CINTIA BETITE LAMAS

**Clonagem, expressão e purificação da quinase dependente de
ciclina 10 (CDK10) humana**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Mestre
(Química Orgânica e Biológica).

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

São Carlos
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

*Aos meus pais Maria Elvira e
Dairson, por me apoiarem, incentivarem
e me ensinarem o valor de Deus, família
e trabalho em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

•A Deus e Nossa Senhora pelas orações atendidas e pela força que sempre me levantou.

•À minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Canduri, por me entender, me guiar e me orientar tão sabiamente, por compartilhar seu conhecimento e experiência comigo, por acreditar em mim e ter paciência, confiança e incentivo durante todo o tempo em que passei sob sua orientação. Muito obrigada!

•Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Bioquímica Molecular e Estrutural (BioQEst), Nathalia Rodrigues, Juliana Moreira, Nikolas Paparidis, Bruna Casali, Cíndia Pacífico, Denise Pilger, Nathalia Indolfo e Buana Carvalho, por toda a ajuda quanto aos assuntos acadêmicos e pessoas, pela união e amizade, que cresceu durante esses anos.

•Às colegas Yara Kerber e Beatriz Miranda, pelo auxílio, troca de informações e aprendizado.

•Aos meus pais Dairson e Maria Elvira, que não me deixaram desistir nos momentos mais difíceis, e que tornaram tudo mais fácil pelo simples fato de estarem presentes na minha vida. Amo vocês!

•Ao meu irmão Fernando, minha cunhada Danuta e minha sobrinha Julia, que trouxe alegria e cor à minha vida. Titia te ama!

•Aos meus tios, primos e avós, pelo apoio, interesse em minha pesquisa e confiança em mim.

•Aos meus amigos Amanda Trabuco, Carla Mendes, Carolina Zambuzi, Scarlet Ortega, Bianca Rantin, Juliana Oliveira, Cyntia Tomasso e Rafael Fonseca, por todos esses anos de amizade, companheirismo e apoio incondicional.

•À Giovana Policastro, pela dedicação e ajuda, mesmo distantes.

•Aos meus colegas da Ong Cachorro Ajuda, pela amizade e por compartilharem comigo a chance de fazer a diferença para aqueles que não sabem se defender.

•Aos meus companheiros caninos Bisteca e Pingo, fiéis, alegres e sempre dispostos a ouvir meus desabafos, me oferecendo lambidas consoladoras. E a todos os amigos de quatro patas que passaram pela minha casa durante esse tempo, aos quais eu tive a oportunidade de ajudar, e os quais me fizeram levantar e seguir em frente quando o cansaço e desânimo já me dominavam.

•Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, do Laboratório do Grupo de Química Medicinal (Nequimed – IQSC/USP), aos seus alunos e à técnica Fabiana Rosini.

•Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, do Laboratório de Microfabricação e Separações (BioMicS – IQSC/USP).

•Ao Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia (IFSC/USP).

•A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

•Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro ao laboratório.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) compreendem uma família de proteínas que podem ser subdivididas em dois grupos funcionais majoritários baseados na sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional. Já foram identificadas mais de 30 CDKs humanas. A CDK10 é uma proteína quinase dependente de ciclina pertencente ao grupo de quinases relacionadas à Cdc2. CDK10 é essencial na fase G2/M do ciclo celular, possivelmente no progresso dessa fase, monitorando a replicação completa do DNA e permitindo que as células passem desse ponto de restrição. Essa proteína é um importante determinante de resistência à terapia endócrina para câncer de mama. Portanto, é um alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores, uma vez que está presente em células cancerosas. O estudo da estrutura e função da CDK10 deverá ser realizado após sua clonagem, expressão e purificação. O cDNA da CDK10 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), e posteriormente, o produto foi aplicado em gel de agarose para análise e purificação. O vetor de clonagem recombinante foi obtido, o qual foi clonado em células competentes e sequenciado. A obtenção do plasmídeo recombinante para expressão deu-se pela inserção do DNA nos vetores de expressão pET28a(+) e pET23a(+) (*Novagen*). A proteína foi expressa em células competentes e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida, a proteína obtida foi purificada em coluna de afinidade por níquel e em coluna de afinidade por ATP. Com a otimização dos resultados obtidos, será possível, futuramente, caracterizar bioquimicamente a CDK10 e elucidar suas estruturas secundária e terciária. O estudo da CDK10 irá contribuir para o entendimento da sua relação estrutura-função e sua relação com oncogenes e supressores de tumor, e o estudo estrutural para o desenvolvimento de inibidores químicos de baixo peso molecular que possa inibir especificamente a CDK10.

ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases (CDKs) comprise a family of proteins that can be subdivided into two major groups based on their functional role in cell cycle and / or transcriptional control. Over 30 human CDKs have been identified. CDK10 is a cyclin-dependent kinase protein that belongs to the cdc2-related kinases group. CDK10 is essential in phase G2 / M of the cell cycle, possibly in the progress of this phase, monitoring the complete DNA replication and allowing the cells to pass through this restriction point. This protein is an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. Therefore, it is a potential target for the development of inhibitors, since it is present in cancerous cells. The study of the structure and function of CDK10 must be performed after its cloning, expression and purification. cDNA of CDK10 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then the product was applied into agarose gel for analysis and purification. The cloning vector was obtained, which was cloned into competent cells and sequenced. The obtaining of the recombinant plasmid for expression was due to the insertion of DNA into expression vectors pET28a(+) and pET23a(+) (Novagen). The protein was expressed in competent cells and analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel. Then, the obtained protein was purified by nickel affinity column and ATP affinity column. With the optimization of the results obtained, it will be possible, in the future, to biochemically characterize CDK10 and elucidate its secondary and tertiary structures. The study of CDK10 will contribute to the understanding of its structure-function relationship and its relationship with oncogenes and tumor suppressors, and the structural study for the development of low molecular weight chemical inhibitors that can specifically inhibit CDK10.

The structural studies will contribute to the development of chemical inhibitors of low molecular weight that may inhibit this and other CDKs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do ciclo de divisão celular eucariótico.....	17
Figura 2. Exemplo de uma reação de fosforilação, envolvendo o ATP e o aminoácido serina. A formação da fosfoserina é promovida pela CDK.	19
Figura 3. Processo de ativação de CDKs.	21
Figura 4. Estrutura obtida por raios X da CDK2 em complexo com o ATP.	22
Figura 5. Elementos da estrutura secundária da CDK10 obtida a partir de modelagem homóloga.	25
Figura 6. Sítio de ligação do ATP na CDK10.	26
Figura 7. Esquema do vetor pET28a(+).	35
Figura 8. Produto de amplificação por PCR da CDK10 a partir de cDNA de CFH.....	46
Figura 9. Purificação do gel de agarose contendo DNA referente à CDK10 obtido por PCR	47
Figura 10. Análise do vetor recombinante pCR-Blunt:: <i>cdk10</i> obtido por PCR de colônias.....	48
Figura 11. Produto da reação de clivagem do plasmídeo recombinante pCR-Blunt:: <i>cdk10</i> com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	49
Figura 12. Análise da purificação do fragmento <i>cdk10</i> clivado.	50
Figura 13. Vetores de expressão pET28a(+) e pET23a(+) clivados e purificados a partir de gel de agarose	51
Figura 14. Trecho do sequenciamento automático do DNA referente à CDK10.....	52
Figura 15. Análise da expressão da CDK10 em células <i>E. coli</i> BL21(DE3). Indução com 0,1mM de IPTG, a 30°C por 4 horas.	53
Figura 16. Análise da solubilidade da CDK10 expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS com 0,1mM de IPTG, a 30°C por 4 horas.	54
Figura 17. Análise de expressão e solubilidade da CDK10 expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE. Indução com 0,2mM de IPTG a 25°C por 6 horas.....	54

Figura 18. Análise da solubilidade da CDK10 a partir do plasmídeo sintético pET28a(+)::cdk10 em BL21(DE3)pLysS.	56
Figura 19. Análise do teste de solubilização com o kit <i>CellLytic B Plus Kit</i> da fração insolúvel obtida após expressão do plasmídeo sintético pET28a(+)::cdk10 em BL21(DE3)pLysS.	58
Figura 20. Análise da purificação em coluna de Ni ²⁺ após a solubilização com o kit <i>CellLytic B Plus (Sigma)</i>	58
Figura 21. Análise das amostras purificadas em coluna de Ni ²⁺ 24 horas após a purificação.....	59
Figura 22. Análise da solubilização da CDK10 utilizando Ureia 4M.....	60
Figura 23. Análise da solubilização da CDK10 com hidrocloreto de guanidina 6M.	61
Figura 24. Produto insolúvel após teste de solubilização com hidrocloreto de guanidina 6M.	61
Figura 25. Análise da solubilização da CDK10 utilizando MPD.	62
Figura 26. Análise da purificação da CDK10 por cromatografia de afinidade por ATP. .	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA referente à CDK10 humana pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
Tabela 2. Programa de PCR do termociclador utilizado para a amplificação da <i>cdk10</i>	30
Tabela 3. Reação de PCR de colônias utilizando a enzima <i>Taq DNA Polymerase</i> para confirmação da obtenção de colônias positivas para DNA referente à CDK10.	33
Tabela 4. Programa de PCR do sequenciador automático utilizado para o sequenciamento dos insertos <i>cdk10</i> nos vetores pCR-Blunt, pET28a(+) e pET23a(+).	37
Tabela 5. Plasmídeos recombinantes de expressão e respectivas cepas de <i>E. coli</i> utilizadas na expressão da CDK10.	38
Tabela 6. Condições de expressão testadas com o plasmídeo de expressão sintético pET28a(+): <i>cdk10</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Unidade de temperatura – graus Celsius
%GC	Porcentagem de nucleotídeos citosina e guanina
ADP	Adenosina 5' difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRCA1	Breast Cancer 1
CAK	Quinase ativadora de CDKs
cdc	Genes do ciclo de divisão celular
cDNA	DNA complementar
CDK	Quinase dependente de ciclina
CFH	Cérebro Fetal Humano
CKI	Quinase inibidora de CDKs
CTD	Domínio carboxi-terminal
Da	Dalton, unidade de massa atômica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ddNTP	2',3' – dideoxirribonucleosídeos trifosfatados
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Ets2	Gene Eritroblastose homólogo 2
Fw	<i>Forward</i>
GenBank	Banco de dados de genes
His	Histidina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kan	Kanamicina
kDa	10 ³ unidades de massa atômica
LB	Luria-Bertani
MPD	2-metil-2,4-pentanediol
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>

nm	Nanômetro (10^{-9} metros)
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSA	Persulfato de amônio
RAF1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNAPII	RNA polimerase II
RNAm	RNA mensageiro, também descrito como mRNA
Rv	<i>Reverse</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
Tat	Proteínas transativadoras (<i>Trans-activating protein</i>)
TEMED	N,N,N,N'- tetrametilenodiamina
Tm	Temperatura de <i>melting</i> ou anelamento
tRNA	RNA transportador
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Ciclo celular.....	16
1.2. CDKs e o controle do ciclo celular.....	18
1.3. Mecanismos regulatórios das atividades das CDKs.....	20
1.4. CDK10.....	23
1.4.1. Estrutura e função da CDK10	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Obtenção do cDNA codificante para CDK10	28
3.2. Clonagem e subclonagem.....	29
3.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	29
3.2.2. Eletroforese em gel de agarose	30
3.2.3. Purificação do DNA a partir do gel de agarose	31
3.2.4. Clonagem do inserto <i>cdk10</i> no vetor de propagação pCR-Blunt	31
3.2.5. Transformação de células <i>E. coli</i> DH5- α CaCl ₂ competentes.....	32
3.2.6. Análise do plasmídeo recombinante	32
3.2.7. Purificação do plasmídeo recombinante pCR-Blunt:: <i>cdk10</i>	33
3.2.8. Reação de clivagem para liberação do DNA referente à CDK10.....	34
3.2.9. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão.....	34
3.2.10. Purificação dos plasmídeos recombinantes de expressão	36
3.2.11. Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.....	36
3.3. Expressão da CDK10	37
3.3.1. Transformação em cepas de expressão	37
3.3.2. Testes de expressão.....	39
3.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.....	39
3.3.4. Lise celular.....	40

