Diandra Pinheiro Alencar

**Obtenção e caracterização estrutural da proteína humana Quinase
Dependente de Ciclina 9 (CDK9) utilizando o sistema bacteriano de
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Canduri

São Carlos

2019

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.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Alencar, Diandra Pinheiro

Obtenção e caracterização estrutural da proteína humana Quinase Dependente de Ciclina 9 (CDK9) utilizando o sistema bacteriano de *Escherichia coli* / Diandra Pinheiro Alencar. — São Carlos, 2019.
87 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2019.
Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

1. Quinase dependente de ciclina 9. 2. CDKs. 3. Expressão heteróloga. 4. Caracterização estrutural. 5. Proteínas. I. Título.

Aos meus pais, José Roberto e Deyse, que com muito carinho, apoio e cuidados, não mediram esforços para que eu pudesse alcançar mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as bênçãos que tenho alcançado, por me guiar nos momentos difíceis, por me acompanhar em espírito e me proteger onde quer que eu esteja. Somente por Ele, consegui chegar até aqui.

Também sou grata aos meus pais José Roberto e Deyse, meu irmão Jonathan, e à minha avó Darci por todo apoio e incentivo que me deram para perseguir meus sonhos longe de casa.

À minha orientadora, professora Fernanda Canduri, agradeço imensamente pela paciência, pela orientação, pelos conselhos, e por seu jeito calmo que conseguiu me tranquilizar e incentivar em momentos de ansiedade e desânimo.

Agradeço às minhas amigas, companheiras de laboratório, Jessyka e Rebeka, que estão comigo nesta caminhada desde o início do mestrado, sempre me animando, ajudando, ouvindo minhas tagarelices; e também a Fernanda Coelho e a Tatiane, amigas que conheci durante o mestrado e sou grata por isso. À estas quatro pessoas incríveis, sou muito grata por todo o apoio, conselhos e amizade que recebi.

Agradeço pela amizade e a oportunidade de trabalhar com a Milena, aluna de iniciação científica, que me acompanhou durante os últimos oito meses de pesquisa, ajudando nos experimentos e estando sempre disposta a aprender. Sendo determinada e empenhada do jeito que é, tenho certeza que alçará longos voos.

Sou grata também por ter conhecido a Buana Carvalho, e ter sido muito bem recebida por ela no laboratório. Mesmo nos dias mais corridos, sua paciência em me ensinar e em me ouvir nunca será esquecida.

Agradeço aos colegas da pós-graduação, Fabiana, Noeli, Darlon, Fernanda Reis, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, trocando ideias e experiências.

Agradeço às minhas amigas, Mariana, Juliana e Marciele, que mesmo estando longe, sempre torceram por mim e me apoiaram incondicionalmente.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP, pela concessão da bolsa de auxílio e financiamento do projeto de pesquisa, respectivamente.

*“Nada na vida deve ser temido,
apenas compreendido. Agora é o
momento de compreender mais, para
que possamos temer menos.”*
- Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são enzimas que possuem funções específicas ou redundantes no ciclo celular e na transcrição genética, e possuem atividade de serina/treonina quinase, a qual é regulada por uma outra proteína denominada ciclina. No genoma humano já foram identificadas 21 CDKs, sendo as CDKs 1-6, 11^{P58}, 11^{P110} e 14-18 reguladoras do ciclo celular, e as CDKs 7-10, 12, 13, 19, 20 reguladoras da transcrição. Este trabalho de pesquisa buscou expressar a CDK9 no sistema bacteriano de *Escherichia coli*, purificá-la por cromatografia líquida de alta eficiência, estudar a sua estrutura nativa e verificar sua interação com o ATP. Diversos testes de expressão da CDK9 na cepa de *E. coli* BL21(DE3) foram realizados, nos quais as variáveis foram temperatura e tempo de indução. Nos experimentos, a CDK9 foi obtida insolúvel; portanto, após a lise celular, foram testados métodos de solubilização e de cromatografia (de interação hidrofóbica, de afinidade a íon metálico e de exclusão molecular), em várias condições experimentais, para o reenovelamento e purificação da proteína de interesse. Após a otimização das etapas de expressão e purificação, foram realizados experimentos de caracterização e estabilidade estruturais. O espectro de dicroísmo circular (CD) da CDK9, purificada e reenovelada em coluna de afinidade, apresentou elementos de estrutura secundária muito próximos aos encontrados na literatura. A desnaturação térmica monitorada por CD se mostrou um processo de dois estados (nativo e desenovelado); com a temperatura de desnaturação da CDK9 determinada em aproximadamente 65,9°C, na concentração de 6 µM. A desnaturação química induzida por ureia, medida por fluorescência, foi também caracterizada como um processo de dois estados. O experimento de titulação da proteína com ATP mostrou a supressão da fluorescência intrínseca da CDK9 como resultado da interação proteína-ligante. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a expressão heteróloga da CDK9 em *E. coli*, e os métodos de reenovelamento e purificação, os quais apresentam procedimentos simples e não requerem materiais de alto custo, foram eficazes na obtenção da CDK9 nativa em alto rendimento, podendo assim, ser aplicados para novos estudos *in vitro* da CDK9.

