Exploração de proteínas cinases humanas da família das Neks como candidatos alvos para inibição do crescimento celular

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Experimentador: Eduardo Cruz Moraes

Nível do treinamento do experimentador: [ ]-Iniciação científica, [x]-mestrado, [ ]-doutorado, [ ]-doutorado direto, [ ]-pós-doutorado, [ ]-nível técnico, [ ]-outro, especifique:_____

Resumo do projeto:

As proteínas Neks (*NIMA related kinases*) constituem uma família de proteínas quinases altamente conservadas envolvidas na progressão do ciclo celular. Essas proteínas tem sido descritas contendo em torno de 40% de identidade com a proteína NIMA (*never in mitosis, gene A*) de *Aspergillus nidulans,* desempenhando a mesma função das Neks de mamíferos neste organismo. Várias proteínas da família das Neks são produtos de genes relativos a patologias relacionadas a defeitos na progressão do ciclo celular e no mecanismo de reparo de DNA durante a interfase, sobretudo carcinomas. Por estas características, estas proteínas são alvos potenciais para o tratamento de cânceres. Portanto, o objetivo geral deste projeto é a validação de proteínas humanas da família de quinases Nek como alvos para inibição do crescimento celular de linhagens de células humanas em cultura, utlizando técnicas como silenciamento por siRNA, ensaios de deslocamento térmico baseado em fluorescência e ensaios de modelagem e triagem de inibidores *in silico.*

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
Profa. Dra. Andrea Balan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao prof. Jörg Kobarg, por ter me concedido a oportunidade de realização deste mestrado. Obrigado pela paciência, pela compreensão nos momentos que apresentei dificuldades, e por ter me orientado não somente nos caminhos da biologia molecular, mas também nos caminhos do Rock 'n Roll!

À Eugênia, pelo zelo e disposição na manutenção do laboratório e no suporte ao grupo, pela enorme paciência na nossa cooperação com a ordem e bom funcionamento do laboratório. Obrigado pelos "puxões de orelhas" nos momentos em que foram necessários.

Aos técnicos do LNBio, em especial à Jackeline Zanella pela ajuda com a purificação das proteínas e à Carolina Bondarik, que além de ajudar todo o laboratório com a lavagem e esterilização de material, foi uma amiga sempre muito presente e me ensinou vários raps.

Aos colegas de grupo, começando pelo "clã" das Neks: Diogo Lovato, Talita Diniz, Edmárcia Elisa, Fernanda Basei, Gabriela Meirelles, Priscila Ferreira, Vanessa Cardoso, Mayra Lemos, Bárbara Godoy, Manuela Moret; e aos demais integrantes: Marcos Alborghetti, Kaliandra Gonçalves, Ângela Saito, Deivid Migueletti, Daniel Saito, Marcos Tadeu (Toty), Germanna Righetto, Priscila Zenatti, Ariane Furlan e à recém chegada Aline Cardoso.

Um agradecimento especial à minha "chefia" Gabriela Meirelles, sem a qual eu não poderia ter concluído esta etapa da minha vida. Muitíssimo obrigado pela imensurável ajuda, não apenas no que diz respeito aos afazeres de laboratório, mas também por ter sido uma amiga sempre presente. Obrigado pelas dicas de filmes, de músicas, de quadrinhos, e pelas poucas vezes que dançamos forró. Agradeço especialmente também aos "bros" Daniel Saito e Deivid Migueletti, por terem sido muito mais do que colegas de trabalho, mas verdadeiros amigos que estiveram por perto para me amparar nos momentos de dificuldades.

Ao pessoal dos “almoços filosóficos”, Gabriela Meirelles, Carlos Paier, Rafael Canevarolo e Diogo Lovato. Obrigado por terem proporcionado tantas discussões interessantes. Nossas idéias são moldadas pelas pessoas com quem compartilhamos idéias ao longo de nossas vidas, e tenho certeza que me tornei um pouco mais sábio ao longo destes dois anos por conta de nossas conversas.

Aos colaboradores Mario Murakami e Artur Cordeiro, e especialmente aos seus orientados: Gustavo Mercaldi, pela ajuda com a plataforma de bioensaios, e Tatiana Brasil, pela importante ajuda com os ensaios de docking molecular.

Sem exceção, a todos os colegas do LNBio, que se mostraram prestativos seja na ajuda com algum equipamento, na dúvida quanto a algum processo, ou simplesmente por uma conversa amistosa na hora do cafezinho.

Aos integrantes da banca de qualificação, prof.ª Carmen Veríssima Ferreira, Bayardo Baptista Torres e Cláudio Chrysostomo Werneck, pelas sugestões dadas a este trabalho, e pela banca de defesa, prof.ª Ana Carolina Migliorini Fuigueira e prof. Celso Eduardo Benedetti, pela contribuição importante que fizeram para a versão final deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro, e ao Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, pela excelente infra-estrutura para pesquisa.

E por último, mas não menos importante, pelo suporte e apoio incondicionais da minha família, em especial minha mãe, Maria Estela Cruz, por ter estado por perto nos momentos de dificuldade; minha tia, Elizabeth Cruz, que tem sido pra mim como uma segunda mãe nos últimos anos; ao primo Alcides Cândido da Silva, por ter sido como um irmão para mim; e aos seus filhos, meus “priminhos” Kauã e Arthur, por me trazerem de volta a felicidade de ser criança.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....04

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....07

RESUMO/ABSTRACT.....08

I. INTRODUÇÃO

1. Proteínas cinases: aspectos funcionais e estruturais.....10

2. A proteína NIMA de *Aspergillus nidulans*.....10

3. As proteínas da família Nek em mamíferos.....11

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral.....16

2. Objetivos Específicos.....16

III. METODOLOGIA

1. Mutagênese sítio-dirigida.....17

2. Clonagem das sequências codificadoras dos domínios de cinase das proteínas humanas Neks 8 e 9.....20

3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....25

4. Ensaios de deslocamento térmico.....30

5. Modelagem molecular.....31

6. Docking molecular.....31

7. Ensaios de atividade de enzima cinase.....32

IV. RESULTADOS

1. Mutagênese sítio-dirigida.....33

2. Testes de expressão das proteínas clonadas em pET28a-TEV.....34

3. Clonagem das sequências codificadoras dos domínios de cinase das proteínas humanas Neks 8 e 9 em pET28a-TEV-Sumo.....38

4. Testes de expressão das proteínas clonadas em pET28a-TEV-Sumo.....39

5. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....42

6. Ensaios de deslocamento térmico.....44

7. Docking molecular.....45

8. Ensaios de atividade de enzima cinase.....50

V. CONCLUSÕES.....54

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....56

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura geral das proteínas cinases.....15

Figura 2. A extensa família Nek (*NIMA-related kinase*).....16

Figura 3. Representação do ensaio de deslocamento térmico.....35

Figura 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos da hNek8 utilizando-se o programa ClustalW.....38

Figura 5. Teste de expressão dos domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9.....40

Figura 6. Repetição do western blot para as condições promissoras encontradas no primeiro teste de expressão.....41

Figura 7. Teste de expressão para os domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9, utilizando duas condições de expressão onde observou-se expressão previamente.....42

Figura 8. Esquematização da subclonagem dos domínios de cinase mutado e não mutado das hNeks 8 e 9.....43

Figura 9. Teste de expressão dos domínios de cinase mutados e não mutados das hNeks 8 e 9 clonados em pET28a-TEV-SUMO.....41

Figura 10. Testes de expressão do domínio de cinase mutado e não mutado da hNek8 clonado em pET28a-TEV-SUMO.....44

Figura 11. Expressão e purificação em coluna de afinidade dos domínios de cinase mutados das hNeks 1, 2 e 9 e do domínio de cinase não mutado da hNek9.....47

Figura 12. Docking molecular de compostos selecionados para as Neks humanas 1, 6 e 7.....53

Figura 13. Representação esquemática por intersecção de grupos de compostos selecionados nos ensaios de deslocamento térmico, docking molecular e ensaios de atividade de enzimas cinase para as Neks humanas 1, 2, 6 e 7.....57

Tabela 1. Funções propostas para Neks de mamíferos.....17

Tabela 2. Ciclos de temperatura utilizados para a mutagênese sítio-dirigida.....22

Tabela 3. Oligonucleotideos utilizados para a mutagênese sítio-dirigida nos domínio de cinase da proteína hNek8.....23

Tabela 4. Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos domínios de cinase (KD) das hNeks 8 e 9.....24

Tabela 5. Ciclos de temperatura utilizados para a amplificação dos domínios de cinase das proteínas hNek8 e hNek9.....24

Tabela 6. Condições testadas para expressão dos domínios de cinase mutados das proteínas hNek8 e hNek9.....39

Tabela 7. Condições testadas para expressão dos domínios de cinase mutados e não mutados das proteínas hNek8 e hNek9.....44

Tabela 8. Descrição das condições de expressão dos domínios de cinase das hNeks 1, 2 e 9....46

Tabela 9. Resumo das temperaturas de deslocamento (ΔT_m), energias de ligação entre ligantes e proteínas e porcentagem de fosforilação para as hNeks 1, 2, 6 e 7 na presença dos compostos selecionados na triagem inicial de compostos através de ensaios de deslocamento térmico.....56

RESUMO

Cinases desempenham um papel importante na ativação de vias bioquímicas em células eucarióticas. Neks (***N***IMA r***e***lated ***k***inases) são uma família conservada de proteínas cinases relacionadas à progressão do ciclo celular e divisão celular, contendo em torno de 40% de identidade no domínio catalítico N-terminal com a proteína NIMA (***N***ever ***i***n ***M***itosis, gene ***A***) de *Aspergillus nidulans.* As cinases Neks são também descritas como relacionadas a patologias, particularmente câncer. Por estas características, as Neks são alvos potenciais para o tratamento de cânceres e desenvolvimento de drogas anti-câncer.

Neste trabalho foram selecionados compostos em uma biblioteca de 87 compostos para os domínios de cinase mutados de hNek1, hNek2, hNek6, hNek8 e hNek9 e o domínio de cinase selvagem de hNek7, através de um ensaio de deslocamento térmico. Neste ensaio, foi identificado pelo menos um composto com um deslocamento da T_m significativo para a hNek1 (Δ262-1258)-(T162A), E08 (ΔT_m = 4.0^{o}C); outro, E04 (ΔT_m = 6.5^{o}C) para a hNek6(S206A), e vários compostos para a hNek7wt e hNek2(Δ272-445)-(T175A). Destes compostos, B03 e F04 foram validados por docking no sítio de ligação de ATP da hNek7wt, enquanto B08 e E03 foram validados por reduzir a atividade da hNek7wt até 26,4% e 43,3%, respectivamente, na concentração de 312,5 nM. Além disso, o composto E04 foi capaz de reduzir a atividade da hNek6(S206A) pela metade com um IC_{50} próximo de 1,25 μM.

São necessários experimentos funcionais adicionais para validação desses dados, e estudos estruturais com resolução atômica serão importantes para caracterizar a associação de hNek1(Δ262-1258)-(T162A), hNek6(S206A) e hNek7 selvagem com esses e outros compostos.

ABSTRACT

Kinases play an important role in the activation of biochemical pathways in eukaryotic cells. Neks (***N***IMA r***e***lated ***k***inases) are a conserved kinase protein family related to cell cycle progression and cell division, containing about 40% identity in the N-terminal catalytic domain with the protein NIMA (***N***ever ***i***n ***M***itosis, gene ***A***) of *Aspergillus nidulans*. Nek kinases are also described as related to pathologies, particularly cancer. For these characteristics, Neks are potential targets for treatment of cancers and development of anti-cancer drugs.

Here we screened the recombinant activation loop mutant kinase domains of hNek1, hNek2, hNek6, hNek8 and hNek9 and wild-type hNek7 against 87 compounds using thermal shift denaturation and identified at least one compound with significant T_m shift for hNek1(Δ262-1258)-(T162A), E08 (ΔT_m = 4.0°C), another one, E04 (ΔT_m = 6.5°C) for hNek6(S206A), but not for the other hNek6 variants, and several hit compounds for hNek7wt and hNek2(Δ272-445)-(T175A). From these, compounds B03 and F04 were validated by docking into the ATP-binding site of hNek7wt, while B08 and E03 were validated by reducing hNek7wt activity up to 26.4% and 43.3%, respectively, at a 312.5 nM concentration. We also found that mutant hNek6, without the activation loop conserved phosphorylation, is a better target for inhibitor stabilization than an activated more phosphorylated hNek6 kinase. Moreover, compound E04 was later confirmed to reduce hNek6(S206A) activity by half with IC_{50} near to 1.25 μM.

Further functional experiments in living cells are required to validate this findings, and structural studies with atomic resolution will be important to characterize the association of hNek1(Δ262-1258)-(T162A), hNek6(S206A) and wild-type hNek7 with these and other compounds.

I. INTRODUÇÃO

1. Proteínas cinases: aspectos funcionais e estruturais

Proteínas cinases desempenham um papel importante na ativação de vias bioquímicas em células eucarióticas. Com mais de 500 cinases descritas codificadas no genoma humano, praticamente todo processo de transdução de sinal é ligado através de uma cascata de fosfotransferência. Portanto, a regulação precisa da fosforilação é crucial para o crescimento e desenvolvimento celulares, e esta regulação depende da regulação correta das proteínas cinases envolvidas neste processo. Domínios de proteínas cinase são encontrados em cerca de 2% dos genes eucarióticos [Rubin *et al.*, 2000], o que também reflete sua importância. Essas proteínas tipicamente apresentam um arranjo conservado de estrutura secundária em 12 subdomínios que se enovelam em um núcleo catalítico bi-lobulado (N-terminal e C-terminal) com o sítio de ligação de ATP (domínio catalítico) numa fenda profunda localizada entre os dois lobos [Johnson *et al.*, 1998]. O lobo N-terminal é composto por 5 fitas-β e uma α-hélice proeminente (hélice αC), enquanto o domínio C-terminal é constituído predominantemente por α-hélices (Figura 1). Os domínios catalíticos homólogos das cinases consistem de ~250-300 resíduos de aminoácidos [Hanks *et al.*, 1991]. Proteínas cinases são consideradas "interruptores moleculares", uma vez que podem adotar um estado "ligado", com atividade máxima, e um estado "desligado", com atividade mínima. No estado "ligado", o domínio conservado DFG (Figura 1) está na posição *DFG-in*, catalisando a transferência do γ-fosfato do ATP para o grupo hidroxil dos aminoácidos serina, treonina ou tirosina da proteína substrato [Jeffrey *et al.*, 1995; Yamaguchi and Hendrickson, 1996; Canagarajah *et al.*, 1997; Hubbard, 1997]. No estado desligado, o motivo DFG ocupa a posição *DFG-out*, o que não possibilita a ligação do ATP. Estas duas conformações possuem implicações importantes no desenho racional de drogas, umas vez que certos compostos se ligam às proteínas cinases apenas no estado *DFG-in* (denominados inibidores Tipo I), enquanto outros se ligam no estado DFG-out (inibidores Tipo II). Há ainda uma terceira classe de inibidores, denominados inibidores alostéricos, que se ligam a domínios regulatórios destas proteínas.

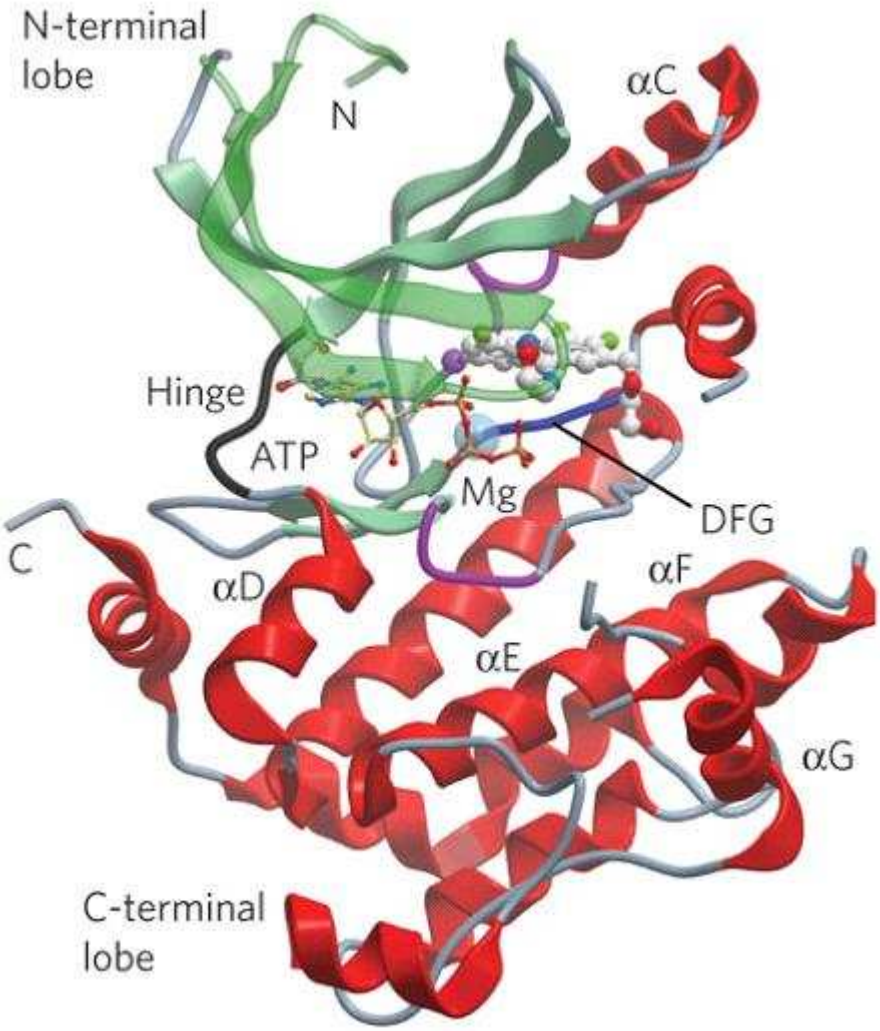


Figura 1. Estrutura geral das proteínas cinases: A figura mostra o domínio N-terminal (verde), composto essencialmente por fitas-β, e o domínio C-terminal (vermelho) e suas α-hélices. A região denominada "hinge" corresponde à alça de ligação entre os dois lobos. O sítio de ligação de ATP se localiza entre os dois lobos, onde a molécula de ATP está representada, juntamente com o seu co-fator, o íon magnésio. A região DFG corresponde a um domínio conservado nas proteínas cinases.