3.4. Purificação da proteína CDK10	41
3.4.1. Cromatografia de afinidade ao Ni^{2+}	41
3.4.2. Cromatografia de afinidade ao ATP	42
3.5. Ensaio de solubilização da fração insolúvel	43
3.5.1. Solubilização com kit <i>CellLytic B Plus Kit (Sigma)</i>	43
3.5.2. Solubilização utilizando Ureia	43
3.5.3. Solubilização utilizando hidrocloreto de guanidina.....	44
3.5.4. Solubilização utilizando 2-metil-2,4-pentanediol (MPD).....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Clonagem.....	46
4.1.1. Amplificação do DNA codificante para CDK10	46
4.1.2. Obtenção do clone pCR-Blunt::cdk10.....	47
4.1.3. Clivagem para liberação do inserto cdk10.....	49
4.1.4. Clivagem para abertura dos vetores de expressão pET23a(+) e pET28a(+).	50
4.1.5. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão.....	51
4.2. Expressão da CDK10 e lise celular	53
4.3. Ensaio de solubilização e purificação por cromatografia de afinidade por níquel.....	57
4.3.1. Solubilização com kit <i>CellLytic B Plus Kit (Sigma)</i>	57
4.3.2. Solubilização utilizando Ureia	59
4.3.3. Solubilização utilizando Hidrocloreto de Guanidina	60
4.3.4. Solubilização utilizando MPD.....	61
4.4. Purificação por cromatografia de afinidade ao ATP	62
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo celular

As células eucarióticas apresentam um grupo complexo de proteínas regulatórias, conhecidas como “sistema de controle do ciclo celular”, que governam o avanço do ciclo celular. Durante esse processo, as células devem completar eventos contínuos nos quais muitas dessas proteínas passam por diversos mecanismos de fosforilação. Tais processos têm papel crucial na regulação do ciclo celular, que inclui a divisão celular. Se todos os mecanismos reguladores que restringem a divisão celular funcionarem precisamente, duas células filhas viáveis são produzidas com um genoma completo. Caso contrário, uma ou ambas as células filhas serão defeituosas ou morrerão, ou ainda ocorrerá divisão não regulada das células, resultando em consequências drásticas como o câncer. Por este fato, a célula eucariótica requer muitos processos bioquímicos distintos que necessitam estar coordenados uns com os outros para que o ciclo celular ocorra adequadamente (DOONAN; KITSIOS, 2009).

A divisão celular em eucariotos ocorre em quatro fases (Figura 1):

- Fase G1 – novas proteínas, enzimas e RNA são sintetizados, ocorre a formação de organelas celulares, e a célula praticamente dobra de tamanho;
- Fase S – ocorre a síntese do DNA e a duplicação do material genético nos cromossomos;
- Fase G2 – ocorre a síntese de moléculas necessárias à divisão celular;
- Fase M – o envelope celular é degradado, os cromossomos pareados são puxados para os pólos da célula, cada conjunto de cromossomos filhos é envolto por um novo envelope nuclear, terminando com a citocinese, a divisão em duas células-filhas (NELSON; COX, 2011).

Figura 1. Representação do ciclo de divisão celular eucariótico. As durações de cada etapa variam com o tipo de célula, porém essas são as mais frequentes.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2011, p. 469.

Durante o ciclo, existem alguns pontos de restrição e de verificação, em que os sistemas de controle do ciclo monitoram se a célula completou satisfatoriamente a fase anterior para que se inicie a próxima fase, e interrompem o ciclo quando há alguma falha ou encontram condições desfavoráveis (por exemplo, pouca disponibilidade de nutrientes) (VOET; VOET, 2006).

Os genes do ciclo de divisão celular, ou genes *cdc*, são genes que codificam componentes essenciais do sistema de controle do ciclo celular e que são afetados por determinadas mutações. Tais mutações provocam o funcionamento anormal do gene *cdc*, o que causa o impedimento do progresso do ciclo celular quando a célula alcança o ponto em que a função do gene mutado é requerida para o avanço futuro (ALBERTS et al., 2010).

1.2. CDKs e o controle do ciclo celular

Até meados da década de 1980, não se sabia como o sistema de controle do ciclo celular enviava e recebia sinais para que o ciclo celular pudesse progredir ou ser interrompido. No final dos anos 80, foram identificadas várias proteínas diferentes daquelas que desempenham os processos de replicação do DNA, de segregação cromossômica, e outros. Essas proteínas são essenciais no sistema de controle do ciclo celular, e formam uma extensa e importante família de proteínas quinases chamada CDKs (ALBERTS et al., 2010).

As CDKs (do inglês *cyclin-dependent kinases*) são proteínas quinases dependentes de ciclina que atuam na regulação de diversos processos celulares em eucariotos, em conjunto com a fosforilação-desfosforilação sítio-específico de proteínas. As primeiras proteínas da família das CDKs foram descobertas devido ao seu papel no ciclo celular em levedura. Em pouco tempo, foram identificadas proteínas homólogas em diferentes espécies, desde plantas até mamíferos (KNOCKAERT et al., 2002).

Sabe-se que existem pelo menos 30 CDKs decodificadas no genoma humano. Essas proteínas possuem sítios de serina, tirosina e treonina no domínio de ligação de ATP, participando da fosforilação desses resíduos de aminoácidos que, por sua vez, possuem um papel fundamental em todos os aspectos moleculares na vida da célula (KNOCKAERT et al., 2002).

As CDKs humanas apresentam os 11 subdomínios característicos de todas as quinases, e a forte homologia entre as sequências dessas CDKs sugerem que elas podem ter estruturas tridimensionais similares. Baseado nisto, a estrutura de algumas dessas quinases (como CDK1, CDK4 e CDK10) foram modeladas a partir da estrutura de outras CDKs conhecidas, como a CDK2 e a CDK9. Alguns aspectos gerais da estrutura das CDKs estão conservados em todas as proteínas da família, como uma porção N-terminal consistindo em grande parte de fitas β e uma porção C-terminal formada basicamente de hélices α . Além disso, o sítio de ligação do ATP, que forma uma espécie de compartimento, está localizado entre essas duas porções (SUN et al., 2005).

A principal característica que diferencia as CDKs das outras famílias de proteínas quinases é a necessidade de uma subunidade ativadora chamada de *ciclina*. Essa subunidade é assim chamada, pois sua concentração varia

ciclicamente durante o ciclo celular, sendo sintetizada e degradada. Na maioria dos casos, as subunidades catalíticas quinases apresentam pouca ou nenhuma atividade quando na ausência da subunidade ciclina (DOONAN; KITSIOS, 2009).

A Figura 2 apresenta um esquema de uma reação de fosforilação promovida pelas CDKS.

Figura 2. Exemplo de uma reação de fosforilação, envolvendo o ATP e o aminoácido serina. A formação da fosfoserina é promovida pela CDK. – B: representa um resíduo de aminoácido básico da enzima que facilita o ataque do OH ao fosfato γ do ATP. O cátion Mg^{2+} é um cofator comum em quinases que facilita a transferência do grupo fosforil ao OH por interagir com os fosfatos β e γ do ATP.

Fonte: THERMO SCIENTIFIC PIERCE PROTEIN BIOLOGY PRODUCT, 2011.

A participação das CDKs na fosforilação de proteínas é crucial para a mudança entre os quatro principais estágios do ciclo celular. Por meio de associação e fosforilação de fatores de transcrição, as CDKs atuam diretamente na regulação transcricional. Essas proteínas também podem atuar indiretamente na regulação da transcrição, interagindo com subunidades regulatórias positivas (ciclins) ou negativas (inibidores de CDKs - CKIs) dos fatores de transcrição, resultando em aumento ou inibição da transcrição, respectivamente. As CAKs agem na regulação da transcrição, reparo do DNA e supressão de tumor. A transcrição é regulada pelas CDKs não só durante o progresso do ciclo celular, como também durante a expressão gênica, através da fosforilação do domínio carboxi-terminal

(CTD) da maior subunidade da RNA Polimerase II (RNAP II). (DOONAN; KITSIOS, 2009)

A RNAP II é responsável pela síntese dos mRNAs e alguns RNAs especializados. Ela facilita a transcrição gênica em células eucarióticas formando um complexo de pré-iniciação de transcrição com outras proteínas, chamadas de fatores de transcrição. A atividade transcricional da RNAP II é modulada durante o ciclo celular, a qual é dependente de mudanças no estado de fosforilação do CTD da subunidade maior da RNAP II para que ocorra a transcrição. Muitas quinases responsáveis pela fosforilação do CTD são membros da superfamília das CDKs, como é o caso da CDK7, CDK8 e CDK9. Além dessas proteínas, sabe-se que a CDK10 e a CDK11 também participam na regulação da transcrição, interagindo com fatores de transcrição. A fosforilação do CTD da maior subunidade da RNAP II pelas CDKs é possível devido a uma característica incomum desse domínio: uma longa cauda carboxi-terminal consistindo de múltiplas repetições de uma sequência consenso de sete aminoácidos, cada uma contendo um sítio consenso de fosforilação para CDKs (DOONAN; KITSIOS, 2009).

1.3. Mecanismos regulatórios das atividades das CDKs

As atividades das CDKs oscilam de acordo com a regulação de quatro principais mecanismos: ativação da CDK pela ligação à ciclina, ativação por fosforilação mediada por CAKs, inibição por fosforilação e inibição por subunidades (proteínas) inibitórias (CKIs). Outros mecanismos incluem síntese periódica e degradação das ciclinas, degradação das próprias CDKs, transcrição e tradução das subunidades, interação com vários inibidores e modificações em suas localizações celulares (DE AZEVEDO JUNIOR et al., 1997).

A Figura 3 mostra o processo total de ativação da CDK pela ligação com a subunidade ciclina. No primeiro estágio, a CDK encontra-se inativa e monomérica. Estudos da estrutura tridimensional das proteínas CDKs revelam que quando a ciclina se liga à CDK no segundo estágio, há uma mudança na configuração espacial da proteína, deixando o sítio catalítico desta acessível à reação com o substrato. O complexo ciclina/CDK fica parcialmente ativo, e a ativação total do complexo ocorre quando no terceiro estágio, outra quinase, a *quinase ativadora de CDK (CAK)*, fosforila um aminoácido próximo à entrada do sítio ativo da CDK

(geralmente uma treonina, mas pode ser uma serina ou tirosina) o que permite que a quinase fosforile eficientemente a proteína-alvo e induza eventos específicos do ciclo celular (ALBERTS et al., 2010).

Figura 3. Processo de ativação de CDKs. O processo pode ser dividido em três etapas: inativa, com a CDK monomérica, parcialmente ativa, quando a CDK se liga à ciclina, e ativa, quando uma treonina, serina ou tirosina conservada é fosforilada por uma CAK.

Fonte: Adaptado de Alberts et al., 2010, p. 1063.

Como apresentado no item **1.2. CDKs e o controle do ciclo celular**, as CDKs possuem um domínio catalítico localizado entre as porções N-terminal e C-terminal, responsável pela ligação do ATP. Além disso, elas também possuem duas estruturas de controle, o *T-loop* ou alça T e uma α -hélice que contém uma sequência de aminoácidos bastante conservada que está presente apenas em CDKs (ALBERTS et al., 2010). Quando uma CDK é fosforilada, em sua treonina, tirosina ou serina no sítio de ligação do ATP, ela é inativada, pois a fosforilação impede a aproximação e consequente ligação do ATP. Uma fosfatase desfosforila o aminoácido fosforilado, permitindo sua ligação ao ATP. No entanto, quando a ciclina se liga à CDK, a hélice α que contém a sequência conservada das CDKs se move em direção ao domínio catalítico, fazendo com que outros resíduos responsáveis pela interação com o ATP se aproximem do sítio catalítico. Ao mesmo tempo, a alça T se curva em direção à porção C-terminal. A fosforilação da serina, tirosina ou treonina na alça T, catalisada por uma CAK, desloca a alça T para fora da fenda de ligação do substrato, expondo o sítio catalítico e facilitando a ligação do ATP,

aumentando a atividade catalítica da CDK (ALBERTS et al., 2010; GALLORINI et al., 2012).