Palavras-chave: *Quinase dependente de ciclina 9, CDKs, expressão heteróloga, caracterização estrutural*

ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are enzymes that have specific or redundant roles in cell cycle and gene transcription, and possess serine/threonine kinase activity, which is regulated by another protein named cyclin. In human genome, 21 CDKs have already been identified, among which CDKs 1-6, 11^{P58}, 11^{P110} and 14-18 are cell cycle regulators, and CDKs 7-10, 12, 13, 19, 20 are transcription regulators. This research aimed to express CDK9 in *Escherichia coli* bacterial system, purify it by high performance liquid chromatography, study its native structure and verify its interaction with ATP. Several tests were performed to induce CDK9 expression in the *E. coli* strain BL21(DE3), in which temperature and induction time were the variables. CDK9 was obtained insoluble in the experiments; therefore several solubilization methods and chromatography techniques (hydrophobic interaction, metal affinity and size exclusion), in various experimental conditions, were applied to refold and purify the protein of interest after cell lysis. After optimization of the expression and purification steps, structural characterization and stability experiments were performed. The circular dichroism spectrum of CDK9, purified and refolded by affinity chromatography, presented secondary structure elements very close to those found in the literature. Thermal denaturation monitored by CD showed to be a two state (native and unfolded) process, with CDK9 melting temperature determined to be approximately 65,9°C, at concentration of 6 µM. Urea-induced CDK9 denaturation, monitored by fluorescence, was also characterized as a two state process. Titration of CDK9 with ATP showed the CDK9 intrinsic fluorescence quenching upon protein-ligand interaction. The results obtained in this research proved that CDK9 heterologous expression in *E. coli*, and the refolding/purification methods, which have simple procedures and do not require any expensive materials, were effective in obtaining native CDK9 in high yields; therefore, they can be applied in new *in vitro* studies of CDK9.

Keywords: Cyclin-dependent kinase 9, CDKs, heterologous expression, structural characterization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relações evolucionárias entre as subfamílias de CDK humanas determinadas por análise filogenética baseada na similaridade dos domínios quinase humanos.....	17
Figura 2. Ativação das CDKs pela fosforilação da alça T por uma quinase ativadora de CDK (CAK)	18
Figura 3. Estrutura do gene da CDK9	21
Figura 4. Estrutura cristalográfica da CDK9 em complexo com AMPPNP, um análogo de ATP (PDB 3BLQ).....	23
Figura 5. Mecanismo simplificado da reação de transferência do fosfato γ do ATP para um resíduo de serina do substrato, catalisada pela CDK9	24
Figura 6. Sequência primária da CDK9 e a correlação com elementos de estrutura secundária	26
Figura 7. Via do enovelamento da CDK9 pelas chaperonas Hsp70 e Hsp90/Cdc37.	27
Figura 8. Função do P-TEFb no controle da transcrição da RNA polimerase II	30
Figura 9. Ciclo catalítico da CDK9 na fosforilação do CTD da RNA polimerase II....	31
Figura 10. Associação do P-TEFb com as proteínas do complexo 7SK snRNP e a proteína Brd4	33
Figura 11. Mapa do plasmídeo usado para expressão da CDK9 em <i>E. coli</i> , contendo o vetor pET28a(+) e a sequência completa da CDK9	48
Figura 12. Alinhamento da sequência de nucleotídeos da CDK9 humana (NM_001261.4:116-1234) com a sequência encomendada pela empresa <i>Epoch Life Sciences</i> , e o resultado do sequenciamento para o molde direto (nucleotídeos 1 ao 650) e o molde reverso (nucleotídeos 651 ao 1348, em caixa pontilhada)	49
Figura 13. Gel de SDS-PAGE dos experimentos de indução com 0,1 mM de IPTG em diversas temperaturas	50
Figura 14. Testes de solubilidade da CDK9 em diferentes concentrações de NaCl no tampão de lise	51
Figura 15. Gel de SDS-PAGE dos testes de reenovelamento da CDK9 por precipitação do SDS com KCl	54