2. A proteína NIMA de *Aspergillus nidulans*

Entre as diversas famílias de proteínas cinases descritas, os membros da família das que se encontram relacionadas à NIMA são os menos caracterizados funcionalmente. Como protótipo desta família, a proteína NIMA (*n*ever *i*n *m*itosis, gene *A*) foi identificada e caracterizada funcionalmente em *Aspergillus nidulans* como sendo uma serina/treonina quinase crítica para a progressão do ciclo celular neste organismo, sendo necessária no início da mitose [Bergen *et al*., 1984]. Mutantes de NIMA sensíveis à temperatura ou a superexpressão de formas dominante-negativas de NIMA causam interrupção do ciclo celular na fase G2, detectando-se DNA não-condensado e microtúbulos na forma encontrada em intérfase [Osmani *et al*., 1991]. Além disso, a superexpressão de NIMA em fungos e em células de mamíferos resultou no desencadeamento precoce de eventos relacionados à mitose, incluindo a condensação da cromatina e a despolimerização dos microtúbulos [Lu & Hunter, 1995]. A habilidade de NIMA em regular a mitose em eucariotos superiores sugere a existência de vias de sinalização envolvendo proteínas homólogas à NIMA, conservadas durante a evolução.

3. As proteínas da família Nek em mamíferos

As Neks (*N*IMA r*e*lated *k*inases) formam uma família de serina/treonina cinases altamente conservada, estando envolvidas na regulação do ciclo celular. Algumas Neks de mamíferos localizadas nos cílios, além de afetarem a progressão do ciclo, também se encontram relacionadas a funções ciliares [Quarmby & Mahjoub, 2005]. Proteínas cinases estruturalmente homólogas à NIMA têm sido descritas em mamíferos contendo em torno de 40% de identidade no domínio catalítico N-terminal. A extremidade C-terminal constitui seu domínio regulatório e apresenta maior variabilidade, estando envolvida na determinação da especificidade por substratos e na interação com outras proteínas. Em 1992, Letwin e colaboradores descreveram a primeira proteína quinase relacionada à NIMA, Nek, em humanos. Posteriormente, outros trabalhos realizados identificaram mais proteínas quinase relacionadas à NIMA, sendo atualmente conhecidas onze Neks humanas, as quais possuem ortólogos também em camundongos (Tabela 1) [Quarmby & Mahjoub, 2005].

Tabela 1: Funções propostas para Neks de mamíferos

Proteína	Função proposta	Referência
Nek1	Alterações no gene *nek1* em animais são modelos para a doença policística renal em humanos.	Upadhya et al., 2000
	Interage com proteínas envolvidas no ciclo celular e no reparo do DNA.	Surpili et al., 2003
	Papel na resposta a dano ao DNA induzido por radiação ionizante.	Polci et al., 2004
Nek2	Localizado em centrossomos e cinetócoros.	Fry et al., 1998b
	Fosforila a C-Napland Nlp no centrossomo.	Fry et al., 1998a
	Regula a separação do centrossomo na transição G2/mitose.	Rapley et al., 2005
	Possível papel na regulação do fuso mitótico.	Chen et al., 2002
Nek3	Modula a sinalização dos receptores de prolactina.	Miller et al., 2005
Nek6 e 7	Participam da mesma cascata de sinalização na mitose.	Belham et al., 2003
Nek8	Aumento da expressão em câncer de mama.	Bowers & Boylan, 2004
Nek9	Associação ao Bicd2 *in vivo*, fosforilação de Bicd2.	Holland et al., 2002
	Regula o alinhamento e a segregação dos cromossomos na mitose.	Roig et al., 2002
	Mediador da organização dos cromossomos e do centrossomo.	Roig et al, 2005
	Ativa a Nek6 durante a mitose.	Belham et al., 2003
	Regula a progressão de G1 e S através da interação com o complexo facilitador da transcrição da cromatina (FACT)	Tan & Lee, 2004
Nek11	Cinase responsiva a estresse replicativo e a danos ao DNA.	Nogushi et al., 2002
	É ativada pela Nek2a em células com defeito na progressão do ciclo celular em G1/S.	Nogushi et al., 2004

*dados da tabela retirados de Quarmby & Mahjoud, 2005.

Dentre as proteínas da família das Neks, Nek2 é até o momento a melhor caracterizada. As proteínas Nek2 de vertebrados regulam a separação dos centrossomos durante a fase G2/M do ciclo celular, sendo de fundamental importância para a formação do fuso mitótico e adequada separação dos cromossomos [Quarmby & Mahjoub, 2005]. Existem duas variantes da Nek2 produzidas por processamento (*splicing*) alternativo: a Nek2a, que é necessária para a separação do centrossomo na transição da fase G2 para a mitose [Fry, 2002]; e a Nek2b, que é recrutada no centrossomo zigótico, sendo essencial para a manutenção dessa estrutura em estágios embrionários iniciais. Nek2 também pode desempenhar um papel adicional nos pontos

de controle (*checkpoints*), que são momentos do ciclo celular nos quais uma maquinaria de proteínas confere se o ciclo está se desenvolvendo corretamente e a partir dessa verificação a célula recebe sinais de que deve continuar o processo ou que deve parar e ativar a cascata sinalizadora de apoptose. Defeitos nos componentes dessas maquinarias podem acarretar o desenvolvimento de doenças, como cânceres, a partir do acúmulo de erros e mutações.

As proteínas Nek6 e Nek7 são as menores e, estruturalmente, as mais simples Neks constituídas, praticamente, apenas por seus domínios catalíticos que se localizam na região C-terminal e, ao contrário das demais Neks, apresentam uma curta extremidade N-terminal [O'Connel *et al*., 2003]. Nek6 e Nek7 compartilham 87% de identidade nos seus domínios catalíticos e, juntamente com a proteína F196H6.1 de *C. elegans*, têm sido descritas como representantes de uma subfamília altamente conservada de Neks (Kandli *et al*., 2000). Nek6 e Nek7 foram inicialmente identificadas em um *screening* bioquímico clássico por cinases capazes de fosforilar o sítio regulatório hidrofóbico da cinase p70 S6 (S6K), embora novos estudos demonstraram que a Nek6 (e por extensão a Nek7), possivelmente, não são ativadores fisiológicos da S6K [Lizcano *et al*., 2002]. Evidências recentes apontam para funções na mitose relacionadas à NIMA para ambas as proteínas.

A Nek6 endógena é ativada durante a mitose, concomitante com um aumento do seu nível de expressão [Belham *et al*., 2003], enquanto a Nek7, ao contrário, parece ser relativamente constante ao longo do ciclo celular [Kim *et al*., 2007]. Além disso, a Nek7 foi descrita por localizar-se no centrossomo de células U2OS e HeLa tanto na intérfase quanto na mitose [Yassachar *et al*., 2006; Kim *et al*., 2007], enquanto a Nek6 apresenta uma distribuição difusa, principalmente citoplasmática. Contudo, a superexpressão de mutantes cataliticamente inativos das Neks 6 e 7 produzem fenótipos similares, como células exibindo elevados índices mitóticos, defeitos no fuso mitótico, anormalidades nucleares e apoptose [Yin *et al*., 2003; Yassachar *et al*., 2006]. Esses fenótipos são também observados a partir da depleção das Neks 6 e 7 em células HeLa, utilizando-se iRNA, ocorrendo a retenção das células na metáfase, apresentando uma normal condensação da cromatina e alinhamento, mas uma incapacidade de completar a segregação dos cromossomos. A atividade das Neks 6 e 7, portanto, parece ser necessária para a progressão da anáfase, onde as células são retidas no ponto de controle do fuso mitótico e entram em apoptose, ou completam a mitose, mas com a aquisição de

anormalidades nucleares durante o processo [Yin *et al*., 2003; Yassachar *et al*., 2006; Kim *et al*., 2007].

Nek6 e Nek7 co-purificam com a Nek9 como resultado de uma interação específica e forte, ligando entre o domínio RCC1 e o motivo de *coiled-coil* da Nek9 [Roig *et al*., 2002]. É sabido que a Nek6 apresenta grande expressão e maior atividade catalítica durante a mitose, mas para isso é necessária a fosforilação no resíduo Ser206, que é realizada diretamente pela Nek9 *in vitro* e *in vivo*; Nek7 é também fosforilada pela Nek9 no resíduo de Ser195, sendo ambos os sítios encontrados nos *loops* de ativação das duas cinases, respectivamente [Belham *et al.*, 2003]. Estes fatos levaram a um modelo em que as Neks 6, 7 e 9 atuam como parceiros de uma mesma cascata de sinalização, sendo as Neks 6 e 7 substratos da Nek9, onde esta se mantêm inativa durante a intérfase e ativa na mitose, ativando as Neks 6 e 7 de forma semelhante que, por sua vez, coordenam a formação e manutenção do fuso mitótico. É possível, portanto, que alguns ou todos os fenótipos observados com a microinjeção de IgG anti-Nek9 nas células humanas sejam causados pela interferência com as funções das Neks 6 e 7 [Roig *et al.,* 2002].

Várias proteínas da família das Neks são produtos de genes relacionados com patologias. Mutações nos genes de Nek1 e Nek8 estão relacionadas à doença cística dos rins [Barker *et al.*, 2000, Beier *et al.*, 2002]. Nek8 é superexpressa em tumores mamários em humanos [Bowers & Boylan, 2004] e a Nek3 humana parece apresentar um importante papel na sinalização do receptor de prolactina, especificamente numa via que contribui para a progressão e motilidade do câncer de mama [Miller *et al*., 2005]. A superexpressão de Nek6 é identificada em carcinomas hepatocelulares [Chen *et al.*, 2006]. Além disso, o gene de Nek6 é frequentemente expresso, entre outros genes de proteínas cinases, relacionados a câncer de mama, colorretal, pulmão laringe através de estudos de hibridização *in situ,* além da proteína Nek6 ser apontada como um marcador potencial de câncer gástrico [Capra *et al.*, 2006]. Estudos indicam que Nek6 e Nek1 estão relacionadas aos *checkpoints* de dano de DNA durante a interfase. Nek6 é fosforilada em resposta a danos no DNA por exposição a raios UV, fazendo que as células fiquem presas na transição G2/M da intérfase, além de ter sua atividade totalmente abolida durante a mitose [Yun et al., 2008]. Do mesmo modo, células deficientes em Nek1 são defeituosas nos *checkpoints* da transição G1/S e da fase M, não reparam DNA e apresentam

quebra de cromatina e cromossomos defeituosos [Riley *et al.*, 2008]. Deste modo, células que apresentam mutações nos genes de Nek1 e Nek6 falham ao reconhecer e reparar danos no DNA.

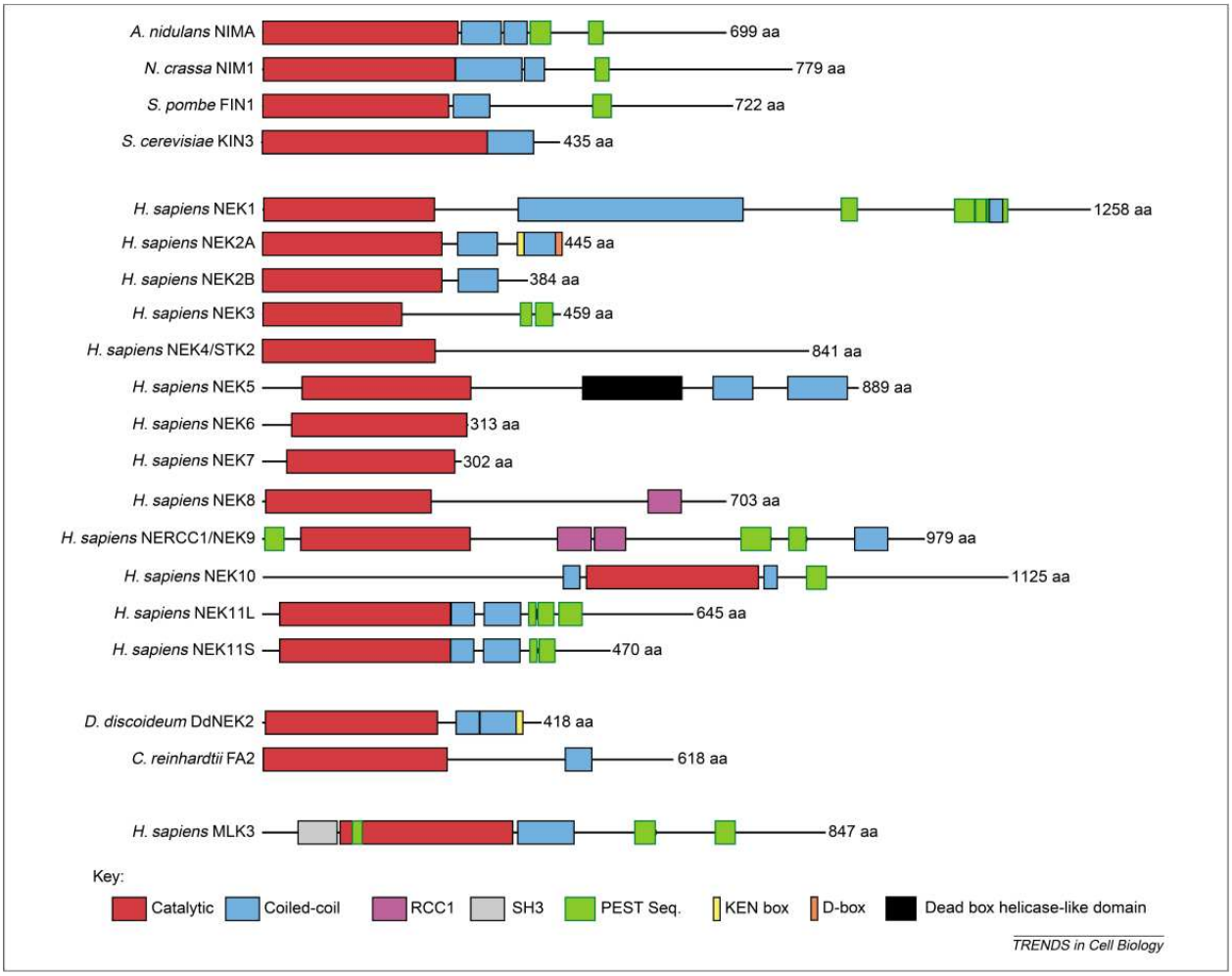


Figura 2. A extensa família Nek (*NIMA-related kinase*). Alinhamento de características estruturais importantes da família Nek, incluindo: sequências PEST (http://emb1.bcc.univie.ac.at/embnet/tools/bio/PESTfind/); domínios *coiled-coil* (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html); domínios de cinase e outros (SH3/RCC1), utilizando o Pfam (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml). As sequências completas de NEK1–NEK11 humanas foram obtidas de http://www.kinase.com. As NIMA cinases de fungos são mostradas no topo, demonstrando o arranjo clássico de domínio catalítico e sequências *coiled-coil* e PEST, essenciais para a atividade e regulação das proteínas NIMA de *A. nidulans*, Nim1 de *Neurospora crassa* e Fin1 de *Schizosaccharomyces pombe*. Abreviações: aa, aminoácido; *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *D. discoideum*, *Dictyostelium discoideum*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*. Extraído de O'Connel *et al.*, 2003.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a validação de proteínas humanas da família de cinases Nek como alvos para inibição do crescimento celular de linhagens imortalizadas de células humanas em cultura através da realização de ensaios *in-vitro* e *in-silico*.

2. Objetivos Específicos

2.1 Expressão heteróloga das proteínas cinases (principalmente o domínio de cinase) Nek1, Nek2, Nek6 e Nek7. Em casos em que se julgou necessário, realizou-se uma mutagênese sítio-dirigida no processo de clonagem para obtenção de proteína solúvel;

2.2 Realização de ensaios *in vitro* de estabilidade da ligação inibidor-proteína, através de ensaios de deslocamento térmico ("thermal shift assay"), a fim de realizar uma triagem inicial para posteriores ensaios de validação;

2.3 Utilização dos inibidores identificados em 2.2 em ensaios *in silico* de afinidade da ligação inibidor-proteína a fim de validar os resultados previamente obtidos;

2.4 Utilização dos inibidores identificados em 2.2 em ensaios *in vitro* a fim de validar os resultados previamente obtidos.