Na Figura 4, a CDK2 é usada como exemplo para entendimento de onde a molécula de ATP e os resíduos fosforilados se situam com relação às estruturas secundárias da CDK.

Figura 4. Estrutura obtida por raios X da CDK2 em complexo com o ATP. O domínio N-terminal está colorido em rosa, o C-terminal em ciano, a hélice contendo a sequência conservada nas CDKs (no caso da CDK2, a sequência é PSTAIRE) em magenta e a alça T em laranja. O ATP está representado em modelo de esferas e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos Thr14, Tyr15 e Thr160 fosforilados estão representados em forma de bastões.

Fonte: VOET; VOET, 2006, p. 1499.

O complexo ciclina/CDK ativo pode ser inibido por várias vias regulatórias. Uma delas ocorre quando as CKIs se ligam e inibem o complexo ciclina/CDK. Outro tipo de inativação do complexo ocorre quando outras quinases regulatórias fosforilam a subunidade CDK em sítios inibitórios no domínio N-terminal (GALLORINI et al., 2012).

A concentração de CDKs não muda significativamente durante o ciclo celular, mas são ativadas e desativadas com o avanço do mesmo. Essas mudanças são interligadas e não só acionam os eventos do ciclo, como também iniciam a ativação do próximo complexo ciclina/CDK em série. Já as concentrações de ciclinas e CKIs

são estreitamente controladas, fornecendo uma regulação precisa dos eventos do ciclo (DOONAN; KITSIOS, 2009; DE AZEVEDO JUNIOR et al., 1996).

Outra característica importante das CDKs é que um mesmo tipo de CDK pode atuar em diferentes eventos do ciclo celular, pois diversas ciclinas conferem diferenças em sua especificidade pelos substratos, ou podem marcar a CDK para uma localização subcelular específica que altera a viabilidade de substratos para fosforilação (DE AZEVEDO JUNIOR et al., 1997).

1.4. CDK10

Em 1994 foi identificado um novo membro da família das CDKs, a CDK10, ou como foi inicialmente chamada, PISSLRE. Ela recebeu esse nome devido à presença de uma região com a seguinte sequência de aminoácidos: Prolina (P), Isoleucina (I), Serina (S), Serina (S), Leucina (L), Arginina (R) e Glutamato (E). Essa região é conservada em outras CDKs e está localizada no alça de interação com a ciclina (BRAMBILLA; DRAETTA, 1994; LI et al., 1995; BAGELLA et al., 2006). A Figura 4 do item **1.3. Mecanismos regularórios das atividades das CDKs** mostra um exemplo dessa conformação espacial muito próximo da CDK10.

Três isoformas da CDK10 foram descritas, *hcdk10-1* (código de acesso *GenBank*: X78342), *hcdk10-2* (código de acesso: L33264) e *hcdk10-3* (código de acesso: AF153430) e elas derivam do mesmo gene por *splicing* alternativo (SERGÈRE et al., 2000; BAGELLA et al., 2006). Embora poucos estudos tenham sido realizados sobre essas isoformas, nenhuma função relacionada à *hcdk10-3* foi encontrada. Sabe-se que a *hcdk10-2* atua na transição entre a fase G2, na qual novas proteínas e RNA são sintetizados, e a fase M, em que a mitose e a citocinese ocorrem, dividindo a célula mãe em duas células filhas (DOONAN; KITSIOS, 2009).

Já a *hcdk10-1* tem uma atuação mais conhecida, que é sua associação com o domínio N-terminal do fator de transcrição Ets2. Os fatores de transcrição que fazem parte da família do Ets2 regulam a expressão de muitos genes envolvidos na formação de tumor e câncer, funcionando tanto como ativadores da transcrição quanto repressores. Ets2 é necessário para a proliferação de câncer de mama, enquanto que sua superexpressão reprime a atividade do supressor de tumor BRCA1 em células de câncer de mama. A ligação dessa isoforma da CKD10 com o

fator de transcrição Ets2 o torna inativo e inibe a transativação da RNAP II (KASTEN; GIORDANO, 2001).

Ainda no campo de pesquisa do câncer, descobriu-se recentemente um papel muito importante da CDK10 no tratamento via terapia endócrina em pacientes com câncer de mama. Quando a CDK10 tem sua expressão silenciada nas células cancerosas, estas adquirem resistência ao medicamento, levando a uma baixa resposta ao tratamento da doença. Isso ocorre porque a deficiência em CDK10 nas células aumenta a atividade do fator de transcrição Ets2 no gene promotor *RAF1*, fazendo com que as células cancerosas passem pela fase G1 e se proliferem, o que era antes impedido pelos hormônios administrados na terapia endócrina. Um teste quantitativo para a CDK10 pode ser utilizado para analisar a sensibilidade dos pacientes a serem submetidos à terapia endócrina (IORNS et al., 2008).

1.4.1. Estrutura e função da CDK10

A estrutura terciária de uma proteína é estabelecida pelas interações hidrofóbicas ou hidrofílicas entre os aminoácidos e a água presente no meio em que a proteína se encontra. O arranjo tridimensional que a proteína adquire em seu enovelamento é responsável pela função biológica específica da proteína. Devido a esse fator, muitos estudos são realizados visando determinar a estrutura terciária de diversas proteínas, para entender qual o papel de cada grupo na função da proteína, e sua relação com o sistema biológico (ALBERTS et al., 2010).

Poucos estudos foram realizados acerca da CDK10, e sua estrutura tridimensional, bem como a estrutura do complexo CDK10-ligante, permanecem desconhecidas. Em 2005, Sun *et al.* propuseram um modelo para a estrutura tridimensional da CDK10 (Figura 5), baseando-se na estrutura de difração de raios X obtida para a CDK2. Essa suposição, chamada de modelagem molecular por homologia, pode ser feita com um alto grau de confiabilidade, levando-se em conta que proteínas com sequências parecidas terão estruturas tridimensionais parecidas.

Figura 5. Elementos da estrutura secundária da CDK10 obtida a partir de modelagem homóloga. As hélices estão coloridas em vermelho e as fitas em amarelo.

Fonte: SUN et al., 2005, p. 2854.

Analisando-se a estrutura da CDK10 obtida por modelagem molecular por homologia, pôde-se encontrar o sítio de ligação do substrato ATP (Figura 5) e explicar a especificidade da ligação CDK10 ao substrato (Figura 6).

Notam-se claramente as interações de hidrogênio responsáveis pela estabilização do complexo CDK10-ATP. A relação encontrada entre a função da CDK10 e sua estrutura abriu portas para a investigação da participação da CDK10 no ciclo celular, uma vez que pôde-se entender como o ATP liga-se à proteína, quais aminoácidos estão mais propensos a serem fosforilados e, conseqüentemente, que papel a CDK10 pode ter no decorrer do ciclo celular. Além disso, determinando a localização de grupos específicos, é possível manipular o gene codificante para a proteína de modo a substituir esses grupos, aumentando ou diminuindo a especificidade deles por determinados ligantes e, dessa forma, compreender ainda melhor a interação da CDK10 com o sistema biológico.

Figura 6. Sítio de ligação do ATP na CDK10. Em linhas pontilhadas, a representação das ligações de hidrogênio no complexo CDK10-ATP.

Fonte: SUN et al., 2005, p. 2855.

A elucidação da estrutura terciária de uma proteína também tem grande importância farmacológica. No caso da CDK10, que está relacionada ao surgimento de diversos tipos de tumores, sua determinação estrutural será útil no desenvolvimento de novos compostos que se ligam competitivamente ou de maneira irreversível ao sítio de ligação ao ATP, ou à ciclina, por exemplo, de modo a bloquear a atividade da CDK10. Dessa forma, a proteína não estará apta a cumprir seu papel na via biológica de interesse, inibindo o desenvolvimento da doença em questão.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um novo protocolo de clonagem e expressão da proteína CDK10 em sistema bacteriano (*E. coli*), bem como um novo protocolo de purificação da mesma em colunas de afinidade por níquel e por ATP. Esses passos, em conjunto com abordagens experimentais futuras, irão contribuir no esclarecimento do mecanismo de ação da CDK10 no controle da transcrição gênica, bem como das interações com ligantes, proporcionando a definição da especificidade e o diferencial que determina a função celular da CDK10. Para tanto, pretende-se:

- Amplificar o DNA correspondente à CDK10 a partir de biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano;
- Clonar o DNA em vetor de propagação;
- Subclonar o DNA em vetor de expressão;
- Expressar a proteína CDK10 em sistema heterólogo (*Escherichia coli*);
- Purificar a proteína por cromatografia de afinidade ao níquel e cromatografia de afinidade ao ATP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção da proteína proposta, utilizando métodos de DNA recombinante, fez-se necessário o comprimento de algumas etapas essenciais, descritas nos itens de 3.1 a 3.5 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.1. Obtenção do cDNA codificante para CDK10

A sequência de nucleotídeos correspondente à proteína CDK10 foi estudada e identificada em pesquisa no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GenbankSearch.html>) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Dentre as isoformas existentes, foi escolhida a isoforma 1 da proteína CDK10 (código de acesso *GenBank*: NM_003674). O DNA referente à proteína CDK10 é chamado *cdk10*, e a sequência de aminoácidos é denominada CDK10.

O DNA referente à CDK10 foi obtido a partir de biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (CFH) – *CLONTECH*. A amplificação foi feita por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) do cDNA da CDK10 usando o termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (*Bio-Rad*), conforme descrito no **3.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**. A sequência do DNA *cdk10* identificado no banco de dados *GenBank* foi base para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), nos quais foram inseridos sítios para as enzimas de restrição mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA referente à CDK10 humana pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os sítios de restrição encontram-se destacados em azul. Na região 5' do códon de iniciação foi inserido sítio para a enzima *NdeI* e na região 3' do códon de terminação foi inserido sítio para a enzima *BamHI*.

Oligonucleotídeo	Enzimas de Restrição	Sequências dos oligos 5'-3'
cdk10_Fw	<i>NdeI</i>	AGACATATGCGGAGCCAGATCTGGAGTGCGAGCAG
cdk10_Rv	<i>BamHI</i>	AGAGGATCCTCAGGGTTTACAGCGCTTGCTCTGGCCCTCG

A escolha das enzimas de restrição foi feita após análise da sequência da *cdk10* utilizando-se a ferramenta virtual *Web Cutter* (<http://www.rna.lundberg.gu.se/cutter2>), que apresenta quais enzimas não clivam a sequência de nucleotídeos em questão. Dessa forma, as sequências das enzimas apresentadas podem ser adicionadas aos *primers* sem que, na adição posterior dessas enzimas, a sequência de interesse seja cortada. Adicionalmente, foi utilizada a ferramenta *Gene Runner* (<http://www.generunner.net>) para calcular a temperatura teórica de anelamento (T_m) dos *primers*, a porcentagem dos nucleotídeos guanina e citosina e a possibilidade de formação de *hairpins* (interações entre os nucleotídeos da própria sequência do *primer* que dificultam as reações de PCR).

3.2. Clonagem e subclonagem

3.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram preparadas usando como molde a biblioteca de cDNA de CFH (*CLONTECH*) na concentração de 200ng/ μ L, cedido pela Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos.