Figura 16. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de afinidade ao níquel	55
Figura 17. Géis de SDS-PAGE 15% do teste de reenovelamento e purificação da CDK9 por precipitação do SDS e cromatografia de afinidade ao níquel..	55
Figura 18. Predição de elementos de estrutura secundária da sequência da CDK9 com cauda de histidina, feita a partir do programa PSIPRED.....	57
Figura 19. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de afinidade ao cobalto, com adição de β ME ao tampão de solubilização da amostra	58
Figura 20. Gel de SDS-PAGE 15% do teste de reenovelamento e purificação da CDK9 por precipitação do SDS e cromatografia de afinidade ao cobalto	58
Figura 21. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de troca catiônica....	60
Figura 22. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 em diferentes concentrações da proteína.	62
Figura 23. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 (4 μ M) com diferentes tempos de estocagem a 4°C.	63
Figura 24. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 (4 μ M) em diversas temperaturas.	64
Figura 25. Desnaturação térmica da CDK9 (6 μ M) monitorada por dicroísmo circular em 208 nm.....	65
Figura 26. Espectro de emissão de fluorescência da CDK9 em diferentes concentrações de ureia	67
Figura 27. Perfil de desnaturação da CDK9 induzida por ureia, medida por fluorescência	68
Figura 28. Variação do ΔG da desnaturação da CDK9 com o aumento da concentração de ureia.	70
Figura 29. Efeitos da interação CDK9-ATP no espectro de emissão de fluorescência intrínseco da proteína.....	71
Figura 30. Comparação das curvas de [Q] versus F_0/F e τ_0/τ para os tipos de supressão	72
Figura 31. Supressão da fluorescência da CDK9 em função do aumento da concentração de ATP	73
Figura 32. Gráfico duplo-log da supressão de fluorescência da CDK9 pelo ATP	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de câncer e outras doenças ligadas a CDK9.	36
Tabela 2. Condições testadas em experimentos de indução.....	40
Tabela 3. Condições testadas em purificação por cromatografia de interação hidrofóbica.	42
Tabela 4. Condições testadas na purificação por cromatografia de afinidade.....	43
Tabela 5. Condições testadas em purificação por cromatografia de troca iônica.	45
Tabela 6. Comparação dos dados obtidos na literatura com os resultados das análises de estrutura secundária, feitas com os programas CDNN Deconvolution e DichroWeb	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	adenosina difosfato
AMPPNP	adenilil imidodifosfato
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
CAK	quinase ativadora de CDK, do inglês <i>CDK-activating kinase</i>
CAQI	Central de Análises Químicas Instrumentais
CD	dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CDK	quinase dependente de ciclina, do inglês <i>cyclin dependent kinase</i>
CTD	domínio C-terminal, do inglês <i>C-terminal domain</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRB	5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol
DSIF	fator de indução da sensibilidade a DRB, do inglês <i>DRB-sensitivity inducing factor</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GST	glutathione S-transferase
His	histidina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMAC	cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado, do inglês <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
LARP7	<i>La-related protein 7</i>
LB	Luria-Bertani
Lys	lisina
MEPCE	em inglês <i>methylphosphate capping enzyme</i>
MPB	proteína ligadora de maltose, do inglês <i>maltose binding protein</i>
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NELF	fator negativo do alongamento, do inglês <i>negative elongation factor</i>
NEQUIMED	Grupo de Estudos em Química Medicinal
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
P-TEFb	fator positivo do alongamento da transcrição b
PDB	banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
PIC	complexo de pré-iniciação, do inglês <i>pre-initiation complex</i>
PKA	proteína quinase A, do inglês <i>protein kinase A</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil, do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Pro	prolina
RB	retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	serina
Thr	treonina
βME	beta-mercaptoetanol