III. METODOLOGIA

1. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

1.1 Procedimento

A estratégia de mutagênese sítio-dirigida foi empregada para aumento da solubilidade das proteínas. Utilizou-se a enzima *PfuTurbo*® DNA polimerase, que replica ambas as fitas do plasmídeo com alta fidelidade e processividade, sem permitir a deslocação dos oligonucleotídeos mutantes. No procedimento básico, foram utilizados os plasmídeos, contendo os insertos de interesse, e dois oligonucleotídeos sintéticos, contendo a mutação desejada (Figura 1). Os oligos, complementares a fitas opostas do plasmídeo, foram estendidos pela *PfuTurbo* em reações de PCR contendo: 5µL do tampão 10X da enzima, 1,5µL de cada primer 10µM, 1µL de dNTP, 1µL de DNA (diluição 1:10) e água milliQ para volume final de 50µL; acrescentou-se depois 1,0µL de *PfuTurbo*. Estas reações foram amplificadas nas condições descritas na tabela 2.

Segmento	*Ciclos*	*Temperatura*	*Tempo*
1	1	95 ºC	30 segundos
		95 ºC	30 segundos
2	16	60 ºC	1 minuto
		68 ºC	1 minuto
3	1	68 ºC	1 minuto
		37 ºC	

Tabela 2. Ciclos de temperatura utilizados para a mutagênese sítio-dirigida.

A incorporação dos oligos gerou um plasmídeo mutante, contendo cortes nas extremidades 5'. O produto da PCR foi, então, tratado com 1µL da enzima *DpnI* (10U/µL) por uma hora a 37°C. Esta endonuclease (sequência alvo: 5'-Gm^{6}ATC-3') é específica para DNA

metilado ou semi-metilado, sendo utilizada para digerir o DNA parental molde e selecionar o DNA mutante recém-sintetizado, uma vez que o DNA isolado da maioria das cepas de *E. coli* é dam metilado, sendo suscetível à digestão por *DpnI* . De 2 a 4µL do plasmídeo mutante foram, então, transformados em *E. coli* DH5α (podendo também ser utilizadas outras cepas, como XL1-Blue), sendo os cortes nas extremidades 5' reparados pela bactéria. Procedeu-se, em seguida, à extração plasmideal para usos posteriores.

O oligonucleotídeo utilizado nesta mutagênese já se encontrava disponível em nosso laboratório, e foi utilizado com a finalidade de substituir o aminoácido Treonina por uma Alanina na posição 162 no domínio de cinase da proteína hNek8, a exemplo da mesma metodologia utilizada para expressão, purificação e cristalização da proteína hNek2. A sequência dos oligonucleotideos e suas respectivas temperaturas de anelamento encontram-se descritas na tabela abaixo.

Nome	***Sequencia***	*Tm (ºC)*
Nek8_T162A_S	5'-GAGCAAGGCCTAC**G**CGGTGGTGGGTAC-3'	83,8
Nek8_T162A_AS	5'-GTACCCACCACCG**C**GTAGGCCTTGCTC-3'	83,8

Tabela 3. Oligonucleotideos utilizados para a mutagênese sítio-dirigida nos domínio de cinase da proteína hNek8. São listados os nomes dos oligos *sense* (S) e *antisense* (AS), as suas sequëncias e os nucleotídeos mutados (negrito) em cada oligo, bem como as respectivas temperaturas de *melting* (Tm, ^{o}C)

2. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DOS DOMÍNIOS DE CINASE DAS PROTEÍNAS HUMANAS NeKs 8 E 9

2.1 Reação de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Foram utilizados oligonucleotídeos previamente desenhados pelo nosso grupo (tabela 3) para amplificação dos domínios de cinase mutados e não mutados das proteínas Nek8 e Nek9, previamente clonados em vetores de expressão.

Nome	Sequência	Tm (ºC)
Nek8KD_S	*EcoRI* *NdeI* 5'-CGGAATTCCATATCGAGAAGTACGAGCGGATCCG-3'	75,3
Nek8KD_AS	*SalI* 5'-ACGCGTCGACTTAGCAGAGGGGCTGTGCCAT-3'	76,4
Nek9KD_S	*BglII* *NdeI* 5'-GAAGATCTCTCATATCGTACATCCCCATCCGC-3'	61,1
Nek9KD_AS	*SalI* 5'-ACGCGTCGACTCAGAGAAGAGGGCGATC-3'	61,1

Tabela 4. Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos domínios de cinase (KD) das hNeks 8 e 9. São listados os nomes dos oligos *sense* (S) e *antisense* (AS), as suas seqüências, os sítios de restrição utilizados (vermelho), os códons de início (verde) e término (amarelo) da tradução, bem como as respectivas temperaturas de *melting* (Tm, ^{o}C).

As amplificações foram feitas em reações utilizando-se 2,5µL do tampão 10X da enzima, 0,5µL de cada *primer* na concentração de 10µM, 1,5µL de dNTP 5mM, 2µL de DNA (diluição 1:10), 0,5µL de Taq Platinum® High Fidelity DNA Polimerase (Invitrogen) e água milliQ para volume final de 25µL. Estas reações foram amplificadas nas condições descritas na tabela 5.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tempo
1	1	94 ºC	2 minutos
		94 ºC	1,5 minuto
2	16	58 ºC	2 minutos
		72 ºC	2 minutos
3	1	72 ºC	5 minutos
		4 ºC	

Tabela 5. Ciclos de temperatura utilizados para a amplificação dos domínios de cinase das proteínas hNek8 e hNek9.

2.2 Vetores de Clonagem e Expressão

2.2.1 Vetor de Clonagem

- pGEM-T Easy (Promega): contém 3.015pb e o nucleotídeo timina em suas extremidades, facilitando a clonagem de produtos de PCR amplificados por determinas DNA polimerases, que adicionam o nucleotídeo adenina, complementar à timina, nas extremidades 5´ e 3´ dos fragmentos. Sua presença na célula confere resistência à ampicilina. Empregado para a subclonagem de fragmentos de cDNA.

2.2.2 Vetores de Expressão em *E. coli*

- pET28a-TEV: possui uma sequência que codifica seis histidinas (cauda de histidina ou *His-tag*) presente na região N-terminal da proteína recombinante, para facilitar sua posterior purificação por cromatografia de afinidade, empregando-se resinas contendo níquel ou cobalto. A etiqueta (*tag*) N-terminal é seguida de um sítio da protease TEV para posterior clivagem. O vetor também contém o promotor T7 induzido por isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), bem como o gene que confere resistência ao antibiótico kanamicina.

- pET28a-TEV-SUMO: é idêntico ao vetor pEt28a-TEV, com o diferencial de ter inserido antes da sua região *poli-linker* uma sequência para codificação da proteína Sumo de levedura, de modo que a proteína de interesse seja expressa em fusão desta, o que lhe confere maior estabilidade.

2.3. Digestões Enzimáticas

A clivagem de sequências nucleotídicas por enzimas de restrição para a obtenção dos insertos desejados e dos vetores linearizados para as clonagens e/ou subclonagens, bem como para as análises de restrição dos clones obtidos, foram realizadas empregando-se uma unidade

da enzima de restrição em seu tampão específico, por 4h a 37ºC, seguindo-se as especificações do fabricante Fermentas.

2.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Foram utilizados géis de agarose a 1% (peso/volume) em tampão TAE (Tris-HCl 40mM; ácido acético 20mM; EDTA 1mM), também utilizado na corrida; utilizou-se uma voltagem fixa entre 50 e 100 Volts, dependendo do aparato de gel utilizado. Adicionou-se 10% do volume de *loading buffer* (azul de bromofenol 25%; sacarose 40%) nas amostras e, para a fotodocumentação, foi utilizado o sistema EDAS de fotografia e análise de imagens (Kodak).

2.5 Purificação de DNA

Para a purificação das bandas referentes aos vetores linearizados ou aos insertos digeridos, utilizou-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme especificações do fabricante.

2.6 Reação de Ligação

Através da visualização dos insertos e vetores devidamente digeridos e purificados em gel de agarose 1%, foi feita a quantificação relativa (proporção do número de moléculas vetor:inserto). As ligações foram feitas utilizando-se 2µL de tampão de ligação 10X (Fermentas), sendo 1µL (2U) de T4 DNA ligase (Fermentas), 1µL de ATP 100mM, DNA do vetor e do inserto na proporção molar vetor:inserto de 1:4 e água milliQ para volume final de 20µL. As reações foram incubadas por 24 horas, a 16°C.

2.7 Preparo de Bactérias Competentes para Transformação por Choque Térmico

O preparo de bactérias competentes foi feito pelo método de Cloreto de Rubídio (RuCl2). As cepas de *E. coli* DH5α foram cultivadas em meio Luria-Bertani-ágar (LB-ágar: extrato de

levedura 0,5%; triptona 1%; NaCl 200mM pH 7,4; bacto-ágar 1,5%) e incubadas a 37°C por 16 horas. Em seguida, uma das colônias isoladas foi inoculada em 5mL de meio PSI (extrato de levedura 1%; peptona 1,6%; NaCl 200mM; KH_2PO_4 3mM; Na_2HPO_4 2mM pH 7,6) e incubada, sob agitação de 200rpm, nas mesmas condições descritas anteriormente. Subsequentemente, esta cultura foi inoculada em 200mL de meio PSI até atingir uma D.O. a 600nm de aproximadamente 0,6. A cultura foi, então, transferida para frascos de centrífuga previamente resfriados em gelo, e centrifugada a 2.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspendidas em 25mL do tampão de transformação I (KOH 30mM; Ácido acético 30mM; $MgCl_2$ 50mM; $CaCl_2$ 10mM; $RuCl_2$ 100mM; glicerol 15% v/v pH 5,8) estéril e gelado. A suspensão foi incubada por 15 minutos no gelo e depois centrifugada a 2.000g por 15 minutos a 4°C. As bactérias foram ressuspendidas em 8mL do tampão de transformação II (MOPS 10mM; $CaCl_2$ 75mM; $RuCl_2$ 10mM; glicerol 15% v/v pH7,0) estéril e gelado. Alíquotas de 100µL em tubos de 1,5mL foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para serem posteriormente utilizadas nas transformações.

2.8 Transformação de Bactérias Competentes por Choque Térmico

Para a transformação por choque térmico, adicionou-se 1µL do plasmídeo (~100ng) ou todo o volume da ligação ao tubo contendo 100µl do estoque de bactérias competentes, previamente descongelado e mantido em gelo. As bactérias foram, então, incubadas em gelo por 30 minutos e submetidas ao choque térmico: banho a 42°C por 2 minutos e incubação em gelo por 3 minutos. Após o choque térmico, adicionou-se 800µL de meio SOC (extrato de levedura 0,5%; triptona 2%; NaCl 2mM; KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 1mM, $MgSO_4$ 1mM, glicose 20mM pH 7,0) e incubou-se a 200rpm, por 1 hora, a 37°C. Para transformações de plasmídeos, foram plaqueados 200µl desta suspensão, com o auxílio de uma alça Drigalski, em uma placa contendo os antibióticos adequados para seleção dos transformantes; no caso de transformações de ligação, a suspensão foi centrifugada a 4.000rpm por 5 minutos e ressuspendida em 200µL do próprio meio. A placa foi, então, incubada a 37°C, por aproximadamente 16 horas.

2.9 Extração de DNA Plasmideal

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos de *E. coli* DH5α através de mini-preparações (minipreps) de acordo com as metodologias descritas por Sambrook *et al*., (1989) e Ausubel *et al*., (1995) e/ou de acordo com as especificações do fabricante do kit para extração de DNA da empresa QIAgen.

2.10 Análises de Restrição dos Clones Obtidos

Após a transformação, os clones obtidos foram selecionados através da análise de restrição do DNA plasmidial com pelo menos duas enzimas diferentes. As construções plasmidiais que apresentaram o padrão esperado para a análise de restrição foram sequenciadas.

2.11 Sequenciamento dos Clones Obtidos

As reações foram feitas com o uso do reagente *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences/GE Healthcare) numa reação de 10µL, contendo 4µL de DyeTerminator, de 2 a 3pmol do *primer* (específico para cada vetor) e de 300 a 600ng de DNA plasmidial para vetores de alta cópia ou de 500 a 800ng para vetores de baixa cópia. As reações foram incubadas a 95°C por um minuto e submetidas a 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C, e 4 minutos a 60°C em termociclador *PCR System 9700* (Perkin Elmer). As amostras foram analisadas no sequenciador automático de DNA *ABI PRISM 377 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.1 Expressão em *E. coli*

As bactérias foram transformadas com os plasmídeos de expressão e submetidas a testes de otimização de expressão, variando-se o tempo de indução (de 1 a 16 horas), a temperatura de indução (18, 25 e 37 ^{o}C) e a concentração do indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) (0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM). As cepas utilizadas foram a BL21-pRARE e ΔSlyd pRARE, devido à existência de vários códons raros nas sequências das proteínas de interesse.

3.1.1 Testes de Otimização da Expressão Solúvel

Para a realização dos testes de expressão, as bactérias BL21-pRARE ou ΔSlyd pRARE, transformadas com os vetores de expressão contendo a sequência do cDNA codificador das diferentes proteínas a serem expressas, foram preinoculadas em meio Luria-Bertani (LB) ou Terrific Broth (TB), acrescido de antibiótico específico, e incubadas por 16 horas a 37°C, sob agitação constante de 200rpm. Esse cultivo foi reinoculado em meio de cultura novo, em uma diluição de 1:50, acrescido dos antibióticos pertinentes, e as bactérias foram incubadas sob as mesmas condições até atingirem a fase logarítmica de crescimento (D.O.$_{600}$ entre 0,6 e 0,8); nas induções, adicionou-se também o antibiótico clorofenicol (concentração final de 3,4mg/mL) no meio de cultura, para a seleção do plasmídeo pRARE. Na fase logarítmica, uma amostra de 1mL (amostra não-induzida) foi retirada e acrescentado o indutor de síntese proteica IPTG na concentração desejada. As bactérias foram, então, cultivadas nas temperaturas e tempos de indução a serem testados, sendo que, a intervalos de tempos sucessivos, 1mL da cultura foi coletado. As amostras foram, então, centrifugadas e submetidas à lise para a separação das frações solúvel e insolúvel.

3.1.2 Lise Bacteriana (Separação das Frações Solúvel e Insolúvel)

O *pellet* das células resultante da indução de síntese proteica foi ressuspendido em tampão de lise A (HEPES 50mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 20mM) na proporção *pellet*:tampão de 1:5. Adicionou-se o inibidor de protease PMSF para concentração final de 1mM, lisozima a 1mg/mL e DNAse a 0,1µg/mL, e as células foram incubadas por 1 hora no gelo e lisadas com 10-15 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho a 37 ^{o}C). Os lisados foram, em seguida, centrifugados a 12.000rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo (fração solúvel). No caso da lise bacteriana para volumes maiores de cultura (~1L), realizou-se 10 ciclos de sonicação do *pellet* (ressuspendido em tampão de lise A) por 1 minuto com intervalos de 0,5 segundo, ao invés dos ciclos de congelamento e descongelamento.

Os *pellets* (fração insolúvel) das amostras foram ressuspendidos em 20µL de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 250mM pH 6,8; SDS 0,8%; azul de bromofenol 0,2%; glicerol 45,5%; 2-β-mercaptoetanol 20%), e os sobrenadantes foram ressuspendidos em tampão de amostra 4X para uma concentração final de 1X. As amostras foram, então, incubadas por 15 minutos a 95°C, e centrifugadas a 12.000rpm por 1 minuto, sendo analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foram utilizados minigéis (10x9x0,05cm) constituídos de um gel de amostra de 4% e um gel de separação com 10% de poliacrilamida. Para a corrida, foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25mM; glicina 250mM; SDS 0,1%) e a amperagem foi fixada a 20mA. Para a detecção das proteínas, após a eletroforese, os géis (não utilizados para Western Blot) foram corados com Coomassie Blue R-250 0,25% (Sigma) em ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v), e descorados em solução de ácido acético 5% (v/v) e metanol 12,5% (v/v).

O padrão de peso molecular utilizado foi o *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen), constituído de 15 proteínas que apresentam um *His-tag* (que pode ser utilizado para a detecção

em Western blot), apresentando pesos moleculares totais entre 10 e 220 kDa, sendo as bandas de 20 e 50 kDa as mais proeminentes.

3.3 Western Blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese para uma membrana de polivinildifluoridina (PVDF) Immobilon-P (Millipore). A transferência foi realizada durante 90 minutos a 1mA por cm^2 de membrana/gel, utilizando-se o *Semi-Dry Blotting System* (The W.E.P. Company). A montagem da transferência, no sentido do ânodo do aparelho para o cátodo, seguiu a sequência: (1) dois papéis Whatman 3 MM embebidos em solução Ânodo I (Tris-HCl 300mM pH 10,4; metanol 10%), (2) um papel Whatman 3 MM embebido com tampão Ânodo II, (3) a membrana preincubada em metanol absoluto por 15 segundos, (4) o gel imerso em Solução Ânodo II (Tris 25mM pH 10,4; metanol 10%) por 5 minutos, (5) três papéis embebidos em tampão Cátodo (Tris-HCl 25mM pH 10,4; metanol 20%; ácido α-caproico 40mM).

Após a transferência, os sítios inespecíficos da membrana foram neutralizados com a solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó diluído em TTBS [TrisHCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM; Tween-20 0,1%]) por 16 horas a 4ºC. A membrana foi lavada com TTBS por 5 vezes de 5 minutos; o anticorpo primário foi, então, adicionado e a membrana incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo primário não ligado foi retirado por 5 lavagens de 5 minutos e o anticorpo secundário foi adicionado, incubando-se a membrana, novamente, durante 1 hora à temperatura ambiente, seguido de 5 lavagens de 5 minutos.