Para as reações, foram utilizados *primers* específicos na concentração de 10 μ M, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) na concentração de 10mM e a enzima DNA polimerase *2X Phusion Master Mix* (*Finnzymes*). As concentrações dos reagentes foram baseadas nas instruções do fabricante da enzima. O volume final de cada reação foi de 50 μ L, o qual foi dividido em 5 alíquotas de 10 μ L, e cada qual foi submetida a um gradiente de temperatura de anelamento (T_m) de 65 a 77°C.

O programa utilizado no termociclador consistiu de ciclos de amplificação divididos em 3 etapas (Tabela 2). Na primeira, ocorre a desnaturação, em que as duas fitas do DNA são separadas por aquecimento. Na segunda etapa, a temperatura é reduzida até a T_m escolhida, em que ocorre o anelamento dos *primers* às fitas do DNA. Por fim, a reação é aquecida novamente até a temperatura ótima para a enzima polimerase, que promove a extensão da cadeia sintetizando novas fitas de DNA na direção 5' para 3', a partir da extremidade 3' do *primer*. Portanto, a cada ciclo a quantidade de DNA se duplica (ALBERTS et al., 2010).

Tabela 2. Programa de PCR do termociclador utilizado para a amplificação da *cdk10*.

Temperatura (°C)	Tempo	Etapa	Ciclo
94	3 min	Desnaturação	1x
94	60 s	Desnaturação	35x
65-77*	60 s	Anelamento	
72	1 min	Extensão	
72	10 min	Extensão final	1x
4	Indefinido		1x

*Gradiente de temperatura de 65 a 77°C.

A verificação dos produtos de PCR foi feita através da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.2. Eletroforese em gel de agarose

Para a migração diferencial dos fragmentos de DNA por eletroforese, foram utilizados géis de agarose 0,8% em tampão TAE (40mM de Tris-acetato pH 8,0; 1mM de EDTA – ácido etilenodiaminotetracético). Foram aplicados 5µL de cada produto de reação de PCR acrescidos de 1µL de tampão *Loading Buffer* 6x no gel, o qual foi submetido a uma diferença de potencial de 110 Volts e corrente elétrica de 100 mA por 30 minutos.

O gel foi incubado em solução de brometo de etídeo 0,25µg/µL por 15 minutos, etapa em que ocorre a interação do brometo com as cadeias de DNA, possibilitando sua visualização através de luz ultravioleta (UV). O equipamento utilizado para a visualização foi o *Bio-Imaging Systems MiniBIS* acoplado a um computador.

O padrão *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas) foi aplicado no gel de agarose ao lado das alíquotas dos produtos das reações de PCR, para a comparação entre as bandas de fragmentos de DNA geradas pelas alíquotas com as bandas do padrão.

3.2.3. Purificação do DNA a partir do gel de agarose

Após a determinação dos melhores parâmetros para a reação de PCR, foi feita uma reação de 50µL na melhor condição, e todo o produto desta reação foi aplicado no gel de agarose 0,8% a fim de isolar o fragmento de DNA de interesse, o da *cdk10*. A banda obtida no gel correspondente a esse fragmento foi recortada com uma lâmina e o material genético foi extraído do gel utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. A concentração do DNA purificado foi determinada pelo equipamento *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*, do Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia (IFSC).

3.2.4. Clonagem do inserto *cdk10* no vetor de propagação pCR-Blunt

O inserto *cdk10* amplificado e purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt do kit *Zero Blunt PCR Cloning* (Invitrogen). Como o DNA foi amplificado pela enzima *2X Phusion Master Mix* (Finnzymes), que deixa extremidades cegas, o vetor pCR-Blunt foi escolhido por não possuir timinas ou adeninas em suas extremidades.

O inserto hidrolisado foi inserido no plasmídeo respeitando a proporção recomendada pelo fabricante de 10:1 (inserto:vetor). A quantidade de DNA (inserto) a ser utilizada para essa proporção, considerando a concentração de 25ng/µL do vetor de tamanho 3500 pb, foi determinada pela seguinte equação:

$$X \text{ ng inserto} = \frac{10 \times Y \text{ pb produto PCR} \times 25\text{ng pCR-Blunt}}{3500 \text{ pb pCR-Blunt}}$$

A reação foi feita com a enzima *T4 DNA ligase* (Fermentas) na concentração final de 1U/µL, tampão 10x com ATP e o DNA purificado referente à CDK10. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 1 hora.

3.2.5. Transformação de células *E. coli* DH5- α CaCl₂ competentes

Foram utilizadas células de *E. coli* DH5- α CaCl₂ competentes para receber o vetor recombinante pCR-Blunt::*cdk10*. Uma alíquota de 100 μ L de células competentes foi descongelada em gelo e um volume de 1 μ L da reação de ligação foi adicionado cuidadosamente ao tubo de células. A mistura foi mantida durante 20 minutos em banho de gelo. A transformação foi feita por meio de choque térmico a 42°C por 2 minutos, e, em seguida, transferiu-se o tubo ao gelo, onde permaneceu por mais 3 minutos. Adicionaram-se 400 μ L de meio LB líquido ao tubo e o mesmo foi mantido sob agitação de 200rpm a 37°C por 1 hora. Decorrido esse tempo, 100 μ L do produto da transformação foram aplicados em uma Placa de Petri contendo meio LB-ágar e o antibiótico kanamicina 30 μ g/mL, com o auxílio de uma alça de vidro previamente flambada. Os 400 μ L restantes da reação foram aplicados em uma segunda placa, as quais foram mantidas a 37°C por cerca de 15 horas. Como o vetor pCR-Blunt possui genes que conferem resistência ao antibiótico kanamicina, somente as bactérias que receberam com sucesso o vetor transformado com o DNA da CDK10 puderam crescer nesse meio.

3.2.6. Análise do plasmídeo recombinante

Após a transformação e o crescimento das células competentes, é preciso confirmar se as colônias resultantes adquiriram o plasmídeo recombinante, e se o plasmídeo não sofreu mutação durante o procedimento. Para tal confirmação, foram selecionadas algumas dessas colônias, as quais foram submetidas à técnica de PCR de colônia e posterior sequenciamento.

Para o PCR de colônia, os clones selecionados foram dissolvidos cada um em 15,0 μ L de água autoclavada e aquecidos a 92°C por 20 minutos para rompimento da parede celular e liberação do material genético ao meio. Foi preparada uma reação com os oligonucleotídeos específicos para a CDK10 (Fw e Rv), mostrados na Tabela 1, e outra com os oligonucleotídeos específicos do vetor pCR-Blunt (M13 *forward* e M13 *reverse*), cujas sequências são provenientes do próprio vetor. Dessa forma, nas colônias onde o inserto se faz presente, os nucleotídeos são capazes de alinhar ao vetor em questão e o inserto pode ser amplificado e posteriormente visualizado, somando-se a uma pequena sequência da

região de múltipla clonagem (*polilinker*), em gel de agarose. Nas colônias em que o vetor não recebeu o inserto desejado, apenas a região de múltipla clonagem é amplificada e pode ser observada no gel de agarose, indicando a ausência do inserto.

Cada reação de PCR de colônia foi feita para um volume final de 10µL, usando a enzima *Taq DNA Polymerase* (*Fermentas*) (Tabela 3).

Tabela 3. Reação de PCR de colônias utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase* para confirmação da obtenção de colônias positivas para DNA referente à CDK10.

Reagentes	Volume (µL)
<i>Taq DNA Polymerase</i> (<i>Fermentas</i>)	0,1
<i>Primer M13 Forward</i> (100ng/µL) ou <i>primer forward</i> da <i>cdk10</i> (10µM)	0,4
<i>Primer M13 Reverse</i> (100ng/µL) ou <i>primer reverse</i> da <i>cdk10</i> (10µM)	0,4
MgCl ₂ 1,75mM	0,7
DNA plasmidial	3,0
dNTPs 10mM	0,4
10 x <i>Taq Buffer</i>	1,0
Água Milli-Q	4,0

O programa para amplificação do cDNA utilizado no termociclador foi o mesmo apresentado na Tabela 2, utilizando um gradiente de T_m de 69 a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%.

3.2.7. Purificação do plasmídeo recombinante pCR-Blunt::*cdk10*

Após a análise do gel de agarose, as colônias em que apareceu banda correspondente ao tamanho do fragmento de DNA da *cdk10* (colônias positivas) foram selecionadas e transferidas para tubos de ensaio para pré-inóculos contendo 5mL de meio LB líquido e o antibiótico kanamicina 30µg/mL, os quais foram mantidos a 37°C sob agitação a 200rpm por 14 horas. Os plasmídeos recombinantes foram, em seguida, purificados a partir do pré-inóculo com o kit de

extração *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). O produto da purificação foi analisado em gel de agarose 0,8%.

3.2.8. Reação de clivagem para liberação do DNA referente à CDK10

Para a recuperação do fragmento de DNA correspondente à CDK10 a partir do plasmídeo recombinante pCR-Blunt::*cdk10*, foi realizada reação de clivagem com as enzimas de restrição correspondentes aos sítios de restrição presentes nos *primers* específicos da *cdk10* (tabela 1). Seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante das enzimas *NdeI* e *BamHI* (New England BioLabs), foi utilizado o tampão com 100% de eficiência para ambas as enzimas e 0,5µL de cada enzima para a reação. Inicialmente, foi adicionada a enzima *NdeI* e a reação foi incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida, adicionou-se a enzima *BamHI* e a reação foi conduzida a 37°C por 4 horas adicionais. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 1,0%.

3.2.9. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão

Os vetores de expressão pET28a(+) e pET23a(+) (Novagen) foram escolhidos para a expressão da CDK10. Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para permitir uma rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. Estes plasmídeos contêm vários elementos importantes: o gene *lacI* que codifica a proteína repressora *lac*; o promotor T7 que é altamente específico para T7 RNA polimerase; um operador *lac* que bloqueia a transcrição; um sítio de policlonagem (*poli-linker*); uma origem f1 de replicação; e um gene de resistência a um determinado antibiótico. Na Figura 7 há um exemplo simplificado de um dos vetores do sistema pET, o pET28a(+).

Figura 7. Esquema do vetor pET28a(+). O vetor contém a região marcadora para resistência a kanamicina (azul), o gene *lacI* (verde), a origem de replicação *f1* (rosa) e a região de policlonagem (*pLink*) em preto. Entre o gene *lacI* e a região de policlonagem, estão o promotor de transcrição T7 e o operador *lac*, não mostrados na figura.

Fonte: Adaptado de Novagen, 2005.

O DNA de interesse é clonado no sítio de policlonagem, onde estão presentes os sítios para diversas enzimas de restrição. Ele não será transcrito se a enzima T7 RNA polimerase não estiver presente no meio. A cepa de *E. coli* BL21(DE3) é usada na expressão de vetores do sistema pET por ser geneticamente modificada para incorporar o gene T7 RNA polimerase, o promotor *lac* e o operador *lac* em seu genoma. Quando lactose, ou uma molécula similar à lactose, como IPTG (isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo), estiver presente na célula, a transcrição da T7 RNA polimerase é ativada, e a transcrição do DNA de interesse procede rapidamente.

No caso do pET28a(+), o gene que codifica a T7 RNA polimerase é precedido por uma sequência codificadora que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6xHis) na região N-terminal. A construção em pET28a(+) é resistente a kanamicina, enquanto a construção em pET23a(+) é resistente a ampicilina (NOVAGEN, 2005; ALBERTS et al., 2010).

Para a obtenção do plasmídeo recombinante para expressão, o DNA codificante foi inserido nos vetores de expressão pET28a(+) e pET23a(+) previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição usadas no passo **3.2.8. Reação de clivagem para liberação do DNA referente à CDK10**. O inserto digerido foi ligado aos vetores digerido com sítios de clonagens complementares na proporção de 3:1 (inserto:vetor). A quantidade de DNA a ser utilizada, considerando

a concentração de 25ng/μL de cada vetor, e os tamanhos 3666 pb do pET23a(+) e 5369pb do pET28a(+), foi determinada pela seguinte equação:

$$X \text{ ng inserto} = \frac{3 \times Y \text{ pb inserto} \times Z \text{ ng vetor}}{W \text{ pb vetor}}$$

A reação de ligação foi realizada a 16°C por 1 hora, utilizando a enzima *T4 DNA Ligase* 1U e tampão com ATP concentrado 10x (ambos da *Fermentas*).