LISTA DE EQUAÇÕES

- (1) $[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$ 46
- (2) $\lambda_{cm} = \sum_{i=1}^N (I_i \lambda_i) / \sum_{i=1}^N (I_i)$ 68
- (3) $f_d = \frac{(\lambda_{cm})_n - (\lambda_{cm})_{obs}}{(\lambda_{cm})_n - (\lambda_{cm})_d}$ 68
- (4) $K_D = \frac{[D]_{eq}}{[N]_{eq}} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{f_D}{1 - f_D}$ 69
- (5) $\Delta G = -RT \ln K_D$ 69
- (6) $\Delta G = \Delta G^{H_2O} - m[U]$ 69
- (7) $\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q]$ 73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Quinases dependentes de ciclinas.....	16
1.2	A quinase dependente de ciclina 9 (CDK9).....	18
1.3	Estrutura genômica e molecular da CDK9	21
1.4	Papel da CDK9 na transcrição do DNA.....	27
1.5	CDK9 e o ciclo celular	34
1.6	Relação da CDK9 com o desenvolvimento de diversas doenças	35
1.7	Justificativa e objetivos gerais	37
1.8	Objetivos específicos.....	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1	Expressão e purificação da CDK9 no sistema bacteriano de <i>E. coli</i>	39
2.1.1	<i>Transformação das cepas de propagação</i>	<i>39</i>
2.1.2	<i>Transformação das cepas de expressão.....</i>	<i>39</i>
2.1.3	<i>Experimentos de expressão por indução com IPTG</i>	<i>40</i>
2.1.4	<i>Lise celular.....</i>	<i>40</i>
2.1.5	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE</i>	<i>41</i>
2.1.6	<i>Purificação da CDK9 por cromatografia líquida.....</i>	<i>41</i>
2.2	Caracterização estrutural da CDK9 por espectroscopia de dicroísmo circular.....	45
2.2.1	<i>Análise de estruturas secundárias em diferentes concentrações de CDK9</i>	<i>45</i>
2.2.2	<i>Análise de elementos de estrutura secundária em diferentes temperaturas.....</i>	<i>46</i>
2.2.3	<i>Determinação da T_m por desnaturação/renaturação térmica monitorada em comprimento de onda fixo</i>	<i>46</i>
2.3	Caracterização estrutural da CDK9 por espectroscopia de fluorescência	47
2.3.1	<i>Desnaturação química induzida com ureia.....</i>	<i>47</i>
2.3.2	<i>Análise da supressão da fluorescência induzida pela interação com ATP.....</i>	<i>47</i>
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1	Sequenciamento do DNA recombinante pET28a::CDK9.....	48

3.2	Experimentos de expressão	50
3.3	Testes de reenovelamento e purificação.....	52
3.3.1	<i>Testes de purificação em coluna hidrofóbica</i>	52
3.3.2	<i>Testes de purificação em coluna de afinidade a metal.....</i>	52
3.3.3	<i>Testes de purificação de polimento em coluna de troca iônica</i>	59
3.4	Experimentos com espectroscopia de dicroísmo circular	61
3.4.1	<i>Análise de estruturas secundárias em diferentes concentrações de CDK9</i>	61
3.4.2	<i>Estabilidade estrutural da CDK9 frente ao tempo de estocagem a 4°C.....</i>	63
3.4.3	<i>Análise de elementos de estrutura secundária em diferentes temperaturas.....</i>	64
3.4.4	<i>Determinação da T_m por desnaturação térmica monitorada em comprimento de onda fixo</i>	65
3.5	Experimentos com espectroscopia de fluorescência	66
3.5.1	<i>Desnaturação química induzida com ureia.....</i>	66
3.5.2	<i>Supressão da fluorescência induzida pela interação com ATP.....</i>	70
4	CONCLUSÕES.....	75
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quinases dependentes de ciclinas

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *cyclin dependent kinases*) são serina/treonina quinases, enzimas que transferem um grupo fosfato de moléculas como o ATP para resíduos de serina e/ou treonina de seus substratos. Diferentemente das demais quinases, as CDKs possuem atividade enzimática regulada por uma subunidade ciclina (MALUMBRES, 2014). Após a descoberta do primeiro membro da família CDK, a CDK1, em estudos genéticos com leveduras na segunda metade da década de 1980, outros membros foram identificados em organismos eucariotos (MALUMBRES e BARBACID, 2005). Até o momento foram encontrados no genoma humano os genes de 21 CDKs, as quais regulam direta ou indiretamente o ciclo celular e/ou a transcrição do DNA (WHITTAKER *et al.*, 2017).