Para a revelação da membrana, adicionou-se uma mistura do reagente luminol (Santa Cruz Biotechnology), em câmara escura, na proporção de 1:1. A membrana foi, então, protegida entre dois plásticos e exposta ao filme de raio-X (Sigma-Kodak) por vários intervalos de tempo, com o objetivo de obter-se a melhor revelação das bandas. Após a exposição, o filme foi revelado manualmente.

3.4 Anticorpos Utilizados

Os anticorpo primário utilizado no Western Blot foi:

- anticorpo monoclonal feito em camundongo contra o *tag* de poli-histidina (anti-penta His, QIAGEN, utilizado na concentração de 0,05 µg/mL);

Os anticorpos secundários utilizados foram:

- anticorpo de cabra contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase de_rabanete (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, utilizado na concentração de 0,05 µg/mL).
- anticorpo secundário contra IgG de camundongo conjugado com peroxidases de rabanete (HRP) biotinilado (1:80000) (Dako Cytomation), seguido de incubação com Streptavidina (1:4) (Dako Cytomation). A Streptavidina é conjugada com quatro peroxidases de rabanete (HRP), o que amplifica o sinal na revelação das membranas no western blot.

3.5 Purificação das Proteínas Recombinantes

A purificação das proteína recombinantes em fusão com a cauda de 6xHis N-terminal foi realizada por cromatografia líquida, utilizando-se uma coluna de afinidade e uma de gel filtração (exclusão molecular), em aparelho HPLC *ÄKTA Purifier* (Amersham Biosciences/ GE Healthcare). Todas as soluções utilizadas foram previamente deaeradas em banho ultrassônico Modelo 2210 (Branson) por 20 minutos.

3.5.1 Coluna de Afinidade por Metal (Níquel)

A fusão com 6xHis-*tag* permite a simples purificação, via cromatografia de afinidade por metal (níquel). Deste modo, para a purificação das proteínas da fração solúvel do lisado, foi utilizada a coluna de afinidade pré-empacotada *HiTrap Chelating* de 1mL, que contém a resina *Chelating Sepharose High Performance* (Amersham Biosciences/ GE Healthcare), carregada

com níquel, segundo instruções do fabricante. Para a purificação, a coluna foi lavada com etanol 20% e água milliQ e equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) do tampão de lise A (HEPES 50 mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 20mM); a amostra a ser purificada foi, aplicada na coluna. Em seguida, a coluna foi lavada (a fim de eliminar proteínas "contaminantes" não ligadas ou fracamente ligadas à resina) com tampão de lavagem C (HEPES 50mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 1M; glicerol 5%; Imidazol 20mM) e 10 frações de 1mL foram coletadas para se avaliar a eficiência da lavagem. A coluna foi lavada com diluições do tampão de eluição B (HEPES 50mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 150mM) no tampão de lise A, fazendo com que a quantidade de Imidazol fosse gradativamente aumentada (gradiente de 0 a 100% de tampão B) e, deste modo, eluindo a proteína de interesse segundo sua afinidade à resina. A eluição foi coletada em frações de 1mL e alíquotas das frações foram analisadas por SDS-PAGE e Western blot a fim de detectar a presença da proteína de interesse.

3.5.2 Coluna de Gel Filtração (Exclusão Molecular)

Em casos que, após a cromatografia de afinidade por metal, não se obteve uma proteína suficientemente pura, procedeu-se com cromatografia de gel filtração. Para tal, utilizou-se uma coluna de gel filtração pré-empacotada HiLoad^{TM} 16/60 (GE Healthcare). Para a purificação, a coluna foi lavada com 1,2 volumes de coluna de H2O milliQ para retirada da solução de etanol 20% em que ela se encontra estocada. A coluna foi então equilibrada com uma mistura do tampão de lise A (HEPES 50 mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 20mM) e tampão de eluição B (HEPES 50mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 150mM) referente à porcentagem de mistura dessas soluções em que cada um das proteínas foi purificada na cromatografia de afinidade. Em seguida, a amostra de interesse foi injetada (obedecendo ao limite de 5ml) e eluída com 1,2 volumes de coluna da mesma solução utilizada na etapa de equilíbrio, coletando as frações de interesse.

4. ENSAIOS DE DESLOCAMENTO TÉRMICO

4.1 Procedimento

Os experimentos foram realizados segundo metodologia descrita por Niesen, Berglung & Vedadi (2007) utilizando-se o equipamento FluoDia T70 (Photon Technology International), especialmente adquirido por nosso grupo para esta série de experimentos. As reações são feitas em volume final de 20µL, em placas de 96 poços, utilizando-se proteínas na concentração final de 2µM, em tampão HEPES 10mM pH 7,5, 150mM NaCl. Os inibidores são adicionados na concentração final de 10µM a partir de soluções estoque em DMSO e o SYPRO-Orange (Molecular Probes) é adicionado como uma sonda fluorescente na diluição de 1: 1000. Com o aumento da temperatura, ocorre o desnovelamento da proteína e a consequente interação da sonda fluorescente com o seu *core* hidrofóbico, o que causa a emissão do sinal fluorescente. O filtro de emissão utilizado para o SYPRO-Orange é o de 580nM. A temperatura é aumentada em passos de 1°C/min de 5°C a 75 ^{o}C e a leitura de fluorescência é obtida a cada intervalo. As linhas de base inicial e final da inclinação da curva destas espécies fluorescentes com o aumento da temperatura são aproximadas por um ajuste linear a uma curva de Boltzmann, realizado através do programa Prism (Graphpad). Os deslocamentos térmicos observados, ΔT_m^{obs}, para cada inibidor, são calculados pela diferença entre os pontos de transição das reações "amostra" (contendo os compostos inibidores testados) e "referência" (controle, contendo a proteína sem inibidor) (Figura 10).

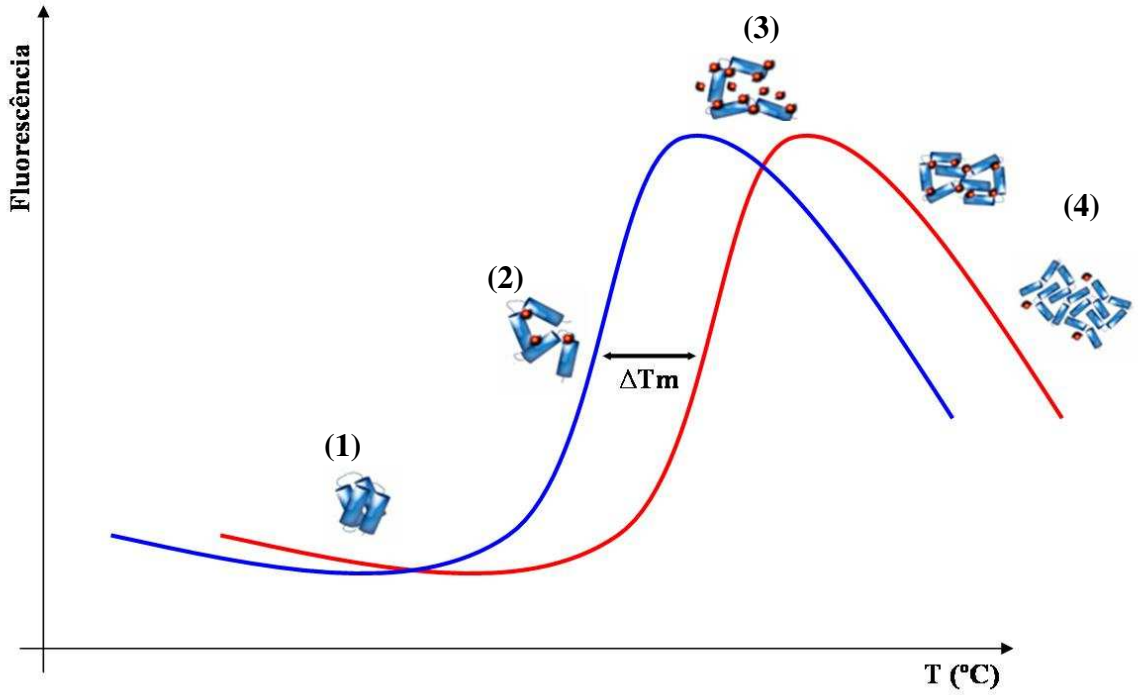


Figura 3. Representação do ensaio de deslocamento térmico. A curva sigmóide azul representa a leitura para o ensaio sem o inibidor, enquanto a curva sigmóide vermelha representa a leitura do ensaio utilizando-se os inibidores. Com o aumento da temperatura, ocorre a desnaturação da proteína (1) e associação do corante fluorescente hidrofóbico com o "core" protéico exposto, também hidrofóbico (2). Esta fluorescência alcança um pico com a desnaturação total das proteínas (3) para então diminuir com a agregação destas e dissociação do corante (4). A temperatura que corresponde ao ponto de inflexão da curva sigmóide é denominada "temperatura de melting" (Tm), e a diferença entre a Tm nas duas curvas (ΔTm) representa o deslocamento térmico. Este deslocamento representa uma medida da afinidade da associação entre o composto testado e a proteína, uma vez que, quanto maior for a força desta associação, maior será a temperatura necessária para a desnaturação da proteína.

4.2 Inibidores Utilizados

Para estes ensaios, foi utilizada a biblioteca de inibidores II da empresa EMD Calbiochem (Cat. No. 539745) (Anexo 1).

5. MODELAGEM MOLECULAR

As coordenadas atômicas da hNek2(Δ272-445)-(T175A) (PDB: 2JAV) [Rellos et al., 2007] foram usadas como *templates* para geração de um modelo estrutural da hNek1 (Δ262-1258)-(T162A) por modelagem baseada em restrição pelo programa MODELLER no servidor HHpred [Söding et al., 2005].

6. DOCKING MOLECULAR

Compostos que apresentaram um ΔT_m maior que 2°C nos ensaios de deslocamento térmico foram usados como ligantes nos ensaios de *docking* molecular com os domínios de cinase das hNeks 1, 2, 6 e 7. O modelo estrutural do ATP foi utilizado como controle para estudos *in silico,* uma vez que ele é o ligante natural das Neks humanas. As estruturas dos inibidores foram obtidas do banco de dados Pubchem do NCBI [Bolton et al, 2008]. A estrutura da hNek7wt depositada no *Protein Data Bank* (PDB: 2WQM) [Richards et al., 2009] foi utilizada neste estudo. O modelo estrutural da hNek6(S206A) utilizado foi criado por Meirelles *et al.* [Meirelles et al., 2011], e a hNek1(Δ262-1258)-(T162A) foi modelada conforme descrito anteriormente.

O software *Molegro Virtual Docker* (MVD) [Thomsen & Christensen, 2006] foi utilizado para simulações de *docking* molecular. Foi utilizada uma resolução de 0.30 Å e raio de 15 Å como sítio de ligação para cada uma das cavidades identificadas e testadas nas proteínas. O número de testes foi definido como 10 e o número máximo de interações como 1500. Após cada teste de *docking*, uma minimização de energia e otimização das ligações de hidrogênio foram realizadas para seleção das melhores poses para cada ligante.

Para analisar a viabilidade dos complexos gerados pelo MVD, estes foram enviados para análise através do software PEARLS (*Program for Energetic Analysis of Receptor–Ligand System*) [Han et al., 2006]. Este software calcula a energia de interação entre ligante e receptor considerando forças intermoleculares de Van der Waals, interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Os valores gerados por este software foram utilizados para calcular a afinidade da

interação proteína-ligante e comparação com os mesmos valores preditos para a interação entre ATP e as hNeks.

7. ENSAIOS DE ATIVIDADE DE ENZIMA CINASE

Ensaios de atividade de enzimas cinases foram realizados utilizando o protocolo do kit LANCE® *Ultra* TR-FRET (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Valores de IC_{50} foram determinados usando uma concentração de cinase que fosforila 20-50% do peptídeo substrato ULight™-labeled p70S6K (Thr389) no ATP $K_{m[aparente]}$. As concentrações de cinase e ATP que corresponderam a estas condições foram obtidas em um ensaio prévio, utilizando uma variação de concentração de cinase entre 2nM e 640nm, e uma variação da concentração de ATP entre 0 e 25 μM. A concentração final do inibidor foi 2x, 1x e 1/2x a concentração de ATP no ATP $K_{m[aparente]}$: 0,625 μM para a hNek6(S206A) e hNek7wt, e 25 μM for hNek1(Δ262-1258)-(T162A).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

A exemplo do que já foi realizado no grupo anteriormente, optou-se por seguir a mesma metodologia empregada na expressão e purificação do domínio de cinase da proteína humana Nek2. Essa proteína foi obtida para ensaios de cristalização a partir da redução da aparente toxicidade e do aumento da estabilidade da proteína recombinante através da substituição de um aminoácido no seu domínio de cinase (T175A). Portanto, procedeu-se com a mutagênese sitio dirigida para substituição do resíduo de treonina equivalente na hNek8 por uma alanina (T162A).

Através do sequenciamento e alinhamento com o programa ClustalW (EBI; http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) da região correspondente ao domínio de cinase da hNek8, foi possível identificar a substituição do aminoácido treonina por alanina na posição 162 (Figura 4).

```
Nek8_full_aa      MEKYERIRVVGRGAFGIVHLCLRKADQKLVIIKQIPVEQMTKEERQAAQNECQVLKLLNH 60
Nek8_seq_aa       ------IRVVGRGAFGIVHLCLRKADQKLVIIKQIPVEQMTKEERQAAQNECQVLKLLNH 54
                        ******************************************************

Nek8_full_aa      PNVIEYYENFLEDKALMIAMEYAPGGTLAEFIQKRCNSLLEEETILHFFVQILLALHHVH 120
Nek8_seq_aa       PNVIEYYENFLEDKALMIAMEYAPGGTLAEFIQKRCNSLLEEETILHFFVQILLALHHVH 114
                  ************************************************************

Nek8_full_aa      THLILHRDLKTQNILLDKHRMVVKIGDFGISKILSSKSKAYTVVGTPCYISPELCEGKPY 180
Nek8_seq_aa       THLILHRDLKTQNILLDKHRMVVKIGDFGISKILSSKSKAYAVVGTPCYISPELCEGKPY 174
                  ****************************************:*******************
```

Figura 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos da hNek8 utilizando-se o programa ClustalW. Número de acesso do GenBank (NCBI) das sequência utilizada: hNek8 (AAP04006.1). *Nek8_full_aa* corresponde à sequência nativa da proteína, enquanto *Nek8_seq_aa* corresponde à sequencia mutada. Verifica-se neste a substituição do aminoácido treonina por alanina na posição 162 da sequência proteica, assinalada em amarelo na figura.

2. TESTES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CLONADAS EM pET28a-TEV

Nos testes de expressão, foram utilizadas construções dos domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9 clonadas em pET28a-TEV (pET28a-TEV-Nek8KD-T162A e pET28a-TEV-Nek9KD-T210A, respectivamente). Não foram testadas as hNeks 1 e 2, pois as mesmas já possuíam condições de expressão descritas anteriormente pelo nosso grupo. As condições testadas estão descritas na tabela abaixo.

Construções	**Temperatura/ Concentração IPTG**	**Cepa *E.Coli***	**Meio de Cultura**
Nek8KD-T162A-pET28-TEV	18ºC/1mM IPTG	Bl21 pRARE	TB
Nek9KD-T210A-pET28-TEV	37ºC/0,5mM IPTG	ΔSlyD pRARE	LB

Tabela 6. Condições testadas para expressão dos domínios de cinase mutados das proteínas hNek8 e hNek9.
Total de condições testadas nesta etapa: 16 condições.

Foram coletadas amostradas para os tempos 0h, 1h e 4h, e procedeu-se com a lise bacteriana em nitrogênio líquido e separação das frações solúvel e insolúvel. Aplicou-se as amostras em um gel de poliacrilamida 12,5% e em seguida realizou-se um western blot para verificar se houve a expressão das proteínas de interesse (Figura 5).