Os plasmídeos recombinantes pET28a(+):*cdk10* e pET23a(+):*cdk10* foram utilizados no processo de transformação por meio de choque térmico em células de *E. coli* DH5α CaCl₂ competentes. As células transformadas foram aplicadas em placas contendo 20mL de meio LB sólido e os respectivos antibióticos (kanamicina para pET28a(+):*cdk10* e ampicilina para pET23a(+):*cdk10*) na concentração de 30μg/mL. Dentre as colônias que cresceram, foram selecionados alguns clones para a preparação de pré-inóculos.

3.2.10. Purificação dos plasmídeos recombinantes de expressão

Os pré-inóculos foram preparados com os respectivos antibióticos na concentração de 30μg/mL. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos com o kit de extração *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Fermentas*). Alíquotas do DNA plasmidial obtido a partir das células foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração do DNA purificado foi determinada pelo equipamento *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*.

3.2.11. Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes

Os clones pCR-Blunt::*cdk10*, pET28a(+):*cdk10* e pET23a(+):*cdk10* purificados foram sequenciados em sequenciador automático *ABI Prism 377-96 Collection* (*Applied Biosystem*), localizado no laboratório do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC). A reação foi preparada com aproximadamente 500ng do DNA plasmidial recombinante, 2,0μL de *Sequencing Reagent Premix* (uma mistura de dNTPs, ddNTPs e enzima) e 10pmol dos oligonucleotídeos comerciais presentes nos vetores pCR-Blunt (*primers* M13 *forward* e M13 *reverse*) ou pET (*primers* T7

promoter e *T7 terminator*), completando o volume final para 10µL com água Milli-Q autoclavada. O fragmento de interesse foi amplificado em termociclador conforme o ciclo apresentado na Tabela 4.

Após o sequenciamento, a sequência obtida foi submetida a uma busca no banco de dados público NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para analisar sua integridade.

Tabela 4. Programa de PCR do sequenciador automático utilizado para o sequenciamento dos insertos *cdk10* nos vetores pCR-Blunt, pET28a(+) e pET23a(+).

Temperatura (°C)	Tempo	Etapas	Ciclo
96	2 min	Desnaturação	1x
96	20 s	Desnaturação	35x
55	15 s	Anelamento	
68	1 min	Extensão	
4	indefinido		1x

3.3. Expressão da CDK10

3.3.1. Transformação em cepas de expressão

Para a expressão da CDK10 foi utilizado o protocolo desenvolvido por Leopoldino et al. (2006) para a expressão da CDK9. Os testes foram realizados nas cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pRiL, BL21(DE3)RP (*Novagen*) com os plasmídeos recombinantes pET28a(+):*cdk10*, pET23a(+):*cdk10* e pET28a(+):*cdk10* sintético (*EPOCH Life Science*). A Tabela 5 mostra as cepas de *E. coli* utilizadas para cada plasmídeo.

Tabela 5. Plasmídeos recombinantes de expressão e respectivas cepas de *E. coli* utilizadas na expressão da CDK10.

Plasmídeo	Cepas
pET23a(+>:: <i>cdk10</i>	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS BL21(DE3)pLysE
pET28a(+>:: <i>cdk10</i>	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS BL21(DE3)pLysE BL21(DE3)pRiL BL21(DE3)RP
pET28a(+>:: <i>cdk10</i> sintético	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS BL21(DE3)pLysE

As transformações foram procedidas pelo método do choque térmico como apresentado no item **3.2.5. Transformação de células *E. coli* DH5- α CaCl_2 competentes**. As colônias foram selecionadas em meio LB sólido contendo os antibióticos específicos para os plasmídeos recombinantes. No caso das cepas BL21(DE3)pRiL e BL21(DE3)RP, foi adicionado também o antibiótico cloranfenicol, específico para ambas as cepas, na concentração de 33 $\mu\text{g/mL}$.

A escolha das cepas de expressão foi baseada no estudo de compatibilidade entre a proteína CDK10, os vetores de expressão e as características intrínsecas de cada cepa, visando minimizar a proteólise, maximizar a expressão, minimizar a expressão de proteínas tóxicas à célula, facilitar o enovelamento da proteína e, consequentemente, aumentar sua solubilidade.

As cepas BL21(DE3) possuem o gene T7 RNA polimerase, como explicado no item **3.2.9. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão**. Adicionalmente, as cepas pLysS e pLysE possuem genes que codificam enzimas que degradam proteínas provenientes de expressão basal. Já as cepas pRiL e RP possuem cópias extras de genes que codificam tRNAs que reconhecem códons raros nas células de *E. coli*. Tais códons podem ser essenciais para a expressão, afetando a qualidade e quantidade das proteínas induzidas na célula hospedeira (GUSTAFSSON et al., 2004; YAN et al., 2004).

3.3.2. Testes de expressão

As colônias selecionadas após a confirmação da presença do vetor recombinante foram transferidas para tubos de ensaio com 5mL de meio LB líquido contendo os antibióticos específicos para cada cepa e plasmídeo recombinantes. Os pré-inóculos foram cultivados sob agitação de 250rpm a 37°C por aproximadamente 14 horas.

Decorrido esse tempo, uma alíquota de 1mL de cada pré-inóculo foi transferida para um novo frasco contendo 100mL de meio LB líquido e os respectivos antibióticos. A cultura foi conduzida a 37°C, a 180rpm, até a densidade óptica a 600nm atingir a absorbância entre 0,4 a 0,6. Neste ponto, a expressão foi induzida pela adição de IPTG em concentrações finais que variavam de 0,1 a 0,4mM. Para cada concentração de IPTG, foram conduzidos testes nas condições de 18°C por 12 horas, 20°C por 8 horas, 25°C por 6 horas, 30°C por 4 horas e 37°C por 3 horas.

Alíquotas de 1mL do meio de indução foram retiradas antes e depois da adição de IPTG, para comparar os padrões de expressão antes e após a indução, e foram centrifugadas por 2 minutos a 8000 rpm para recuperação das células, as quais foram ressuspensas em 40µL de água Milli-Q autoclavada e aplicadas em gel de poliacrilamida 12% para análise por eletroforese.

O restante de cada meio de indução, com conteúdo aproximado de 100mL, foi centrifugado a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C e as células foram armazenadas a -20°C para posterior teste de lise celular para recuperação da proteína CDK10.

Após as análises dos produtos dos testes de expressão, foram determinados os melhores parâmetros de tempo, temperatura e concentração de IPTG para 500mL de meio LB líquido, para expressão em maior quantidade.

3.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

As alíquotas retiradas das amostras induzidas e não induzidas que foram ressuspensas em água foram misturadas ao tampão de amostra com β -mercaptoetanol ou DTT (ditiotretitol) na proporção de 1:1 em volume. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com gel de empacotamento 5%, gel de separação 12%, voltagem de

100 Volts por aproximadamente 90 minutos. Foi utilizado o equipamento *Mini-Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad) para a eletroforese. O padrão de massa molecular usado foi o *Unstained Protein Molecular Weight Marker 14,4-116kDa* (Fermentas). Após o procedimento, o gel foi corado com o corante Azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R - Bio-Rad*) 0,25% em solução de etanol:ácido acético:água na proporção de 5:1:15 (v:v:v) por 20 minutos e descorado em solução de ácido acético:etanol:água 3:2:35 (v:v:v) por algumas horas.

3.3.4. Lise celular

As células recuperadas das amostras de indução foram submetidas ao processo de lise celular, a fim de liberar o conteúdo da célula e poder recuperar a proteína de interesse. Para cada 100mL de cultura, foi adicionado 5mL de tampão de lise. Para cada diferente protocolo de lise seguido, foram usados tampões adequados:

- Tampão A: 10mM Tris-HCl pH 7,4, 25mM NaCl, 1mM EDTA
- Tampão B: 25mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 50mM KCl, 2mM EDTA
- Tampão C: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM KCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA
- Tampão D: 50mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA
- Tampão E: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM KCl, 1mM EDTA
- Tampão F: 10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 100mM KCl, 1mM EDTA
- Tampão G: 25mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM KCl, 3% glicerol (v/v)
- Tampão H: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 300mM NaCl, 5mM DTT, 5% glicerol (v/v)
- Tampão I: 10mM HEPES pH 7,4, 25mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol (v/v), 0,5mM DTT

Após a ressuspensão das células com o tampão de lise apropriado, o processo de lise prosseguiu em duas etapas: a primeira etapa foi química com a ação de lisozima na concentração final de 0,5mg/mL, para digestão da parede bacteriana, e DNase 0,5U, para degradação do material genético presente no meio. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos. A segunda etapa da lise foi física, utilizando o sonicador *Branson Sonifier S250A* (*Soni-Tech Ultrasonic-Systems*). As amostras foram submetidas a 8 pulsos de 30 segundos com intervalos de 2 minutos, para aumentar o número de células lisadas e a concentração de

proteína solúvel. Em seguida, as amostras lisadas foram centrifugadas a 24.100g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante e o *pellet* foram armazenados a -20°C para posterior análise em gel de poliacrilamida 12%.

Na aplicação deste protocolo, utilizaram-se os tampões de A a F, no intuito de determinar uma condição ideal para a lise celular em que se obtivesse a maior quantidade possível de proteína solúvel. Nas amostras aplicadas em coluna de afinidade ao Níquel (item **3.4.1. Cromatografia de afinidade ao Ni²⁺**), o tampão utilizado foi o H, seguindo as especificações do manual do fabricante. As amostras aplicadas em coluna de afinidade ao ATP foram lisadas no tampão I (LEOPOLDINO et al., 2006).

O tampão G foi utilizado no emprego do protocolo de lise chamado *Freezing and Thawing* (congelamento e descongelamento). Este protocolo foi utilizado para testar a possibilidade de se obter uma maior eficiência na lise celular e maior estabilidade da proteína na fração solúvel. O sedimento celular foi submetido a 10 ciclos consistindo de: 1 minuto em banho de gelo e água seguido de 1 minuto em banho de gelo seco e etanol 80%. Em seguida, foi ressuspenso no tampão G e centrifugado a 24.000g por 20 minutos a 4°C.

Após cada protocolo de lise celular, uma alíquota da fração solúvel foi separada e adicionada ao tampão de amostra com β -mercaptoetanol na proporção de 1:1 em volume. A fração sólida (*pellet*) resultante foi ressuspensa em aproximadamente 5mL do próprio tampão de lise, e uma alíquota desta solução também foi retirada e a ela foi adicionado tampão de amostra. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para verificação da solubilidade da proteína.

Após as análises, foram determinados os melhores parâmetros para a lise celular, e as frações solúveis foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade ao níquel e ao ATP.

3.4. Purificação da proteína CDK10

3.4.1. Cromatografia de afinidade ao Ni²⁺

Os passos para a purificação da CDK10 foram estabelecidos de acordo com as características do vetor no qual ela foi expressa. O vetor de expressão pET28a(+)

apresenta uma sequência codificante para um grupo de 6 histidinas localizados na terminação 5' do inserto. Sendo assim, na construção pET28a::*cdk10*, uma cauda de histidina é codificada na região N-terminal da proteína CDK10 para posterior utilização durante sua purificação. Esses resíduos de histidina possuem forte afinidade por metais, como Ni^{2+} .

Considerando essa característica, utilizou-se o método de cromatografia por afinidade ao níquel, em que a proteína se liga fortemente, mas não covalentemente, a íons Ni^{2+} acoplados covalentemente a uma matriz inerte (fase estacionária). Ao se passar a solução proteica impura, a proteína de interesse se liga ao ligante imobilizado (neste caso, o Ni^{2+}), enquanto as demais substâncias são levadas pelo tampão (fase móvel). A proteína de interesse é recuperada pela passagem de outra substância com maior afinidade pelo ligante (eluente), liberando a proteína de interesse. No caso da resina contendo Ni^{2+} , o eluente utilizado é o Imidazol (VOET; VOET, 2006).