As CDKs possuem tamanhos variados: há aquelas compostas somente pelo domínio quinase (aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos), e outras com extensões N e C-terminais além do domínio catalítico (com até mais de 1500 resíduos). A estrutura típica das CDKs é constituída por: um domínio N-terminal composto majoritariamente de folhas β , uma sequência rica em glicina (alça G, que pode apresentar função inibitória em algumas CDKs, e ativadora em outras (ECHALIER, ENDICOTT e NOBLE, 2010)) e uma hélice α principal – a hélice C; um domínio C-terminal rico em hélices α , que contém o segmento de ativação com um resíduo de treonina fosforilável na alça T; e o sítio ativo situado entre os dois domínios (MALUMBRES, 2014).

Uma mesma CDK pode se ligar a mais de uma ciclina, o que torna possível sua regulação dinâmica e concede a habilidade de fosforilar múltiplos substratos. Durante o ciclo celular, enquanto os níveis de CDKs são constantes, a maioria das ciclinas possuem uma sequência de síntese e degradação, fazendo com que sejam expressas somente em determinadas etapas e possibilitando o agrupamento e ativação cíclicos dos complexos ciclina-CDK em estágios específicos do ciclo (ALBERTS *et al.*, 2017). Geralmente, as ciclinas que atuam na transcrição possuem regulação independente do ciclo celular (MALUMBRES, 2014).

A análise filogenética baseada na similaridade do domínio quinase das diferentes CDKs humanas permite a divisão das CDKs em subfamílias que participam direta ou indiretamente na regulação do ciclo celular (CDKs 1-6, 11 e 14-

18) ou da transcrição (CDKs 7-13, 19 e 20). A Figura 1 mostra as relações evolucionárias entre as subfamílias de CDKs humanas e as ciclinas que se associam a cada CDK.

Figura 1. Relações evolucionárias entre as subfamílias de CDK humanas determinadas por análise filogenética baseada na similaridade dos domínios quinase humanos. Os domínios conservados estão destacados por cores (ver legenda). A CDK11 é codificada por dois genes separados, CDK11A e CDK11B, os quais codificam, cada um, duas isoformas da proteína, CDK11^{p58} (~58 kDa) e CDK11p¹¹⁰ (~110 kDa). As ciclinas associadas a cada CDK também estão indicadas.

Fonte: Adaptado de MALUMBRES (2014) e WHITTAKER *et al.* (2017).

Na presença de sua parceira ciclina, a maioria das CDKs está apenas parcialmente ativa. Enquanto as CDKs do ciclo celular necessitam do segmento de ativação fosforilado para estarem totalmente ativas, o papel da fosforilação deste segmento em CDKs que atuam na transcrição é variável (ECHALIER, ENDICOTT e NOBLE, 2010). Nas CDKs que precisam de fosforilação para ativação completa, o sítio ativo está parcialmente obstruído pela alça T na ausência da ciclina; com a ligação da ciclina, essa alça se desloca do sítio ativo, e a ativação completa do complexo CDK/ciclina ocorre, então, apenas quando um aminoácido próximo à entrada do sítio ativo da CDK é fosforilado por uma quinase ativadora de CDK (CAK, do inglês *CDK-activating kinase*) (ALBERTS *et al.*, 2017). Um exemplo importante das CAKs é a CDK7, que além de participar na transcrição, atua indiretamente nos processos celulares ao fosforilar outras CDKs (ECHALIER, ENDICOTT e NOBLE, 2010). A Figura 2 ilustra o mecanismo de ativação das CDKs pelas CAKs.

Figura 2. Ativação das CDKs pela fosforilação da alça T por uma quinase ativadora de CDK (CAK). A ligação da ciclina com a CDK resulta em uma mudança conformacional na alça T da CDK, a qual libera a entrada do sítio ativo, tornando a CDK parcialmente ativa. A fosforilação de um resíduo da alça T por uma CAK resulta na ativação completa da CDK.

FONTE: Adaptado de ALBERTS *et al.* (2017).