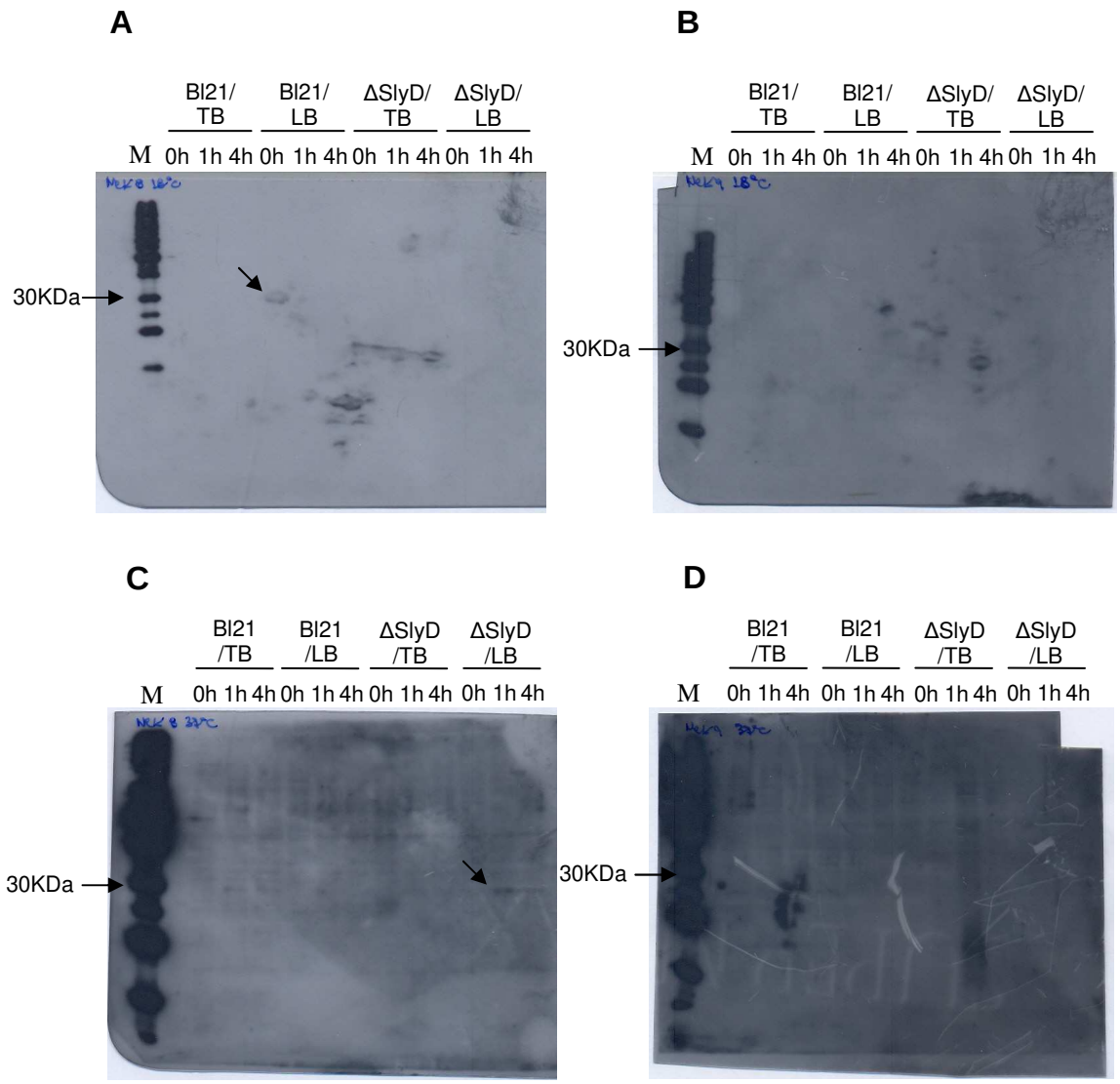
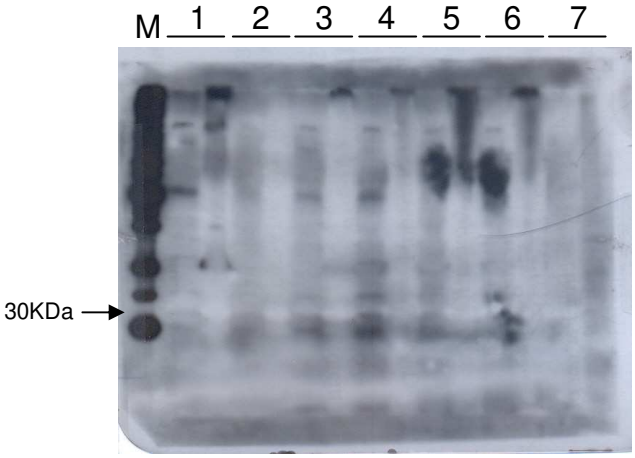


Figura 5. Teste de expressão dos domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9. *A e B:* Testes realizados a 18ºC para os domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9, respectivamente. *C e D:* Testes realizados a 37ºC para os domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9, respectivamente. As amostras exibidas aqui correspondem apenas às frações solúveis das proteínas. Na figura A, é possível verificar uma banda correspondente a amostra da hNek8 coletada antes da adição de IPTG (0h) utilizando a cepa Bl21 pRARE em meio LB (indicada por uma seta). Na figura C, verifica-se uma banda correspondente a amostra coletada da hNek8 após 1h de indução utilizando-se a cepa ΔSlyD pRare em meio LB (indicada por uma seta). *M:* marcador de peso molecular.

Verificou-se uma expressão basal da hNEK8 em Bl21 pRARE e meio LB (Figura 3.A), no entanto, a mesma não ocorreu nos demais testes, conforme seria esperado. Também se observou a expressão da hNEK8 transformada em ΔSlyD pRARE e utilizando meio LB com 0,5mM de IPTG após 1 hora de indução. Outras bandas mais fracas que poderiam indicar possíveis indícios de expressão também foram observadas. A fim de comprovar isto, estas amostras promissoras foram reaplicadas em um novo gel e um novo western blot foi realizado. No entanto, nenhuma expressão solúvel das proteínas foi verificada (Figura 6).



	Construção	Condição
1	Nek8KD-T162	18ºC/Bl21 pRARE/TB/4h
2	Nek8KD-T162	18ºC/Bl21 pRARE/LB/4h
3	Nek8KD-T162	18ºC/Bl21 pRARE/LB/4h
4	Nek9KD-T210A	18ºC/ ΔSlyD pRARE /TB/4h
5	Nek8KD-T162	37ºC/Bl21 pRare/TB/4h
6	Nek8KD-T162	37ºC/ ΔSlyD pRARE /TB/1h
7	Nek9KD-T210A	37ºC/ ΔSlyD pRARE /TB/4h

Figura 6. Repetição do western blot para as condições promissoras encontradas no primeiro teste de expressão. As amostras estão identificadas pela tabela ao lado. Para cada uma delas, foram aplicadas duas colunas, sendo a primeira correspondente à fração solúvel e a segunda à insolúvel. *M:* marcador de peso molecular. *KD:* Kinase Domain.

Dado a importância do íon magnésio (Mg^{2+}) como cofator para proteínas cinases, optou-se por realizar um teste de expressão utilizando meios contendo $MgSO_4$ nas concentrações de 10mM e 20mM. Realizou-se nesta etapa também um teste com o anticorpo secundário biotinilado e a Streptavidina (Dako Cytomation), visando à amplificação do sinal ao revelar a membrana. No entanto, não houve revelação do marcador de peso molecular, bem como não foram observadas diferenças entre os diferentes tempos de indução.

Os testes com meios contendo $MgSO_4$ foram repetidos mais uma vez (desta vez apenas com a concentração de 10mM), levando em consideração apenas duas condições onde verificou-se expressão previamente, ainda que muito baixa (uma das condições foi descrita no relatório de iniciação da aluna Jéssica Santana Bernachi, onde foi apresentada uma condição

onde é possível expressar a hNek9). Optou-se desta vez, além da lise com nitrogênio líquido, utilizar também a lise das amostras com lisozima, na concentração final de 300µg/ml. As condições testadas e os resultados obtidos estão ilustrados na figura abaixo.

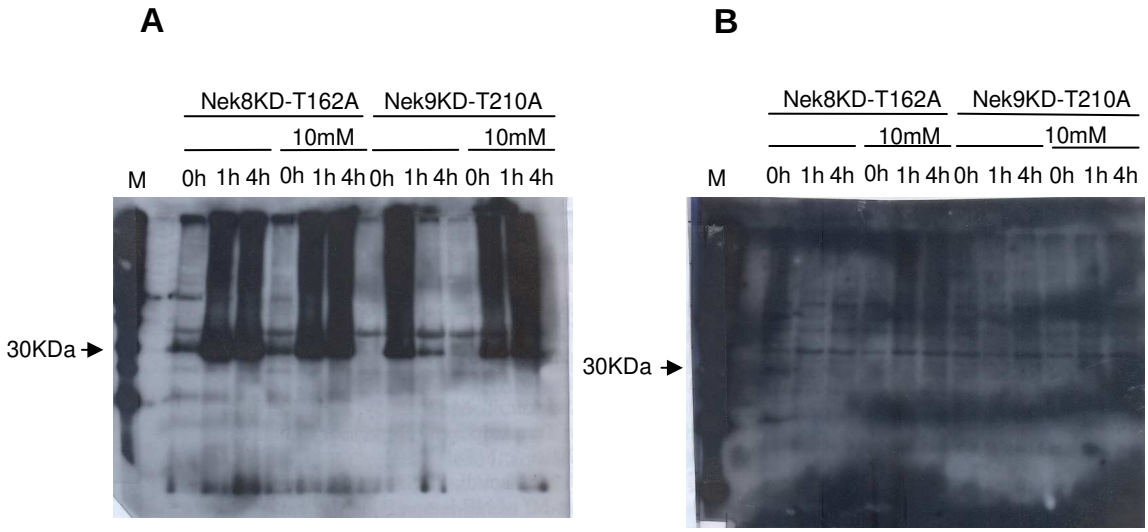


Figura 7. Teste de expressão para os domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9, utilizando duas condições de expressão onde observou-se expressão previamente. As amostras foram separadas em frações solúveis (A) e insolúveis (B). As condições testadas para as hNeks 8 e 9 foram, respectivamente: Nek8KD-ΔSlyD-LB-37ºC-0,5mM IPTG (condição observada no primeiro teste de expressão descrito neste relatório, Figura 3.) e Nek9KD-ΔSlyD-LB-37ºC-0,5mM IPTG (condição descrita no primeiro relatório de iniciação científica da aluna Jéssica Santana Bernachi). *M:* marcador de peso molecular.

Não se observou expressão solúvel das hNeks 8 e 9 nas condições descritas. Toda a proteína encontra-se na forma insolúvel.

3. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DOS DOMÍNIOS DE CINASE DAS PROTEÍNAS HUMANAS NeKs 8 E 9 em pET28a-TEV-SUMO

Dada a impossibilidade de obter uma expressão considerável das proteínas de interesse, optou-se por realizar a clonagem dos cDNAs dos domínios de cinase mutados das hNeks 8 e 9 em um outro vetor, pET28a-TEV-SUMO, o qual possui uma sequência para codificação da

proteína Sumo em fusão com a proteína de interesse. Testes de expressão realizados pelo grupo de cristalografia do nosso laboratório têm demonstrado bons resultados utilizando este vetor, onde foi verificado um aumento da solubilidade das proteínas de interesse em fusão com Sumo.

Realizou-se, portanto, a clonagem dos domínios de cinase mutado e não mutado das hNeks 8 e 9 neste vetor, conforme esquematizado na figura abaixo.

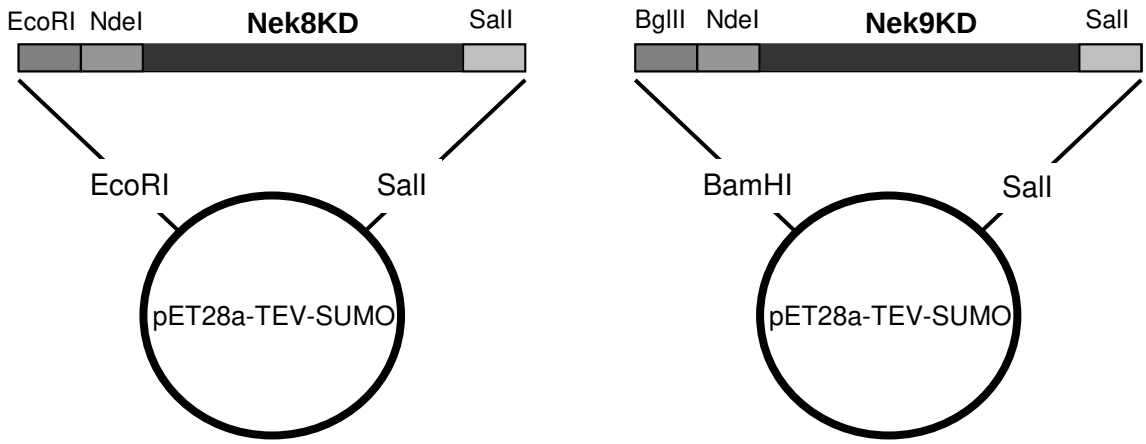


Figura 8. esquematização da subclonagem dos domínios de cinase mutado e não mutado das hNeks 8 e 9. Utilizou-se o vetor pET28a-TEV-SUMO para expressão das proteínas de interesse em fusão da proteína Sumo, visando aumento da solubilidade das mesmas. *KD:* Kinase Domain.

Para tal, realizou-se uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação dos fragmentos correspondentes aos domínios de cinase mutado e não mutado das hNeks 8 e 9 clonadas em pET28a-TEV utilizando-se os primes Nek8KD_S, Nek8KD_AS, Nek9KD_S e Nek9KD_AS. A subclonagem em pET28a-TEV-SUMO foi confirmada através de uma digestão enzimática nos respectivos sítios utilizados e através de sequenciamento de DNA.

4. TESTES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CLONADAS EM pET28a-TEV-SUMO

Com as construções devidamente subclonadas no novo vetor de expressão, repetiu-se os testes de expressão para os domínios de cinase mutado e não mutado das hNeks 8 e 9, com as condições descritas na tabela abaixo.

Construções	Temperatura/ Concentração IPTG	Cepa *E.Coli*	Meio de Cultura
Nek8KD-pET28-TEV-SUMO Nek9KD-pET28-TEV-SUMO	18ºC/1mM IPTG	Bl21 pRARE	LB
Nek8KD-T162A-pET28-TEV-SUMO Nek9KD-T210A-pET28-TEV-SUMO	37ºC/0,5mM IPTG	ΔSlyD pRARE	TB

Tabela 7. Condições testadas para expressão dos domínios de cinase mutados e não mutados das proteínas hNek8 e hNek9. Total de condições testadas nesta etapa: 32 condições.

Primeiramente, realizou-se um teste de expressão utilizando apenas as construções transformadas em Bl21 pRARE e meio LB (Figura 9).

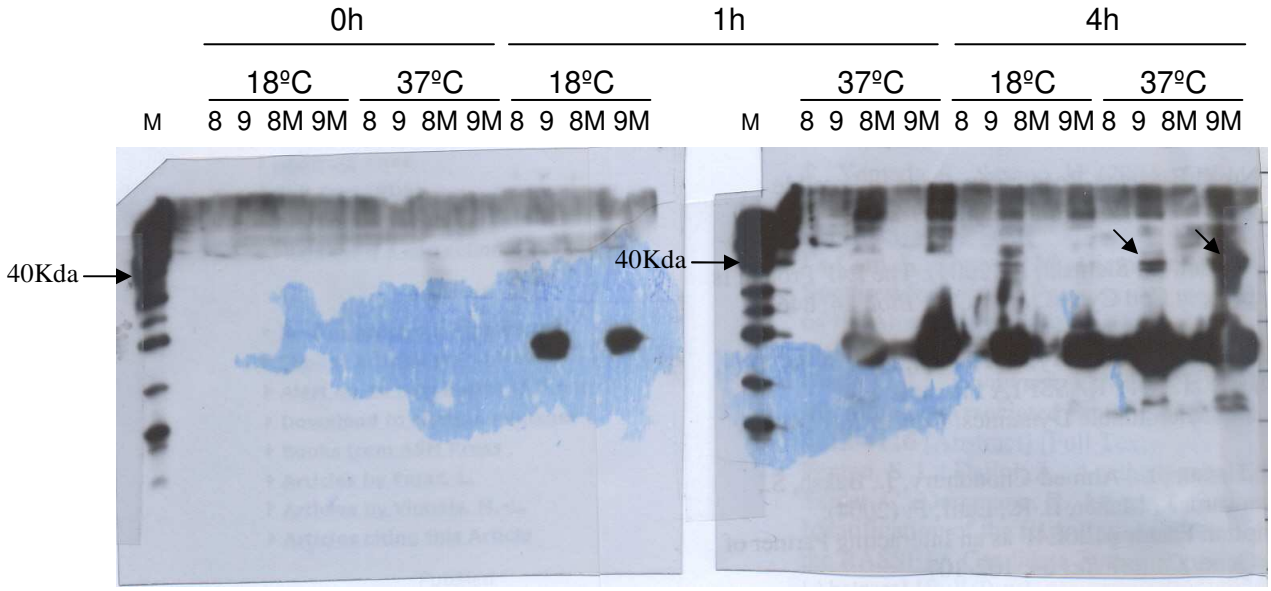


Figura 9. Teste de expressão dos domínios de cinase mutados e não mutados das hNeks 8 e 9 clonados em pET28a-TEV-SUMO. *8* e *9*: domínios de cinase não mutados das hNek 8 e 9, respectivamente; *8M* e *9M*: domínios de cinase mutados das hNek 8 e 9, respectivamente. As setas assinalam onde se observa a expressão do domínio de cinase mutado e não mutado da hNek9, com um tamanho aproximado de 40KDa, devido da expressão da proteína em fusão com a proteína Sumo. *M:* marcador de peso molecular.

Observou-se a expressão tanto do domínio de cinase mutado quanto do não mutado da hNek9 após 4 horas de indução a 37ºC, com tamanho aproximado de 40 KDa (devido a expressão da proteína em fusão com a proteína Sumo). Dado o resultado positivo obtido para a

hNek9, procedeu-se com os testes para as demais condições a serem testadas para a hNek8 (Figura 10).