Dessa forma, as frações solúveis que apresentaram concentrações da proteína foram aplicadas em uma coluna de afinidade ao Níquel *ProfinityTM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad)*, contendo 4mL de resina e pré-equilibrada com tampão de lise H (50mM Tris-HCl pH 8,0, 300mM NaCl, 5mM DTT, 5% glicerol). A proteína foi eluída com soluções de Imidazol nas concentrações 50, 100, 250 e 500mM em tampão de lise H, utilizando 4mL de cada solução para eluição. As frações de 4 mL cada foram coletadas e foram retiradas alíquotas para análise em gel de poliacrilamida 12% por eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e a elas foi acrescentado tampão de amostra com DTT na proporção de 1:1 (v:v).

3.4.2. Cromatografia de afinidade ao ATP

Algumas amostras foram lisadas e aplicadas diretamente à coluna de afinidade ao ATP (*Sigma*). Outras foram purificadas previamente em coluna de afinidade ao níquel. No primeiro caso, o tampão de lise utilizado foi o tampão I (10mM HEPES pH 7,4, 25mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol (v/v), 0,5mM DTT). No segundo caso, as células haviam sido lisadas com o tampão H, e, para serem aplicadas à coluna de ATP, realizou-se uma diálise contra o tampão I, pois o tampão

H, para preservar a integridade da coluna de níquel, continha 300mM do sal NaCl, que compete com a proteína pela ligação com o ATP.

Foi utilizada uma coluna com 2mL de resina contendo ATP e a eluição foi feita com soluções de NaCl nas concentrações de 50, 100, 250 e 500mM em tampão I. As frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% por eletroforese SDS-PAGE.

3.5. Ensaio de solubilização da fração insolúvel

As proteínas humanas quando expressas em células bacterianas, podem apresentar-se desenoveladas, insolúveis, e quando isso ocorre, protocolos para a solubilização que permitam a obtenção da proteína na forma solúvel e enovelada devem ser usados. Uma das possibilidades é o uso de temperaturas diferentes de 37°C durante a expressão. Outra possibilidade é o uso de agentes químicos ou físicos, como a ureia e detergentes. Uma vez desnaturada, a proteína tem seus grupos apolares expostos ao solvente, aumentando sua solubilidade. No entanto, este método pode ser bastante agressivo com a proteína, tornando-a parcial ou completamente inativa.

3.5.1. Solubilização com kit *CellLytic B Plus Kit (Sigma)*

Muitos kits para solubilização são comercializados atualmente. O primeiro teste de solubilização da CDK10 foi realizado com o kit *CellLytic B Plus Kit (Sigma)*, fazendo uso de lisozima, inibidores de protease e benzonase. A obtenção de frações solúveis é avaliada pela análise da atividade específica.

3.5.2. Solubilização utilizando Ureia

Este protocolo testado consistiu no uso de ureia na concentração de 8M. A fração insolúvel ressuspensa em ureia foi deixada em temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, centrifugada a 24.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra tampão H (50mM Tris-HCl pH 8,0, 300mM NaCl, 5mM DTT, 5% glicerol), realizando-se trocas a cada 2 horas até que a solução proteica estivesse

livre de ureia e em condições de ser aplicada em coluna de afinidade ao níquel. As porções solúvel e insolúvel obtidas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%.

3.5.3. Solubilização utilizando hidrocloreto de guanidina

Outro protocolo testado incidiu no uso de hidrocloreto de guanidina 6M. A fração insolúvel foi concentrada realizando-se três centrifugações a 24000g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após cada centrifugação, o *pellet* foi ressuspensão em tampão de lise C (50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM KCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA). Após a terceira centrifugação, a porção insolúvel foi ressuspensa com a solução de hidrocloreto de guanidina 6M e dialisada contra o tampão C, realizando-se trocas a cada 2 horas. As frações resultantes de cada etapa foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%.

3.5.4. Solubilização utilizando 2-metil-2,4-pentanediol (MPD)

O MPD é um álcool que tem a capacidade de hidratar os peptídeos que se situam nas regiões mais internas da proteína, levando, dessa forma, a uma estabilização do seu estado nativo.

Neste protocolo, o *pellet* resultante da lise de 500mL de indução foi ressuspensão em 10mL de tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl. A amostra foi sonicada com 6 pulsos de 30 segundos cada e centrifugada a 7500rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante foi novamente ressuspensão no mesmo tampão, sonicado e centrifugado, restando somente a fração insolúvel da solução. Esta, por sua vez, foi ressuspensa em 20mL de solução contendo 50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl, SDS 2% em volume. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é acrescentado para promover a desnaturação da proteína, aumentando sua solubilidade. A amostra foi deixada sob agitação no gelo por 30 minutos.

Decorrido este tempo, foi adicionado 15mL de solução de MPD 2M e a solução foi deixada sob agitação por 24 horas a 4°C. Realizou-se diálise contra tampão H contendo MPD 2M. Desse modo, o SDS pode ser retirado lentamente da solução, minimizando os efeitos da mudança drástica de concentração do agente desnaturante, o que poderia causar a precipitação da proteína recém enovelada. Em

seguida, a solução foi dialisada contra tampão H para a retirada gradual do MPD, e a solução contendo a proteína solubilizada foi purificada em coluna de cromatografia de afinidade ao níquel *ProfinityTM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad)* e analisada em gel de poliacrilamida 12%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem

4.1.1. Amplificação do DNA codificante para CDK10

O DNA codificante para a CDK10 foi amplificado por PCR com eficiência usando a enzima 2x Phusion Master Mix (*Fynzymes*) nas doze temperaturas de anelamento escolhidas de acordo com a T_m dos *primers* (de 65 a 77°C). As melhores temperaturas de anelamento observadas foram entre 69 e 72°C, cujas bandas apresentavam forte intensidade, indicando a alta concentração do DNA amplificado. O produto da reação foi aplicado em gel de agarose 0,8% (Figura 8), a partir do qual foi purificado o DNA correspondente à CDK10 amplificado.

Figura 8. Produto de amplificação por PCR da CDK10 a partir de cDNA de CFH,. O gel mostra as 4 temperaturas mais eficientes. M: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (*Fermentas*). 1: *cdk10* obtida na reação com temperatura de anelamento 69°C. 2: *cdk10* obtida na reação com temperatura de anelamento 70°C. 3: *cdk10* obtida na reação com temperatura de anelamento 71°C. 4: *cdk10* obtida na reação com temperatura de anelamento 72°C. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Fonte: Autoria própria.

O DNA purificado com o kit *QIAquick Gel Extraction* (*QIAGEN*) pode ser observado no gel de agarose 0,8% mostrado na Figura 9. A concentração do DNA determinada pelo espectrofotômetro a 260nm foi de 213ng/μL.

Figura 9. Purificação do gel de agarose 0,8% contendo o DNA referente à CDK10 obtido por PCR. 1: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). 2: DNA referente à CDK10 humana após purificação com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) das reações com temperatura de anelamento entre 69 e 72°C. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta

Fonte: Autoria própria.

4.1.2. Obtenção do clone pCR-Blunt::*cdk10*

Após a reação de ligação do DNA codificante para a CDK10 ao vetor de clonagem pCR-Blunt (*Invitrogen*) conforme descrito no item **3.2.4. Clonagem do inserto *cdk10* no vetor de propagação pCR-Blunt**, o plasmídeo recombinante de clonagem pCR-Blunt::*cdk10* foi utilizado na transformação em células de *E. coli* CaCl₂ competentes. Algumas colônias cresceram, e para a confirmação da obtenção dos recombinantes, foi realizada reação de PCR de colônia com os *primers* específicos da *cdk10* e com os *primers* do vetor (M13 Fw e M13 Rv). O resultado das reações está apresentado na Figura 10.

Figura 10. Análise do vetor recombinante pCR-Blunt::*cdk10* obtido por PCR de colônias. M: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). 1: Colônia A com *primers* do vetor (M13 Fw e M13 Rv). 2: Colônia B com *primers* do vetor. 3: Colônia C com *primers* do vetor. 4: Colônia D com *primers* do vetor. 5: Colônia A com *primers* específicos do DNA da *cdk10*. 6: Colônia B com *primers* específicos do DNA da *cdk10*. 7: Colônia C com *primers* específicos do DNA da *cdk10*. 8: Colônia D com *primers* específicos do DNA da *cdk10*. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 10 observou-se que, na reação de PCR de colônias com os *primers* específicos da *cdk10*, não apareceu o DNA do tamanho esperado. No entanto, em duas colônias (C e D), a reação com os *primers* do vetor foi eficiente, indicando a possibilidade de essas colônias possuírem o plasmídeo recombinante. Uma forte banda apareceu na região de 1088 pb, (tamanho do inserto CDK10) em ambas colônias, e uma banda mais fraca na região de 4588 pb também foi observada. Essa banda é relativa ao tamanho do vetor de interesse, correspondendo a 1088pb do inserto CDK10 mais 3500 pb do vetor pCR-Blunt.

A colônia D foi escolhida para dar continuidade aos experimentos por ter apresentado uma banda de maior intensidade dentre as duas. Foi realizado pré-inóculo com esta colônia, a partir do qual o plasmídeo recombinante pCR-Blunt::*cdk10* foi purificado com o kit de extração *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) e analisado em gel de agarose 1,0% (resultado não mostrado). A concentração do vetor encontrada a partir da leitura da amostra a 260nm foi de 311,6ng/μL.

4.1.3. Clivagem para liberação do inserto *cdk10*

O plasmídeo recombinante pCR-Blunt::*cdk10* foi submetido à reação de clivagem para liberação do DNA correspondente à CDK10 e sua posterior ligação aos vetores de expressão. Como mostrado na Figura 11, o DNA referente à CDK10 foi liberado após a reação com as duas enzimas de restrição.

Figura 11. O gel mostra a reação de clivagem do plasmídeo recombinante pCR-Blunt::*cdk10* com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. M: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). 1: Controle (reação sem enzima). 2: Digestão somente com a enzima *NdeI*. 3: Digestão somente com a enzima *BamHI*. 4: Digestão com ambas as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 12 mostra o inserto CDK10 clivado com as enzimas de restrição e purificado a partir de gel agarose para posterior ligação nos vetores de expressão.

Figura 12. O gel mostra o fragmento *cdk10* clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e purificado a partir de gel de agarose. 1: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). 2: CDK10 purificado. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Fonte: Autoria própria.

4.1.4. Clivagem para abertura dos vetores de expressão pET23a(+) e pET28a(+)

Os vetores pET23a(+) e pET28a(+) também passaram por reação de clivagem com as enzimas *NdeI* e *BamHI* para poderem receber o fragmento referente ao DNA da CDK10. Essa etapa foi necessária pelo fato de os vetores de expressão terem sido obtidos na forma fechada e circular. Para que o inserto pudesse ser ligado aos vetores, se fez necessária a clivagem com as mesmas enzimas usadas na clivagem do inserto, a fim de formar extremidades coesivas.

A Figura 13 mostra os vetores pET23a(+) e pET28a(+) já clivados e purificados com o kit *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). As bandas relativas a ambos os vetores foram observadas nas alturas corretas: 3.666 pb para o pET23a(+) e 5.369 pb para o pET28a(+).

Figura 13. Vetores de expressão pET28a(+) e pET23a(+) (Novagen) clivados com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e purificados a partir de gel de agarose. M: Marcador *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas). 1: Vetor pET23a(+) clivado e purificado. 2: Vetor pET28a(+) clivado e purificado. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Fonte: Autoria própria.

4.1.5. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão

Após a obtenção do DNA referente à CDK10 e dos vetores de expressão, todos clivados e purificados, foi realizada a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células *E. coli* CaCl₂ competentes para a obtenção de uma grande quantidade de plasmídeo para ser usado posteriormente em cepas de expressão.