1.2 A quinase dependente de ciclina 9 (CDK9)

A CDK9 humana, um dos membros da família CDK, foi descoberta em 1994 por pesquisadores da Temple University, nos Estados Unidos (EUA), a partir de uma triagem em uma biblioteca de cDNA humano feita a fim de isolar supostos controladores do ciclo celular de mamíferos. Um dos cDNAs encontrados na triagem apresentou 1461 pares de base (bp, do inglês *base pair*), com fase de leitura aberta

de 1181 bp. A proteína produto da tradução possui 372 aminoácidos, com massa molecular relativa estimada em ~43 kDa, e nela foram encontradas, a partir de sua sequência primária, 11 regiões conservadas características do domínio catalítico de proteínas quinase e o motivo PITALRE, semelhante a caixa PSTAIRE no domínio N-terminal, sequência altamente conservada entre as CDKs (GRANA *et al.*, 1994).

Inicialmente denominada PITALRE, a proteína compartilha entre 41 a 43% de identidade, e 61 a 65% de similaridade, com a quinase SGV1 de *Saccharomyces cerevisiae* e as quinases humanas CDC2 (também conhecida como CDK1), CDK2, CDK3 e CDK5. Experimentos de imunoprecipitação/reimunoprecipitação permitiram encontrar três proteínas associadas a PITALRE, com massas moleculares aproximadas de 155, 95 e 80 kDa, porém os pesquisadores não foram capazes de determinar a identidade destas proteínas, hoje identificadas como membros da família das ciclinas, e nem verificar a ativação da PITALRE por uma delas (GRANA *et al.*, 1994).

Através de experimentos de Northern blot, o transcrito da PITALRE foi encontrado em todos os tecidos, mas com maior expressão no fígado e na placenta, sugerindo funções específicas da proteína em certos tipos celulares. A localização subcelular da proteína foi determinada por fracionamento subcelular seguido por Western blot, cujo resultado demonstrou que PITALRE é uma proteína nuclear. Em ensaios de atividade enzimática para determinar a função de quinase da proteína, imunocomplexos da PITALRE foram capazes de fosforilar a proteína retinoblastoma p56^{RB}, a proteína básica de mielina e caseína (GRANA *et al.*, 1994).

Três anos após a descoberta da PITALRE, pesquisadores da Universidade de Iowa, EUA, publicaram sobre a relação da proteína com a menor subunidade do fator positivo do alongamento da transcrição b (P-TEFb) de *Drosophila* (ZHU *et al.*, 1997). O fator P-TEFb foi primeiramente purificado a partir do fracionamento de extratos nucleares de células K_c de *Drosophila melanogaster* (MARSHALL e PRICE, 1995), é composto por duas subunidades distintas, e é importante para a entrada da RNA polimerase II (RNAP II) em um modo de alongamento produtivo da transcrição, atuando na fosforilação do domínio carboxiterminal (CTD) da polimerase (MARSHALL *et al.*, 1996). Após comparação da sequência proteica da menor subunidade do P-TEFb de *Drosophila*, obtida após clonagem a partir de um cDNA, com outras sequências disponíveis, a proteína foi identificada como pertencente à família das quinases dependentes de ciclina, com mais de 40% de identidade com a

proteína Cdc2 de *Schizosaccharomyces pombe*, e revelou alto nível de similaridade sequencial com a proteína humana PITALRE (72% de identidade e 83% similaridade) (ZHU *et al.*, 1997). Os cientistas então realizaram experimentos de imunodepleção da PITALRE em extratos nucleares de células HeLa e verificaram que a depleção de PITALRE cessou a atividade do P-TEFb, o que sustentou a hipótese desta proteína ser um componente do P-TEFb em células humanas (ZHU *et al.*, 1997).

A subunidade maior do P-TEFb foi identificada como uma ciclina por dois grupos independentes. Pesquisadores da Universidade de Iowa determinaram a sequência proteica da ciclina do P-TEFb de *Drosophila*, a qual apresentou alta similaridade da sua região aminoterminal com a das ciclinas C e H de *Drosophila* (PENG, MARSHALL e PRICE, 1998). A partir dos resultados obtidos, a nova ciclina foi nomeada ciclina T, e a subunidade quinase do P-TEFb, de CDK9, devido a sua associação com uma ciclina e similaridade com outras quinases dependentes de ciclina (PENG, MARSHALL e PRICE, 1998). Logo em seguida, o mesmo grupo apresentou a identificação das ciclinas T1, T2a e T2b do P-TEFb humano, sendo as duas últimas isoformas da mesma proteína devido a splicing alternativo (PENG, MARSHALL e PRICE, 1998). Pesquisadores da Universidade da Califórnia, em San Diego, chegaram a mesma conclusão que o grupo de Iowa após analisarem as proteínas envolvidas na interação do P-TEFb humano com a proteína Tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) (WEI *et al.*, 1998).