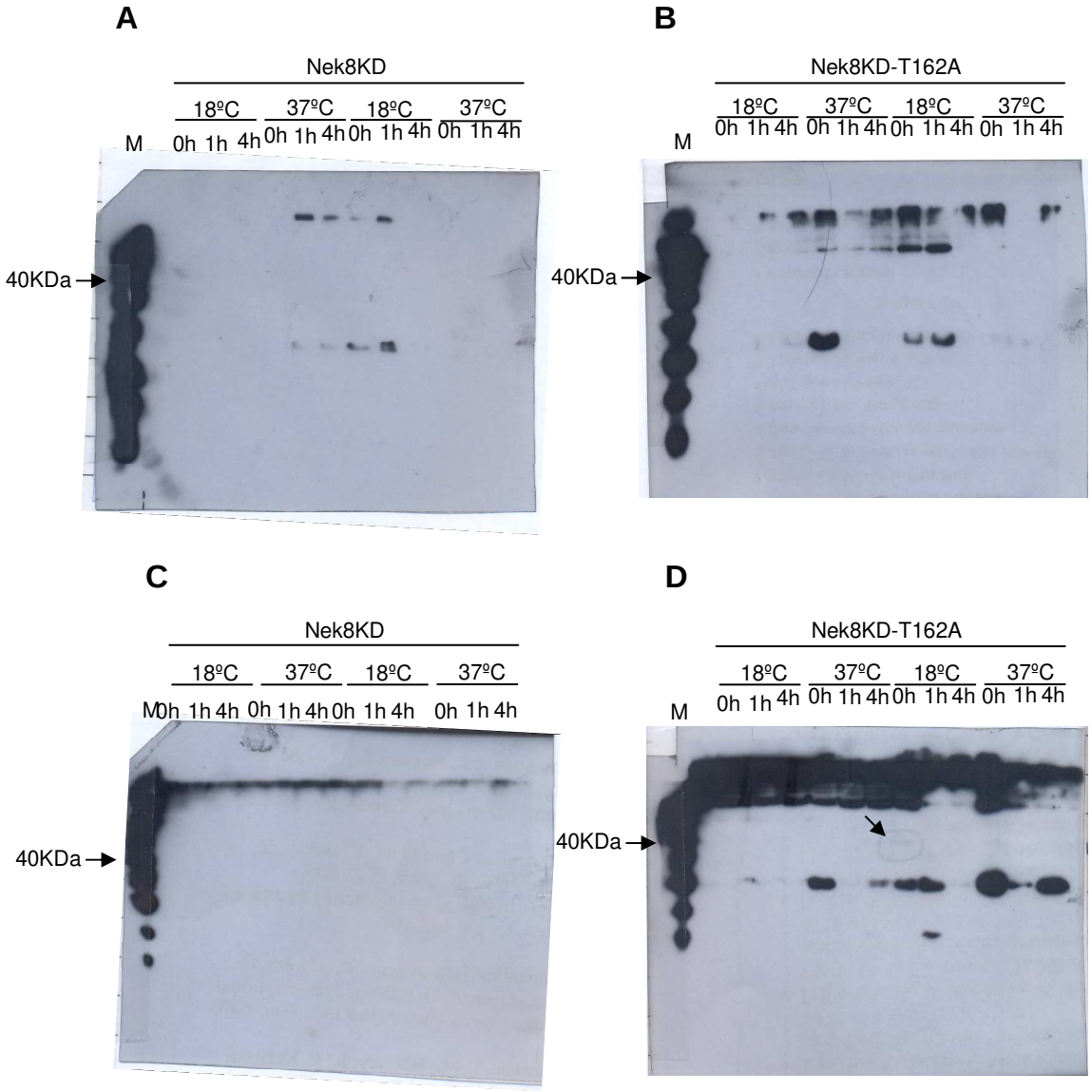


Figura 10. Testes de expressão do domínio de cinase mutado e não mutado da hNek8 clonado em pET28a-TEV-SUMO. A e B: Testes realizados em Bl21 pRare nos meios LB e TB, respectivamente. C e D: Testes realizados em ΔSlyD pRARE nos meios LB e TB, respectivamente. A seta indica uma baixa expressão da proteína que, embora no tamanho esperado, ocorre antes da indução da expressão. *M:* marcador de peso molecular.

Não foi possível encontrar uma condição ótima para expressão do domínio de cinase da hNek8. Optou-se por prosseguir com a etapa de expressão e purificação em larga escala das proteínas com as condições de expressão já definidas para dar continuidade aos demais ensaios do projeto.

5. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

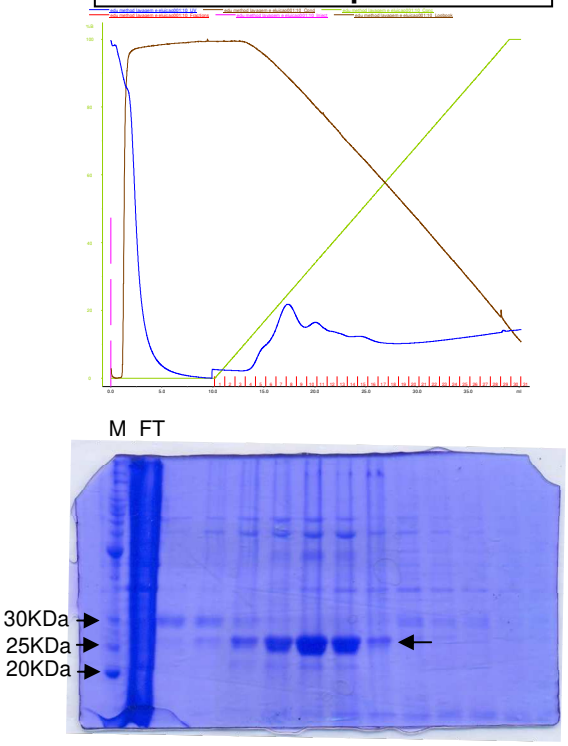
As condições de expressão para dos domínios de cinase mutados de Nek1 e Nek2 foram definidas previamente pelo nosso grupo. Todas as condições de expressão estão descritas na tabela abaixo.

Construções	Meio de Cultura	Tempo de Indução	Temperatura/Concentração IPTG	Cepa E.Coli
Nek1KD-T162A-pET28a-TEV	TB	4h	18ºC/1mM IPTG	Bl21 pRARE
Nek2KD-T175A-pET28a-TEV	LB ou TB	4h	18ºC/1mM IPTG	Bl21 pRARE
Nek9KD-pET28a-TEV-SUMO	LB	4h	37ºC/1mM IPTG	Bl21 pRARE
Nek9KD-T210A-pET28a-TEV-SUMO	LB	4h	37ºC/0,5mM IPTG	Bl21 pRARE

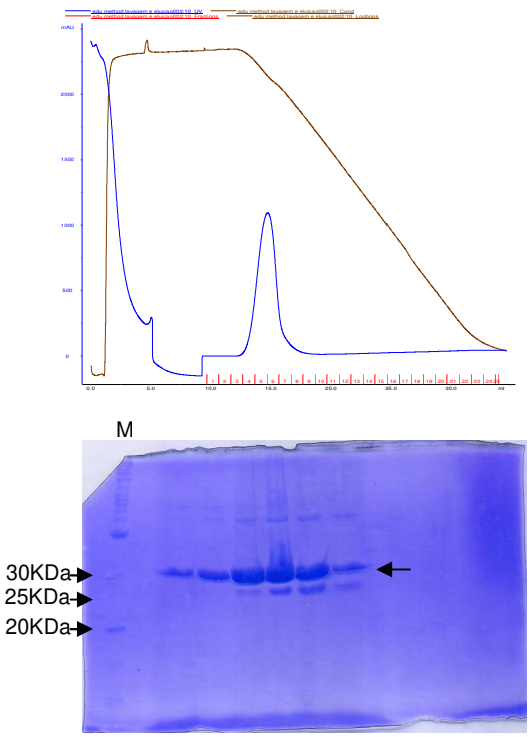
Tabela 8. Descrição das condições de expressão dos domínios de cinase das hNeks 1, 2 e 9.

Durante a purificação por afinidade, realizou-se um gradiente de concentração da solução de eluição B (HEPES 50mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 150mM) em relação à solução de lise A (HEPES 50 mM pH 7,5; fosfato de sódio 5mM; NaCl 300mM; glicerol 5%; Imidazol 20mM). Em geral, para todas as construções expressas, o gradiente de eluição encontrado foi de cerca de 30% da solução de eluição B, obtendo as proteínas purificadas conforme mostrado na figura a seguir (Figura 11).

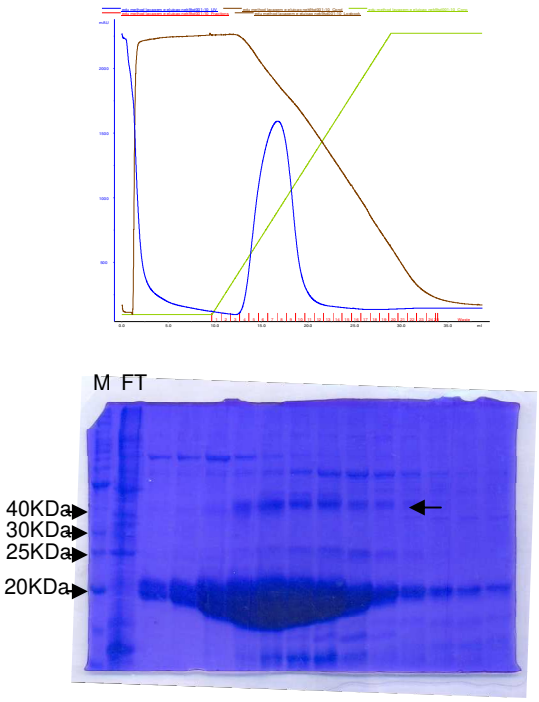
Nek1KD-T162A-pET28a-TEV



Nek2KD-T175-pET28a-TEV



Nek9KD-pET28a-SUMO-TEV



Nek9KD-T210A-pET28a-SUMO-TEV

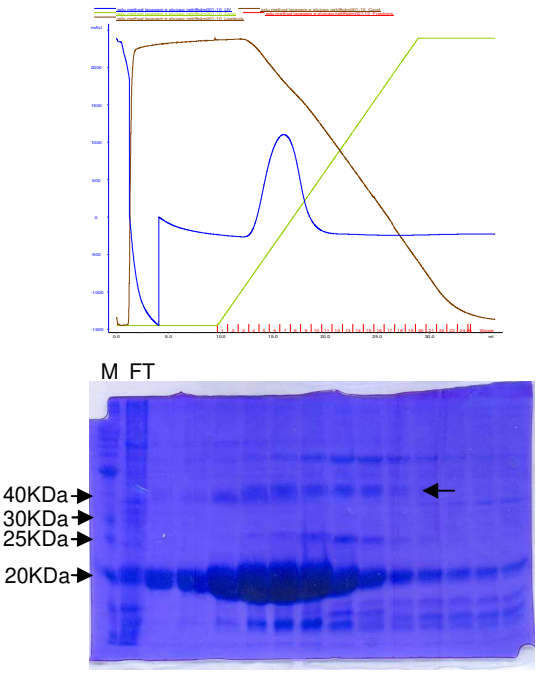


Figura 11. Expressão e purificação em coluna de afinidade dos domínios de cinase mutados das hNeks 1, 2 e 9 e do domínio de cinase não mutado da hNek9. As amostras foram eluídas com cerca de 30% de concentração da solução de eluição B na solução de lise A. As proteínas de interesse estão indicadas e cada figura por uma seta, e são correspondentes à região de pico nos respectivos gráficos (curva em azul). *M:* marcador de peso molecular, *FT: Flow Through.*

Em casos que, após a purificação por coluna de afinidade, não se obteve uma amostra suficientemente pura, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) a fim de se obter uma amostra apenas com a banda correspondente à proteína de interesse.

6. ENSAIOS DE DESLOCAMENTO TÉRMICO

De posse das proteínas purificadas, procedeu-se com a montagem da placa de 96 wells contendo os inibidores a serem testados. O inibidor A12 (SU11652) não faz parte da biblioteca utilizada. Este inibidor foi utilizado para a obtenção da estrutura do domínio de cinase da hNek2 [Rellos *et. al.*, 2007]. Um esquema completo com todos os inibidores utilizados pode ser encontrado na tabela anexa (anexo 1).

Os compostos utilizados foram os contidos na biblioteca *InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library II* (Calbiochem), contendo 80 inibidores alvos de Ser/Thr cinases (portanto, inibidores clássicos do Tipo I), além de outros compostos, tais como AMP, ADP, ATP, ATP-g-S. A triagem de inibidores foi realizada para as proteínas recombinantes hNek1(Δ262-1258)-(T162A), hNek7wt, além de hNek2(Δ272-445)-(T175A), a fim de comparação de resultados. Um ensaio de deslocamente térmico já havia sido previamente realizado por Meirelles *et al.* para a hNek6(S206A), identificando o composto E04 como sendo capaz de provocar um deslocamento térmico significativo (ΔT_m = 6.5°C) [Meirelles et al., 2010]. Esse resultado foi considerado neste trabalho para análises posteriores. Para a hNek1(Δ262-1258)-(T162A), o ensaio de deslocamento térmico, o composto de maior relevância encontrado foi o E08 (ΔT_m = 4.0°C). Já para a hNek7wt e para a hNek2(Δ272-445)-(T175A), vários compostos com T_m significativo: B03 (ΔT_m = 7.9°C), B08 (ΔT_m = 4.2°C), E03 (ΔT_m = 4.3°C), E04 (ΔT_m = 8.3°C), E07 (ΔT_m = 9.7°C), E10 (ΔT_m = 4.9°C), F02 (ΔT_m = 5.3°C),

F04 (ΔT_m = 8.8°C), G05 (ΔT_m = 4.4°C) e H04 (ΔT_m = 11.5°C) para a hNek7wt; e A09 (ΔT_m = 4.0°C), A12 (ΔT_m = 9.6°C), E08 (ΔT_m = 4.8°C), F04 (ΔT_m = 5.4°C) e F11 (ΔT_m = 4.2°C) para a hNek2(Δ272-445)-(T175A). Outros compostos que apresentaram um ΔT_m >2ºC também foram considerados (tabela 9) e analisados nos ensaios seguintes.

7. DOCKING MOLECULAR

Foi realizado um *docking* molecular *in silico* visando identificar a afinidade dos inibidores com ΔT_m >2°C identificados nos ensaios de deslocamento térmico para as hNeks 1, 2, 6 e 7. A relevância dos resultados de energia de ligação encontrados se deu por comparação com a afinidade encontrada entre os complexos ATP-proteína utilizando as estruturas cristalográficas de hNek2(Δ272-445)-(T175A) (PDB: 2JAVs foram usados para estipular um valor de corte para seleção dos compostos com base nas energias de ligação encontradas. Uma vez que a energia total de ligação entre ATP e as proteínas hNek2(Δ272-445)-(T175A) e hNek7wt foram, respectivamente, -12,84 kcal/mol e -14.88 kcal/mol, foi considerados os compostos que apresentaram uma afinidade de ligação de pelo menos -11 kcal/mol.

Análises com o software Molegro indicam quatro possíveis cavidades para a ligação de compostos (denominadas C1, C2, C3 e C4) com volumes de 191,0, 79,4, 47,1 e 33,8 para a hNek2(Δ272-445)-(T175A) e 84,5, 59,5, 55,8 e 53,2 para a hNek7wt. A cavidade 1 (C1) inclui o sítio de ligação de ATP em ambos os casos. Apenas 5 dos 17 compostos que apresentaram um deslocamento térmico significante ($\Delta T_m \geq 4$°C) mostraram também um resultado relevante de energia de ligação (E ≤ -11 kcal/mol) no sítio de ligação do ATP (Tabela 9). É interessante ressaltar que isto ocorreu apenas nas Neks com estrutura cristalográfica resolvida, devido provavelmente à dificuldade de modelagem molecular das proteínas que não possuem estrutura resolvida, por conta das diferenças entre as Neks.

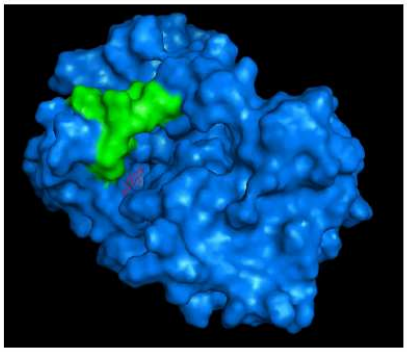
De maneira semelhante, 8 dos 15 compostos com deslocamentos de T_m entre 2°C and 4°C apresentaram também resultados significativos de energia de ligação, o que sugere que um deslocamento de T_m acima de 2ºC pode ser uma medida confiável para indicar a estabilidade da ligação destas proteínas na presença desses compostos (Tabela 9). Outro fato interessante é que

três outros compostos que apresentaram um deslocamento significativo de T_m mostraram também bons resultados em outras cavidades (inibidor A12 na cavidade 3 de hNek2(Δ272-445)-(T175A), inibidor E07 na cavidade 3 e inibidor G05 na cavidade 4 de hNek7wt) (Tabela 1), o que os classificariam como inibidores do tipo II.

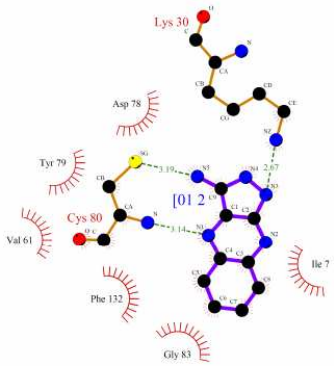
A Figura 12 mostra o *docking* de possíveis inibidores nos sítios de ligação de ATP de hNek1(Δ262-1258)-(T162A), hNek6(S206A) e hNek7wt, com base nos valores de energia de ligação encontrados no ensaio *in silico* de *docking* molecular e nos ensaios de atividade de enzima cinase, que serão discutidos na próxima seção.