Adicionalmente a esse passo, foi levantada a hipótese de se obter comercialmente um vetor recombinante de expressão, pois os passos seguintes de expressão usando os vetores pET23a(+):*cdk10* e pET28a(+):*cdk10* não mostraram resultados significativos. A sequência de nucleotídeos referente à CDK10 foi estudada, bem como a sequência do vetor de expressão escolhido, levando-se em conta os sítios de enzimas de restrição presentes nelas. O vetor de expressão escolhido para a construção do plasmídeo sintético foi o pET28a(+), pelas vantagens apresentadas no item **3.2.9. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão**. Foi desenhada uma nova sequência para o plasmídeo recombinante de expressão pET28a(+):*cdk10* contendo sítios para as

enzimas de restrição *Bam*HI e *Sall* nas extremidades 5' e 3', respectivamente, do fragmento de DNA.

O plasmídeo recombinante sintético de expressão pET28a(+):*cdk10* possui 6460 pb (5369 pb do vetor e 1091 pb da *cdk10*) e foi fabricado pela empresa EPOCH Life Science.

Uma alíquota de 1µL do plasmídeo sintético (80ng/µL) foi utilizada para a transformação em *E. coli* DH5α CaCl₂ competentes. As colônias foram selecionadas pela presença do antibiótico kanamicina (30µg/mL), ao qual o vetor pET28a(+) possui resistência. Os plasmídeos recombinantes foram purificados a partir de pré-inóculo e mantidos em freezer a -80°C na presença de glicerol 50%.

Apesar de o fornecedor realizar o sequenciamento do DNA sintetizado, novo sequenciamento do plasmídeo recombinante pET28a::*cdk10* foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Biofísica do IFSC, confirmando a integridade da sequência como mostrado na Figura 14.

Figura 14. Trecho do sequenciamento automático do DNA referente à CDK10. A figura mostra o alinhamento da sequência obtida por meio dos sequenciamentos realizados a partir das extremidades 5' e 3' do DNA alvo e CDK10_NCBI (sequência fornecida pelo banco de dados NCBI – *National Center for Biotechnology Information*). Em toda a sequência, observa-se a integridade da sequência do DNA sequenciado.

Fonte: Autoria própria

4.2. Expressão da CDK10 e lise celular

Os ensaios de expressão da CDK10 nos vetores pET23a(+) e pET28a(+) foram conduzidos segundo descrito no item **3.3.2. Testes de expressão**. As figuras 15, 16 e 17 mostram alguns dos resultados obtidos nestes primeiros testes de expressão. O tamanho estimado da proteína CDK10 é de 39 kDa, sendo que, quando expressa no vetor pET28a(+), esse tamanho aumenta ligeiramente devido à presença da cauda de His.

Figura 15. Análise da expressão da CDK10 em células *E. coli* BL21(DE3). Indução com 0,1mM de IPTG, a 30°C por 4 horas. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. 1: Induzido em pET28a(+). 2: Não induzido em pET28a(+). 3: Induzido em pET23a(+). 4: Não induzido em pET23a(+). SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie. As amostras identificadas como “não induzido” correspondem ao extrato de proteínas totais antes da indução, e as amostras identificadas como “induzido” se referem ao extrato de proteínas totais após indução.

Fonte: Autoria própria.

Figura 16. Análise da solubilidade da CDK10 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS a partir do teste de lise celular. 1: Não induzido em pET23a(+). 2: Induzido em pET23a(+) não lisado. 3: Porção solúvel do induzido em pET23a(+). 4: Porção insolúvel do induzido em pET23a(+). 5: Não induzido em pET28a(+). 6: Induzido em pET28a(+) não lisado. 7: Porção solúvel do induzido em pET28a(+). 8: Porção insolúvel do induzido em pET28a(+). M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Figura 17. Análise de expressão e solubilidade da CDK10 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysE utilizando o vetor pET28a(+). Indução com 0,2mM de IPTG a 25°C por 6 horas. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. 1: Não induzido 2: Induzido não lisado. 3: Porção solúvel. 4: Porção insolúvel. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostrados nas figuras 15, 16 e 17 são apenas representativos de dezenas de testes de expressão e de lise realizados com os plasmídeos construídos pET23a(+):*cdk10* e pET28a(+):*cdk10*. Observou-se que, em todas as cepas e condições experimentadas, a expressão da CDK10 ocorreu em grande quantidade. Porém, após a lise celular, foi observado que a proteína permaneceu insolúvel em todas as cepas.

Devido a esse resultado insatisfatório, optou-se por utilizar o plasmídeo sintético pET28a(+):*cdk10* (EPOCH), segundo foi descrito no item **4.1.5. Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão**. O vetor sintético foi transformado em células de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysE, seguindo o protocolo descrito no item **3.2.5. Transformação de células *E. coli* DH5- α CaCl₂ competentes**. As condições de expressão testadas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de expressão testadas com o plasmídeo de expressão sintético pET28a(+):*cdk10*. A melhor condição observada está destacada em cinza, condição esta que ocasionou produção de pequena quantidade de proteína solúvel.

	Linhagem	Concentração de IPTG (mM)	Temperatura (°C)	Tempo de indução (horas)
1	BL21(DE3)	0,1	37	3
2			30	4
3		0,4	37	3
4			30	4
5		0,05	37	3
6			30	4
7			25	6
8			20	8
9		0,1	37	3
10			30	4
11			25	6
12			20	8
13		0,4	37	3
14			30	4
15			25	6
16			20	8
17	BL21(DE3)pLysE	0,05	37	3
18			30	4
19			25	6
20			20	8
21		0,1	37	3
22			30	4
23			25	6
24			20	8
25		0,4	37	3
26			30	4
27			25	6
28			20	8

As bandas do gel, obtidas a partir da expressão da CDK10, são bem acentuadas em todas as cepas. Todas as amostras foram submetidas à lise celular,

e foi observado que a proteína CDK10 permanecia na porção insolúvel, com exceção da condição de número 10 mostrada na tabela 6, que apresentou uma pequena quantidade de proteína solúvel. O gel relativo a essa condição está apresentado na Figura 18.

Figura 18. Análise da lise celular a partir da expressão do plasmídeo sintético pET28a(+):*cdk10* em BL21(DE3)pLysS, com 0,1mM de IPTG a 30°C por 4 horas. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. 1: Não induzido. 2: Porção solúvel. 3: Porção insolúvel. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 18 mostra uma fração de proteína solúvel que foi preparada para purificação em coluna por afinidade ao Níquel *Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin* (Bio-Rad), e posterior teste de afinidade ao ATP utilizando a coluna de afinidade Agarose-ATP (Sigma) (item **4.4. Purificação por cromatografia de afinidade ao ATP**). Esta amostra não se ligou com eficiência às colunas, impossibilitando a obtenção de uma fração de concentração mínima o suficiente para prosseguir com as etapas de separação (dados não mostrados).

A justificativa encontrada para tal resultado baseia-se na baixa quantidade de proteína solúvel obtida, sendo de difícil visualização após as diluições nas etapas de purificação. Outra explicação plausível é o fato de que a cauda de His, responsável pela afinidade da proteína à resina de Ni^{2+} , pode ter ficado em um local menos acessível na estrutura proteica, uma vez que a proteína pode ter se reenovelado de maneira incorreta durante a expressão. Dessa forma, a cauda de His ficaria

impedida de interagir com os átomos de níquel da coluna, o que justificaria a presença de proteína antes da purificação em coluna de níquel e sua ausência após a purificação.

4.3. Ensaio de solubilização e purificação por cromatografia de afinidade por níquel

Devido aos resultados obtidos após as tentativas de purificação da CDK10 obtida a partir da expressão do plasmídeo sintético pET28a(+):*cdk10* em BL21(DE3)pLysS, foram aplicados diversos protocolos de solubilização nas frações insolúveis (majoritárias) obtidas no mesmo ensaio de expressão, na tentativa de obter uma quantidade de CDK10 solúvel suficiente para prosseguir com a separação e posteriores testes de atividade.

4.3.1. Solubilização com kit *CellLytic B Plus Kit (Sigma)*

O kit utilizado para esse procedimento mostrou-se bastante eficaz na solubilização da CDK10. A Figura 19 mostra que uma parte significativa da proteína foi solubilizada. Essa solução foi aplicada diretamente em coluna de afinidade ao níquel *ProfinityTM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad)*, resultado mostrado na Figura 20.

Figura 19. Análise do teste de solubilização com o kit *CellLytic B Plus Kit* (Sigma) da fração insolúvel obtida após expressão do plasmídeo sintético pET28a(+):*cdk10* em BL21(DE3)pLysS, com 0,1mM de IPTG a 30°C por 4 horas. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Não induzido 2: Induzido. 3: Porção solúvel. 4: Porção insolúvel. 5: Porção solúvel após procedimento com o kit. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Análise da purificação da porção solúvel obtida após a solubilização da CDK10 com o kit *CellLytic B Plus Kit* (Sigma) em coluna de afinidade ao Níquel. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Células lisadas – fração solúvel antes da solubilização. 2: Células lisadas – fração insolúvel antes da solubilização. 3: Fração insolúvel remanescente após procedimento de solubilização. 4: Fração solúvel remanescente após procedimento de solubilização. 5: Extrato de proteína total após aplicação na coluna de purificação. 6: Solução recolhida da coluna após passagem de tampão; 7: Solução recolhida da coluna após passagem de Imidazol 1M. 8: Solução recolhida da coluna após lavagem final com tampão. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Analisando a Figura 20, observou-se que a proteína pôde ser recuperada após a purificação. No entanto, as amostras colhidas desta purificação apresentaram impurezas menos de 24 horas após o procedimento. Concluiu-se que tais impurezas se tratavam da própria proteína CDK10 precipitada, uma vez que as

soluções foram centrifugadas e as respectivas frações solúveis foram aplicadas em novo gel de Poliacrilamida 12%, e nenhuma proteína foi observada (Figura 21).

Por se tratar de um kit com alto custo, optou-se por não dar continuidade com os testes de solubilização fazendo uso do mesmo.

Figura 21. Análise das amostras purificadas 24 horas após a purificação. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Solução recolhida da coluna de afinidade ao níquel após passagem de Imidazol 1M. 2: Solução recolhida da coluna após lavagem final com tampão. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

4.3.2. Solubilização utilizando Ureia

A ureia, assim como o hidrocloreto de guanidina, é conhecida por promover o desenovelamento das proteínas, estabilizando o estado desenovelado com relação ao estado nativo pela exposição dos grupos apolares ao solvente. Dessa forma, a proteína que fora expressa na forma insolúvel passa a se apresentar solúvel no meio, podendo ser separada do restante do material insolúvel proveniente da lise celular. Após essa separação, a proteína deve ser novamente enovelada da forma mais eficaz possível, a fim de recuperar sua forma e função originais. Para que isso ocorra, o agente desnaturante deve ser retirado de forma branda e lenta, para que não haja variação abrupta no meio em que a proteína se encontra, uma vez que um mínimo de perturbação pode levar à precipitação da proteína. A forma mais usual de se retirar o agente desnaturante é realizando-se diálise contra o tampão em que a proteína está solubilizada e diminuindo-se gradativamente a concentração do agente desnaturante desse tampão.

Foram realizados vários ensaios de solubilização com ureia, porém todos repetiram os resultados mostrados na Figura 22. Como se pode observar, nenhuma proteína é observada após o procedimento de solubilização.