NEK1

A

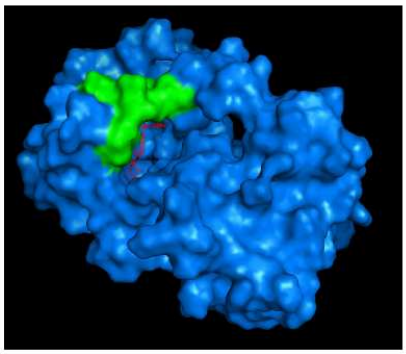


B

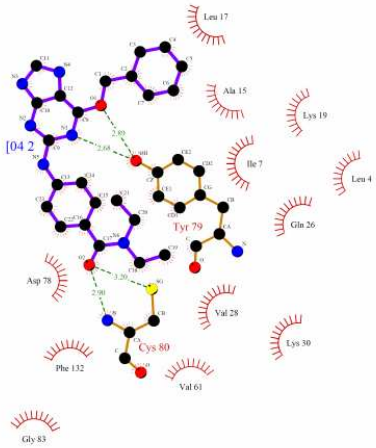


b09

C

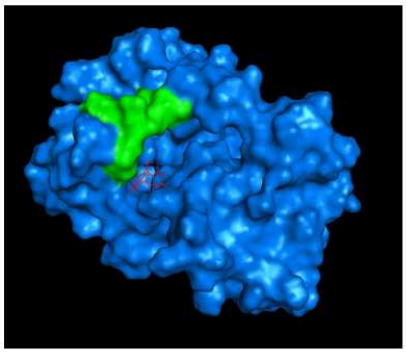


D

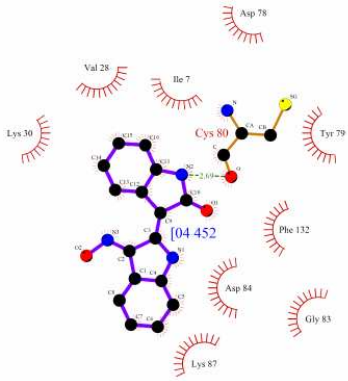


c09

E

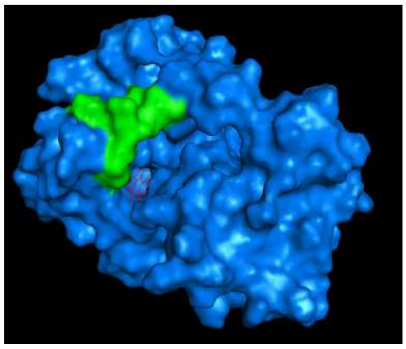


F

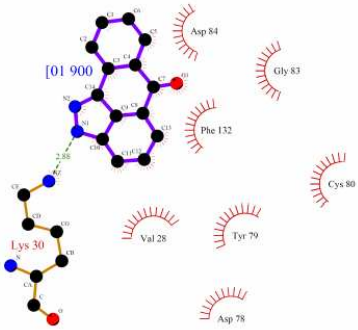


d09

G



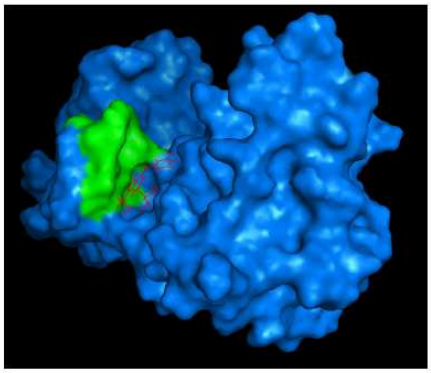
H



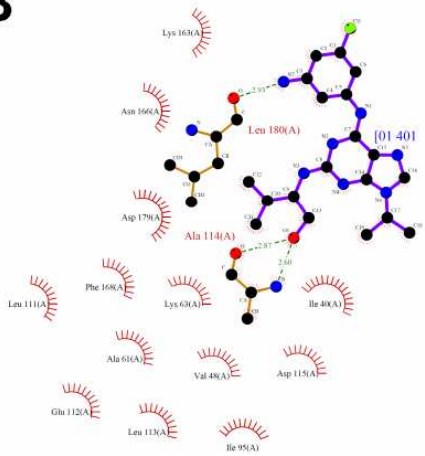
e08

NEK7

A

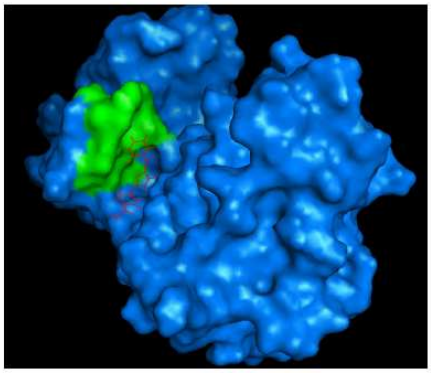


B

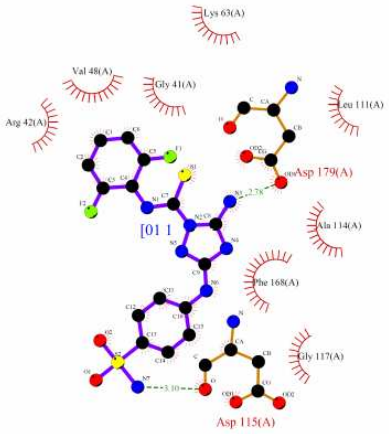


a09

C

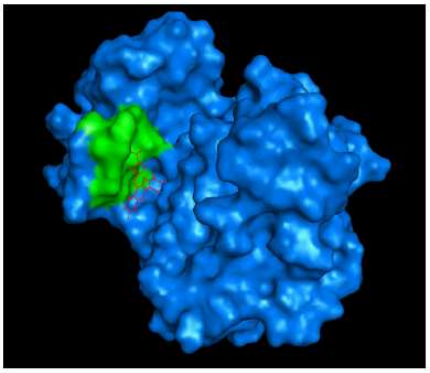


D

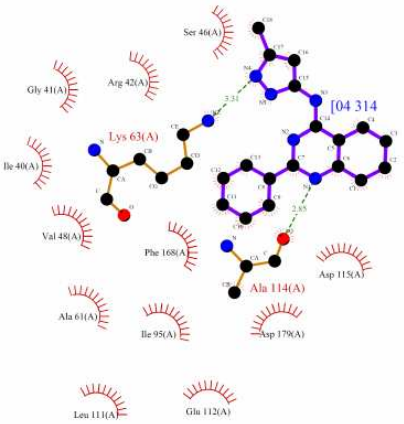


b08

E



F



d08

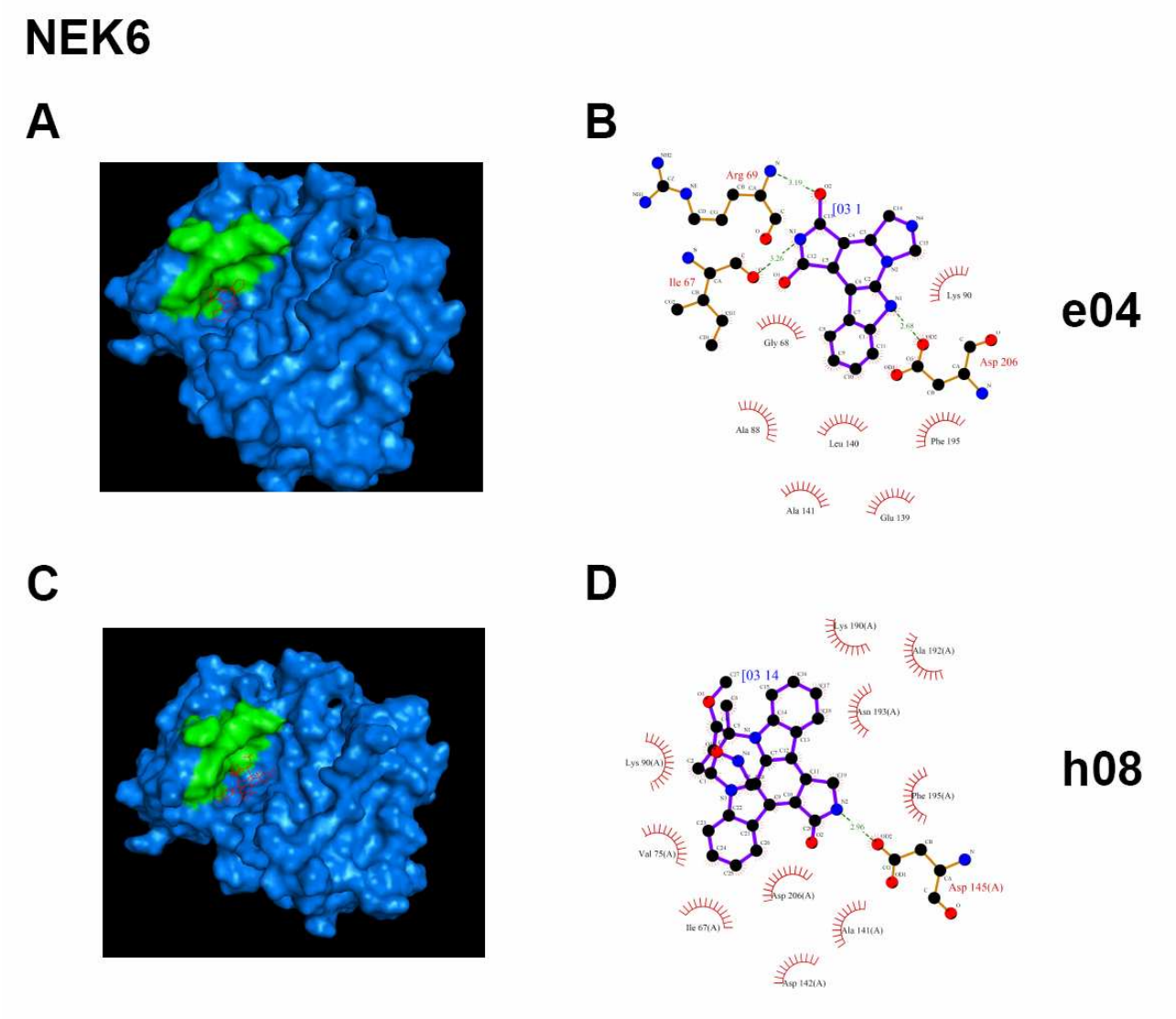


Figura 12. Docking molecular de compostos selecionados para as Neks humanas 1, 6 e 7. Os painéis à esquerda mostram as estruturas 3D de seus domínios cinase (modelos desenvolvidos por homologia para as hNeks 1 e 6) se ligando aos compostos cuja ligação mostrou maior afinidade nos ensaios de *docking in silico*. Os sítios de ligação de ATP estão destacados em verde. Os painéis à direita mostram as ligações eletrostáticas entre cada uma das cinases e seus ligantes. Estes compostos foram selecionados com base nos ensaios *in silico* de *docking* e nos ensaios *in vitro* de atividade de enzimas cinases.

8. ENSAIOS DE ATIVIDADE DE ENZIMA CINASE

A fim de confirmar se os compostos previamente selecionados nos ensaios de deslocamento térmico poderiam também inibir a atividade das enzimas cinases, ensaios *in vitro* de atividade destas enzimas foram realizados. Conforme esperado, o composto E04 (Isogratulatimide), que apresentou no ensaio de deslocamento térmico para a hNek6(S206A) um deslocamento de T_m significativo (ΔT_m = 6.5^{o}C), foi capaz de reduzir a atividade desta cinase para 50.5% com um IC_{50} próximo de 1.25 μM. Resultados esperados foram também os dos compostos B08 (Cdk 1/2 Inhibitor) e E03 (GSK-3 Inhibitor XII) para a hNek7wt (com ΔT_m = 4.2^{o}C and 4.3 ^{o}C, respectivamente). B08 foi capaz de reduzir a atividade desta cinase para 33,5% (626nM) e 26,4% (312,5nM) e E03 foi capaz de reduzir a atividade para 46,3% (1,25 μM) e 43,3% (312,5 nM).

Embora não mostrando um deslocamento de T_m acima de 4ºC, dois outros compostos foram também efetivos na redução da atividade da hNek7: A09 (ΔT_m = 3.0^{o}C) e D08 (ΔT_m = 3.3^{o}C), que foram capazes de reduzir a atividade da hNek7 para 35,9% (625nM) e 44,3% (315,5nM), respectivamente. Entre todos os compostos, B08 mostrou o maior potencial de inibição para a hNek7. hNek1(Δ262-1258)-(T162A) também teve sua atividade reduzida para 54.2%, no entanto na presença de 50 μM do composto B09 (Cdk 1/5 Inhibitor), uma concentração maior se comparado ao resultado obtido para as outras cinases utilizadas, sendo que apresentou um ΔT_m de apenas 2,2ºC (Figura 13, Tabela 9). No entanto, também foi utilizada uma maior quantidade desta cinase neste experimento, conforme determinado no ensaio prévio para definir as concentrações de enzima e ATP a serem utilizadas.

Compound Reference	hNek1(Δ262-1258)-(T162A)								hNek2(Δ272-445)-(T175A)							
	ΔT_m (°C)	Binding Energy (kcal/mol)				Percent Phosphorylation (%)			ΔT_m (°C)	Binding Energy (kcal/mol)				Percent Phosphorylation (%)		
		C1	C2	C3	C4	2x	1x	1/2x		C1	C2	C3	C4	2x	1x	1/2x
a06																
a09	2.5	-10.8	-10.6			108.0	145.6	131.6	4.0	-12.3	-9.2	-11.4				
a10									2.5	-9.1	-10.1	-12.0				
a11	3.6	-12.4	-9.7			110.3	114.9	169.8								
a12									9.6	-9.9	-10.9	-11.0				
b03																
b08	2.6	-10.8	-10.6			108.3	133.3	153.1								
b09	2.2	-9.2	-9.7			54.2	80.6	112.0								
c09	3.1	-14.0	-12.5			80.6	102.6	123.6								
d08																
d09	3.5	-12.7	-7.5			67.2	108.6	157.0								
e03																
e04																
e07																
e08	4.0	-9.9	-8.4			71.5	87.3	111.5	4.8	-8.5	-6.0	-8.2				
e10																
f02																
f04									5.4	-13.9	-11.3	-10.1				
f10									2.1	-11.7	-9.6	-11.0				
f11									4.2	-15.1	-3.9	-11.6				
g05																
g08									2.3	-13.0	-11.1	-10.9				
h04																
h08																

Compound Reference	hNek6(S206A) ΔT_m (°C)	Binding Energy (kcal/mol) C1	C2	C3	C4	Percent Phosphorylation (%) 2x	1x	1/2x	hNek7 ΔT_m (°C)	Binding Energy (kcal/mol) C1	C2	C3	C4	Percent Phosphorylation (%) 2x	1x	1/2x
a06	2.5	-12.4	-11.9			109.7	97.4	98.7								
a09									3.0	-9.9	-10.3	-11.9	-8.1	41.0	35.9	64.4
a10																
a11																
a12																
b03									7.9	-11.1	-10.4	-12.2	-10.6	109.6	80.7	57.9
b08									4.2	-9.2	-10.1	-9.3	-8.4	64.5	33.5	26.4
b09																
c09																
d08									3.3	-8.0	-8.5	-8.6	-10.6	58.1	47.5	44.3
d09																
e03									4.3	-9.6	-8.7	-9.2	-8.4	46.3	114.2	43.3
e04	6.5	-8.9	-9.8			50.5	74.9	100.2	8.3	-8.5	-7.3	-9.0	-8.7	127.2	93.1	82.1
e07									9.7	-9.3	-8.7	-11.0	-9.8	76.0	103.4	124.5
e08									2.6	-8.7	-5.2	-7.6	-8.3	164.8	97.2	87.5
e10									4.9	-8.0	-9.1	-10.3	-10.7	138.8	108.4	89.6
f02									5.3	-10.0	-10.0	-9.8	-10.7	182.4	74.2	133.4
f04									8.8	-11.3	-10.6	-8.0	-11.7	186.8	150.1	68.9
f10																
f11																
g05									4.4	-10.1	-9.6	-10.9	-12.0	171.3	162.0	148.6
g08																
h04									11.5	-9.5	-10.9	-4.8	-10.6	156.8	131.3	133.1
h08	2.1	-11.2	-8.0			97.9	86.7	106.3	3.2	-10.2	-9.7	-3.7	-8.6	68.6	107.3	130.6

Tabela 9. Resumo das temperaturas de deslocamento (ΔT_m), energias de ligação entre ligantes e proteínas e porcentagem de fosforilação para as hNeks 1, 2, 6 e 7 na presença dos compostos selecionados na triagem inicial de compostos através de ensaios de deslocamento térmico. Os compostos foram selecionados baseados em um deslocamento térmico de pelo menos 2°C ($\Delta T_m \geq 2$°C). Deslocamentos térmicos maiores que 4ºC ($\Delta T_m \geq 4$°C) estão destacados em amarelo, energias de ligação iguais ou menores que -11 kcal/mol estão destacadas em azul e percentuais de fosforilação inferiores a 60% estão destacados em vermelho. C1 a C4 correspondem às cavidades identificadas nos ensaios de *docking* molecular. 2x, 1x e 1/2x correspondem à concentração dos compostos utilizados em comparação à concentração de ATP nos ensaios de atividade de enzimas cinase.

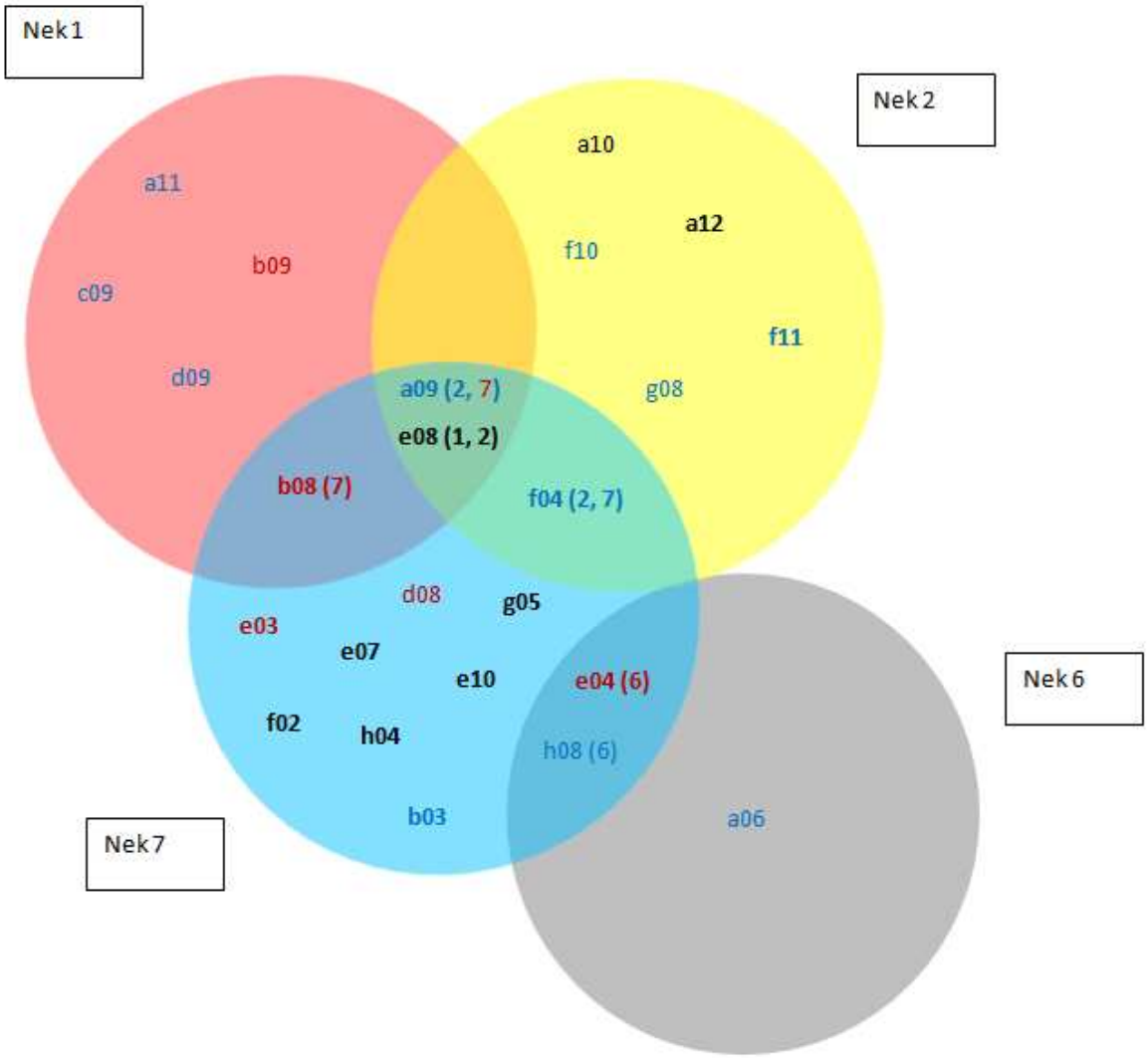


Figura 13. Representação esquemática por intersecção de grupos de compostos selecionados nos ensaios de deslocamento térmico, docking molecular e ensaios de atividade de enzimas cinase para as Neks humanas 1, 2, 6 e 7. Diferentes cores são utilizadas para distinguir os compostos com melhores resultados em cada ensaio, da seguinte maneira: preto ($\Delta T_m \geq 2^oC$), preto e negrito ($\Delta T_m \geq 4^oC$), azul ($\Delta T_m \geq 2^oC$ e energia de ligação $\leq$ -11 kcal/mol), azul e negrito ($\Delta T_m \geq 4^oC$ e energia de ligação $\leq$ -11 kcal/mol), vermelho ($\Delta T_m \geq 2^oC$ e percentual de fosforilação < 60%), vermelho e negrito ($\Delta T_m \geq 4^oC$ e percentual de fosforilação < 60%). Os números entre parênteses indicam a qual Nek o resultado pertence.

V. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizada a triagem para domínios de cinase mutados de hNek1 e hNek2, além de hNek6 mutante e hNek7 selvagem, de 87 compostos utilizando primeiramente um ensaio de deslocamento térmico. Foi identificado neste ensaio pelo menos um composto com um deslocamento de T_m significativo para a hNek1(Δ262-1258)-(T162A), E08 (JNK Inhibitor II) (ΔT_m = 4.0°C), o composto E04 (Isogranulatimide) para a hNek6(S206A) (ΔT_m =6,5 ºC), além de vários compostos para a hNek7wt e hNek2(Δ272-445)-(T175A). Entre estes, compostos B03 (Indirubin-3'-monoxime) e F04 (K-252a, *Nocardiopsis sp.*) foram validados por *docking* molecular no sítio de ligação de ATP de hNek7wt, enquanto compostos B08 (Cdk 1/2 Inhibitor III) e E03 (GSK-3 Inhibitor XIII) foram validados por reduzir a atividade de hNek7wt para 26,4% e 43,3%, respectivamente, na concentração de 312,5 nM. Dentre os compostos testados para a hNek6(S206A), o composto E04 (Isogranulatimide) foi o que apresentou resultados mais promissores, com um deslocamento térmico ΔT_m = 6.5°C, além de ter reduzido a atividade da enzima pela metade com um valor de IC_{50} próximo a 1.25 μM.

Consideramos que os ensaios de atividade de enzima cinase possuem maior relevância dos que os demais. Os ensaios de *docking* molecular para a hNek7wt e hNek2(Δ272-445)-(T175A) também são mais significativos, uma vez que foram utilizados nestes estruturas cristalográficas das proteínas. Não houve casos de conjunção de resultados em todos os três ensaios realizados. No entanto, 11 dos 24 compostos testados apresentaram resultados relevantes em dois dos ensaios realizados. Interessantemente, alguns compostos apresentaram, no ensaio de docking molecular, energias de ligação significativas em cavidades que não correspondem ao sítio de ligação do ATP (C1) (Tabela 9). Este resultado não era esperado, uma vez que os compostos utilizados são análogos de ATP, mas estes compostos se mostram importantes para o desenvolvimento de inibidores alostéricos, caso se confirme a ligação destes nestas cavidade. Com exceção do composto A10 (AMPK Inhibitor, Compound C), estes compostos também apresentaram bons resultados nos ensaios de deslocamento térmico. No entanto, nenhum deles apresentou um resultado significativo no ensaio de atividade de enzima cinase. Ainda assim, estes compostos (sobretudo os observados para as hNeks 2 e 7, as quais

possuem estrutura cristalográfica resolvida) podem ser considerados como potenciais *scaffolds* para o desenvolvimento de inibidores mais específicos. Ensaios adicionais destes compostos em células são necessários para validação dos mesmos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

2. Belham, C., Roig, J., Caldwell, J. A., Aoyama, Y., Kemp, B. E., Comb, M., Avruch, J. (2003) A mitotic cascade of NIMA family kinases Nercc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. J. Biol. Chem. 278:34897-34909.

3. Bergen, L. G.; Upshall, A. and Morris, N. R. (1984) S-phase, G2, and nuclear division mutants of Aspergillus nidulans. J. Bacteriol. 159:114-119.

4. Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC, 2008

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

6. Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. Cell. 90(5):859-69.

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

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

9. Chen, Y., Riley, D. J., Zheng, L., Chen, P. L., Lee, W. H. (2002) Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. J. Biol. Chem. 277:49408-16.

10. Chen, Y., Chen, C. F., Chiang, H. C., Pena, M., Polci, R., Wei, R.L., Edwards, R.A., Hansel, D.E., Chen, P.L., Riley, D.J. (2011) Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability. Molecular Cancer. 10(1):5.

11. Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Nigg, E.A. (1998) C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. J Cell Biol. 141(7):1563-74

12. Fry, A.M. (2002) The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. Oncogene. 21(40): 6184-94.

13. Han, L. Y., Lin, H. H., Li, Z. R., Zheng, C.J., Cao, Z.W., Xie, B., Chen, Y.Z. (2006) PEARLS: program for energetic analysis of receptor-ligand system. J Chem Inf Model. 46(1): 445-50

14. Hanks SK. Eukaryotic protein kinases. Curr. Op. Struct. Biol. 1991. 1: 369-383

15. Hanks, S. K. (1991) Eukaryotic protein kinases. Curr. Op. Struct. Biol. 1:369-383.

16. Holland, P.M., Milne, A., Garka, K., Johnson, R.S., Willis, C., Sims, J.E., Rauch, C.T., Bird, T.A., Virca, G.D. (2002) Purification, cloning and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. J Biol Chem. 277: 16229-16240.

17. Hubbard, S.R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. EMBO J. 16(18):5572-81.

18. Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., Pavletich, N. P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. Nature. 376(6538):313-20.

19. Johnson, L. N., Lowe, E.D., Noble, M.E., Owen, D.J. (1998) The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. FEBS Lett. 430, 1–11.

20. Kim S, Lee K, Rhee K. (2007) NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 360(1):56-62.

21. 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. (2008) Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. Cell Cycle, 7(17):2705-2709.

22. Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben-David, Y., Bernstein, A., Pawson, T. (1992) A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. EMBO J. 11:3521-3531.

23. Liu, S., Lu, W., Obara, T., Kuida, S., Lehoczky, J., Dewar, K., Drummond, I.A., Beier, D.R. (2002) A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. Development. 129(24):5839-46.

24. Lizcano, J. M., Deak, M., Morrice, N., Kieloch, A., Hastie, C. J., Dong, L., Schutkowski, M., Reimer, U., Alessi, D. R. (2002). 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. 277(31):27839-49.

25. Lu, K. P., Hunter, T. (1995) Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. Cell. 81:413-24.

26. Miller, S. L., DeMaria, J. E., Freier, D. O., Riegel, A. M., Clevenger, C. V. (2005) Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. Mol. Endocrinol. 19:939-949.

27. Meirelles, G.V., Lanza, D.C.F., Silva, J.C., Bernachi, J.S., Leme, A.F.P., Kobarg, J. (2010) Characterization of hNek6 Interactome Reveals an Important Role for Its Short N-Terminal Domain and Colocalization with Proteins at the Centrosome. J Proteome Res. 9(12): 6298-316

28. Meirelles, G. V., Silva, J. C., Mendonça, Y. A., Ramos, C. H., Torriani, I. L., Kobarg, J. (2011) Human Nek6 is a monomeric mostly globular kinase with an unfolded short N-terminal domain. BMC Struct Biol. 11:12.

29. Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., Uehara, Y. (2002) Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. J Biol Chem. 277(42):39655-65.

30. Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., Uehara, Y. (2004) Nucleolar Nek11 is a
31. novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. J Biol Chem. 279(31):32716-27.

32. O'Connell, M.J., Krien, M.J., Hunter, T. (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. Trends Cell Biol. 13(5):221-8.

33. Osmani, A. H., McGuire, S. L., Osmani, S. A. (1991) Parallel activation of the NIMA and $p34^{cdc2}$ cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans.* Cell 67:283-291.

34. Polci, R., Peng, A., Chen, P. L., Riley, D. J. and Chen, Y. (2004) NIMA-Related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. Cancer Research 64:8800-8803.

35. Quarmby, L. M., Mahjoub, M. R. (2005) Caught Nek-ing: cilia and centrioles. J. Cell Sci. 118:5161-9.

36. Rapley, J., Baxter, J.E., Blot, J., Wattam, S.L., Casenghi, M., Meraldi, P., Nigg, E.A., Fry, A.M. (2005) Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. Mol Cell Biol. 25(4):1309-24.

37. 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. (2007) Structure and regulation of the human Nek2 centrosomal kinase. J Biol Chem. 282(9):6833-42

38. Richards, M.W., O'Regan, L., Mas-Droux, C., Blot, J.M., Cheung, J., Hoelder, S., Fry, A.M., Bayliss, R. (2009) An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycleregulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. Mol Cell. 36(4):560-70

39. Roig, J., Mikhailov, A., Belham, C., Avruch, J. (2002) Nercc1, a mammalian NIMA family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. Genes & Dev. 16:1640-1658.

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

41. Rubin, G. M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., et al. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. Science 287, 2204–2215.

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

43. Söding, J., Biegert, A., Lupas, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. Nucleic Acids Res. 2005. 33(Web Server issue): W244-8

44. Surpili, M. J., Delben, T. M., Kobarg, J. (2003) Identification of proteins that interact with the central coiled coil region of the human protein kinase NEK7 involved in the cell cycle regulation. Biochemistry 42:15369-15376.

45. Tan, B.C., Lee, S.C. (2004) Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. J Biol Chem. 279(10):9321-30.

46. Thomsen, R., Christensen, M. H. (2006) MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. J Med Chem. 49(11): 3315-21

47. Upadhya, P., Birkenmeier, E. H., Birkenmeier, C. S., Barker, J. E. (2000) Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:217-221.

48. Yamaguchi, H., Hendrickson, W.A. (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. Nature. 384(6608): 484-9.

49. Yassachar, N., Salem, H., Tennenbaum, T., Motro, B. (2006) Nek7 kinase is enriched at the centrosome, and is required for proper spindle assembly and mitotic progression. FEBS Lett. 580(27):6489-6495.

50. Yin, M.J., Shao, L., Voehringer, D., Smeal, T., Jallal, B. (2003) The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. J Biol Chem. 278(52):52454-60.

Anexo 1: Esquematização completa dos inibidores e outros compostos utilizados no ensaio de deslocamento térmico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle (-)	10 µM KN-62	10 µM ATM Kinase Inhibitor	10 µM ATM/ATR Kinase Inhibitor	10 µM Alsterpaullone	10 µM Alsterpaullone, 2-Cyanoethyl	10 µM Aloisine A, RP107	10 µM Aloisine, RP106	10 µM Aminopurvalanol A	10 µM AMPK Inhibitor, Compound C	10 µM Aurora Kinase Inhibitor III	10 µM SU11652
B	Controle (-)	10 µM Aurora Kinase/Cdk Inhibitor	10 µM Indirubin-3'-monoxime	10 µM BAY 11-7082	10 µM Bohemine	10 µM Cdk1 Inhibitor	10 µM Cdk1 Inhibitor, CGP74514A	10 µM Cdk1/2 Inhibitor III	10 µM Cdk1/5 Inhibitor	10 µM Casein Kinase I Inhibitor, D4476	10 µM Casein Kinase II Inhibitor III, TBCA	10 µM ADP
C	Controle (-)	10 µM Cdk4 Inhibitor	10 µM Cdk4 Inhibitor II, NSC 625987	10 µM Cdk4 Inhibitor III	10 µM Cdc2-Like Kinase Inhibitor, TG003	10 µM Chk2 Inhibitor II	10 µM Compound 52	10 µM Cdk2 Inhibitor III	10 µM Cdk2 Inhibitor IV, NU6140	10 µM Cdk/Crk Inhibitor	10 µM ERK Inhibitor III	10 µM ATP-gamma-S
D	Controle (-)	10 µM ROCK Inhibitor, Y-27632	10 µM ERK Inhibitor II, FR180204	10 µM ERK Inhibitor II, Negative control	10 µM Fascaplysin, Synthetic	10 µM GSK-3b Inhibitor I	10 µM GSK-3b Inhibitor II	10 µM GSK-3b Inhibitor VIII	10 µM GSK-3 Inhibitor IX	10 µM GSK-3 Inhibitor X	10 µM GSK-3b Inhibitor XI	10 µM ATP
E	Controle (+)	10 µM SU6656	10 µM GSK-3 Inhibitor XIII	10 µM Isogranulatimide	10 µM IC261	10 µM IKK-2 Inhibitor IV	10 µM Indirubin Derivative E804	10 µM JNK Inhibitor II	10 µM JNK Inhibitor, Negative Control	10 µM JNK Inhibitor V	10 µM JNK Inhibitor IX	10 µM AMP
F	Controle (+)	10 µM MK2a Inhibitor	10 µM JNK Inhibitor VIII	10 µM K-252a, Nocardiopsis sp.	10 µM Kenpaullone	10 µM KN-93	10 µM MEK Inhibitor I	10 µM MEK Inhibitor II	10 µM MEK1/2 Inhibitor	10 µM MNK1 Inhibitor	10 µM NF-kB Activation Inhibitor	10 µM GTP
G	Controle (+)	10 µM p38 MAP Kinase Inhibitor III	10 µM p38 MAP Kinase Inhibitor	10 µM PD 98059	10 µM PD 169316	10 µM SB220025	10 µM Purvalanol A	10 µM GSK3b Inhibitor XII, TWS119	10 µM H-89, Dihydrochloride	10 µM SB 202474	10 µM SB 202190	10 µM GDP
H	Controle (+)	10 µM SB 203580	10 µM HA 1077, Dihydrochloride Fasudil	10 µM SB 218078	10 µM SC-68376	10 µM SKF-86002	10 µM Sphingosine Kinase Inhibitor	10 µM Staurosporine, Streptomyces sp.	10 µM STO-609	10 µM SU9516	10 µM Tpl2 Kinase Inhibitor	10 µM Tampão Fosfato