Figura 22. Análise da solubilização da CDK10 utilizando Ureia 4M. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Extrato de proteína total. 2: Primeira lavagem da coluna de afinidade ao níquel com 2mL de tampão. 3: Segunda lavagem da coluna com 2mL de tampão. 4: Extração com 2mL de Imidazol 50mM. 5: Extração com 2mL de Imidazol 100mM. 6: Extração com 2mL de Imidazol 250mM. 7: Extração com 2mL de Imidazol 500mM. 8: Lavagem final da coluna com 4 mL de tampão. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

4.3.3. Solubilização utilizando Hidrocloreto de Guanidina

O procedimento de solubilização com hidrocloreto de guanidina também não mostrou resultados satisfatórios, como pode ser observado na Figura 23. Grande parte da proteína permaneceu na fração insolúvel após o processo de solubilização, o que foi observado em uma forte banda na Figura 24.

Figura 23. Análise da solubilização da CDK10 com hidrocloreto de guanidina 6M. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)*. 1: Cultura não induzida. 2: Cultura induzida. 3: Células lisadas – porção solúvel. 4: Células lisadas – porção insolúvel. 5: Resíduo solúvel após primeira lavagem da coluna de afinidade ao níquel. 6: Resíduo solúvel após segunda lavagem. 7: Resíduo solúvel após terceira lavagem. 8: Resíduo insolúvel após terceira lavagem (etapa imediatamente anterior à diálise contra hidrocloreto de guanidina 1M). SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Análise do teste de solubilidade com hidrocloreto de guanidina 6M, mostrando que a proteína permaneceu na fração insolúvel. 1: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)*. 2: Fração insolúvel resultante após o processo de solubilização da CDK10. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

4.3.4. Solubilização utilizando MPD

Após este procedimento, também não foi observada proteína na fração solúvel. O protocolo foi repetido inúmeras vezes, aumentando ou diminuindo o tempo de diálise, mas nenhuma diferença foi encontrada entre os resultados, o que foi comprovado pelo gel de poliacrilamida 12% presente na Figura 25.

Figura 25. Análise da solubilização da CDK10 utilizando MPD. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Extrato de proteína total. 2: Primeira lavagem da coluna de afinidade ao níquel com 2mL de tampão. 3: Segunda lavagem da coluna com 2mL de tampão. 4: Extração com 2mL de Imidazol 50mM. 5: Extração com 2mL de Imidazol 100mM. 6: Extração com 2mL de Imidazol 250mM. 7: Extração com 2mL de Imidazol 500mM. 8: Lavagem final da coluna com 4 mL de tampão. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

4.4. Purificação por cromatografia de afinidade ao ATP

A coluna de ATP foi construída a partir da deposição de uma solução concentrada de ATP (*Sigma*) em uma coluna de 12 cm vazia. Como a maioria dos testes de solubilização não mostraram resultados satisfatórios, foi escolhida a amostra solúvel do lisado descrito no item 4.2. **Expressão da CDK10 e lise celular**, resultado da expressão do plasmídeo recombinante sintético pET28a(+):*cdk10* em BL21(DE3)pLysS usando 0,1mM de IPTG a 30°C por 4 horas (Figura 18) para os testes de ligação com o ATP. Apesar de o gel ter mostrado uma pequena quantidade de proteína, esperava-se que toda a proteína estivesse ativa e que, portanto, ligar-se-ia à matriz de ATP.

No entanto, a Figura 26 mostra que nenhuma proteína ligou-se à coluna de ATP. Muitos fatores podem ter ocasionado esse resultado. Não se pode descartar a hipótese de que a banda observada na figura 18 pertencia a alguma outra proteína de tamanho próximo à CDK10.

Figura 26. Análise da purificação da CDK10 por cromatografia de afinidade por ATP. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). 1: Extrato de proteína total. 2: Lavagem da coluna de afinidade ao ATP com 2mL de tampão A. 3: Extração com 2mL de NaCl 50mM em tampão A. 4: Extração com 2mL de NaCl 250mM em tampão A. 5: Extração com 2mL de NaCl 500mM em tampão A. SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie.

Fonte: Autoria própria.

Porém, admitindo que a proteína em questão fosse realmente a CDK10, a não ligação à coluna pode ser justificada pela presença de agentes desnaturantes ou parcialmente desnaturantes no meio proteico, além de mudanças de pH, temperatura e concentração de íons necessários que podem desestabilizar a estrutura da proteína, levando a sua desnaturação e explicando a falta de especificidade com o ATP. Outra hipótese é a presença de muitas proteínas no meio com afinidade ao ATP, o que realmente deve ser considerado, podendo ocasionar a falta de especificidade com a proteína em questão. Dessa forma, a cromatografia em coluna de afinidade por ATP não seria um método de purificação a ser utilizado como única etapa de separação da proteína de interesse, e sim um método que deve ser associado a outras metodologias de separação, como por exemplo, a cromatografia por troca iônica, ou de filtração em gel.

Descartando todas essas hipóteses, pode-se considerar que a baixa quantidade de proteína pode ter dificultado a visualização em gel de poliacrilamida, uma vez que, durante o processo de purificação, a solução de interesse é diluída algumas vezes. Pode-se considerar, também, que o sítio de ligação da CDK10 com o ATP estivesse sendo bloqueado por algum substrato competitivo presente no meio, ou até mesmo sendo bloqueado pela própria proteína, deixando o sítio de

ligação mais próximo do centro da estrutura e, desse modo, menos susceptível à aproximação das moléculas de ATP.

É muito comum acontecer essas pequenas mudanças na configuração espacial da proteína após diversas etapas de purificação e/ou solubilização. Entretanto, essas mudanças são intensas o bastante para que a proteína não esteja em condições de ser estudada após tais etapas.

5.CONCLUSÃO

As reações de ligação do DNA da *cdk10* em vetores de propagação pCR-Blunt e de expressão pET28a(+) e pET23a(+) foram bem sucedidas, o que foi comprovado pela análise do sequenciamento do fragmento e análise dos testes de expressão heteróloga.

A proteína CDK10 atingiu um alto nível de expressão nas cepas testadas. No entanto, a proteína permaneceu insolúvel mesmo após a aplicação de protocolos de solubilização. Assim sendo, foi adquirido o plasmídeo sintético pET28a(+):*cdk10*, na tentativa de melhorar o padrão de expressão, desde que haviam ocorrido vários problemas nas etapas de preparação do DNA recombinante.

A CDK10 expressa a partir do plasmídeo recombinante sintético foi obtida em pequena quantidade solúvel e em maior quantidade insolúvel. As frações insolúveis passaram por métodos diversos de solubilização, os quais se mostraram ineficientes nas condições testadas. Já a fração solúvel foi purificada em coluna de afinidade ao Níquel e em coluna de afinidade ao ATP. Após as análises, foi observado que a proteína não se ligou à coluna, ou se ligou com baixa eficiência, o que pode ser justificado pela baixa quantidade de proteína solúvel obtida. Outra explicação plausível para tal resultado é o fato de que a cauda de His, responsável pela ligação da proteína à resina, pode ter ficado em um local menos acessível na estrutura proteica, uma vez que a proteína pode ter se reenovelado de maneira incorreta durante a expressão. O mesmo pode ser dito sobre o sítio de ligação com o ATP, justificando a não especificidade da CDK10 à coluna de afinidade ao ATP.

Os resultados mostraram que o sistema bacteriano foi capaz de produzir a proteína CDK10 em grande quantidade, o que não havia sido observado em nenhum trabalho até então publicado sobre a CDK10. Porém, a CDK10 foi expressa na forma insolúvel e, portanto, inativa. Mais testes deverão ser realizados com o objetivo de estabelecer as melhores condições de expressão e, se necessário, de solubilização para a CDK10 e, conseqüentemente, determinar padrões de atividade e outras características importantes da proteína.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. Ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1268 p.

BAGELLA, L.; GIACINTI, C.; SIMONE, C.; GIORDANO, A. Identification of Murine cdk10: Association with Ets2 transcription factor and effects on the cell cycle. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, p. 978-985, 2006.

BENSON, C.; KAYE, S.; WORKMAN, P.; GARRET, M.; WALTON, M.; BONO, J.; Clinical anticancer drug development: targeting the cyclin-dependent kinases. **British Journal of Cancer**, v. 92, p. 7-12, 2005.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114 p.

BRAMBILLA, R.; DRAETTA, G. Molecular cloning of PISSLRE, a novel putative member of the cdk family of protein serine/threonine kinases. **Oncogene**, v. 9, p. 3037-3041, 1994.

CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson, 2007. v. 2.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica**, Section D, v.50, p. 760-763, 1994.

DE AZEVEDO JUNIOR, W. F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S.-H. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 518-526, 1997.

DE AZEVEDO JUNIOR, W. F.; MUELLER-DIECKMANN, H. J.; SCHULZE-GAHMEN, U.; WORLAND, P. J.; SAUSVILLE, E.; KIM, S.-H. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, p. 2735-2740, 1996.

DELEAGE, G.; GEOURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. **Computational Applied Bioscience**, v. 9, p. 197-199, 1993.

DOONAN, J. H.; KITSIOS, G. Functional evolution of cyclin-dependent kinases. **Molecular Biotechnology**, v. 42, p. 14-29, 2009.

GALLORINI, M.; CATALDI, A.; GIACOMO, V. Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy. **Biodrugs**, v. 26, n. 6, p. 377-391, 2012.

GRAÑA, X.; CLAUDIO, P. P.; DE LUCA, A.; SANG, N.; GIORDANO, A. PISSLRE, a human novel CDC2-related protein kinase. **Oncogene**, v. 9, p. 2097-2103, 1994.

HOWE, C. **Gene cloning and manipulation**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 1997. v. 2.

IORNS, E.; TURNER, N. C.; ELLIOTT, R.; SYED, N.; GARRONE, O.; GASCO, M. Identifications of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. **Cancer Cell**, v. 13, p. 91-104, 2008.

JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.

KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. **Oncogene**, v. 20, p. 1832-1838, 2001.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 417-425, 2002.

LEOPOLDINO, A. M.; CANDURI, F.; CABRAL, H.; JUNQUEIRA, M.; MARQUI, A. B. T.; APPONI, L. H.; FONSECA, I. O.; DOMONT, G. B.; SANTOS, D. S.; VALENTINI, S.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; FOSSEY, M. A.; AZEVEDO, W. F.; TAJARA, E. H. Expression, purification and circular dichroism analysis of human CDK9. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 614-620, 2006.

LESLIE, A. G. W. **Crystallography computing**. London: Oxford University Press, 1990. p. 27-38.

LI, S.; MACLACHLAN, T. K.; DE LUCA, A.; CLAUDIO, P. P.; CONDORELLI, G.; GIORDANO, A. The cdc2-related Kinase, PISSLRE, is essential for cell growth and acts in G2 phase of the cell cycle. **Cancer Research**, v. 55, p. 3992-3995, 1995.

MALUMBRES, M.; HARLOW, E.; HUNT, T.; HUNTER, T.; LAHTI, J. M.; MANNING, G. MORGAN, D. O.; TSAI, LI-HUEI.; WOLGEMUTH, D. J. Cyclin dependent kinases: a family portrait. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1275-1276, 2009.

MEIJER, L.; KIM, S.-H. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Methods in Enzymology**, v. 283, p. 113-128, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica, 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NOVAGEN. **pET System manual**: the GOLD standard for protein expression. Darmstadt: EMD Biosciences, 2005. 80 p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v. 3.

SCHULTZE-GAHMEN, U.; BRANDSEN, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; MEIJER, I.; VESELY, J.; KIM, S. H. Multiple modes of ligand recognition: Crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 22, p. 378-391, 1995.

SREERAMA, N.; WOOD, R. W. Protein secondary structure from Circular Dichroism Spectroscopy: Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. **Journal of Molecular Biology**, v.242, p. 497-507, 1994.

SUN, M.; LI, Z.; ZHANG, Y.; ZHENG, Q.; SUN, C.-C. Homology modeling and docking study of cyclin-dependent kinase (CDK) 10. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2851-2856, 2005.

THERMO SCIENTIFIC PIERCE PROTEIN BIOLOGY PRODUCTS. **Phosphorylation**. 2011. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/phosphorylation>>. Acesso em: 30 nov. 2013.

VOET, D.; VOET, G. J. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1596 p.