Uma terceira ciclina capaz de se ligar a CDK9 foi determinada pouco tempo depois da identificação das ciclinas T: a ciclina K (FU, T. J. *et al.*, 1999). Antes da descoberta desta interação, a ciclina K já havia sido classificada como pertencente ao grupo II junto com as ciclinas C e H, mas não haviam determinado ainda a CDK com a qual ela se ligava (EDWARDS, WONG e ELLEDGE, 1998). Da mesma forma que com as ciclinas T, o complexo P-TEFb formado por CDK9/ciclina K age fosforilando os mesmos substratos que os complexos CDK9/ciclina T1, ainda que a sequência de aminoácidos da caixa ciclina da ciclina K possui apenas 29% de identidade com a da ciclina T1 (FU, T. J. *et al.*, 1999). A capacidade da CDK9 se ligar a mais de uma ciclina possibilita a interação do P-TEFb com proteínas que se ligam a diferentes ciclinas, e confere seletividade dos seus substratos *in vivo*.

1.3 Estrutura genômica e molecular da CDK9

A sequência genômica do mRNA da CDK9 foi primeiramente estudada por LIU e RICE (2000), a fim de compreenderem os mecanismos que regulam a expressão da CDK9. Três anos depois, a descoberta de uma outra isoforma da proteína resultou na publicação do estudo completo da sequência do gene (SHORE *et al.*, 2005; SHORE *et al.*, 2003). A existência de duas isoformas da CDK9 é devido a presença de dois promotores diferentes no gene: o mRNA da CDK9₄₂ (massa molecular de 42 kDa) é transcrito a partir de um promotor rico em G/C (guanina/citosina), sem a caixa TATA, enquanto o da CDK9₅₅ (massa molecular de 55 kDa) é transcrito a partir de um promotor TATA (SHORE *et al.*, 2003). O ponto de início da transcrição da CDK9₄₂ está situado a 79 bp acima do códon de iniciação ATG, enquanto o da CDK9₅₅ está aproximadamente 500 bp acima do ponto de início da transcrição da CDK9₄₂ (SHORE *et al.*, 2005; SHORE *et al.*, 2003).

A Figura 3 apresenta um esquema do gene da CDK9: são 7 sequências codificantes (éxons) separados por 6 sequências não-codificantes (íntrons); o primeiro éxon contém 92 pares de base na expressão da isoforma menor, e 351 pares adicionais (443 no total) na expressão da isoforma maior (SHORE *et al.*, 2005; SHORE *et al.*, 2003).

Figura 3. Estrutura do gene da CDK9. Em caixas laranjas, as sete sequências codificantes (éxons) da proteína; em caixa marrom estão os 351 nucleotídeos adicionais do éxon 1 da isoforma CDK9₅₅; os éxons são separados por seis sequências não-codificantes (íntrons). As setas verdes representam o início da transcrição para o mRNA da CDK9₅₅ e o da CDK9₄₂.

FONTE: Adaptado de LIU e RICE (2000); SHORE *et al.* (2005); SHORE *et al.* (2003).

Ambas as isoformas da CDK9 se ligam as quatro ciclinas T e K, e atuam na transcrição fosforilando o CTD da RNAP II; sendo assim possível, oito diferentes heterodímeros do complexo P-TEFb. Quanto a localização celular, a CDK9₄₂ é encontrada no núcleo e no citoplasma, e a CDK9₅₅ está presente essencialmente no núcleo. Elas também apresentam expressão diferencial em vários tecidos humanos

e de ratos: a CDK9₄₂ possui maior expressão do que a CDK9₅₅ no baço e no testículo, enquanto a CDK9₅₅ prevalece nos pulmões, fígado e cérebro. Estas diferenças indicam a regulação diferencial dos níveis relativos das duas isoformas de acordo com o tipo específico de célula (ROMANO e GIORDANO, 2008; SHORE *et al.*, 2005; SHORE *et al.*, 2003).

A estrutura molecular da CDK9 humana foi revelada após a obtenção e análise cristalográfica do seu complexo com a ciclina T1, apenas 14 anos depois da descoberta de PITALRE (BAUMLI *et al.*, 2008). A estrutura da CDK9 possui um enovelamento típico de quinase, com um domínio N-terminal (resíduos 16-108) composto principalmente de folhas β e apenas uma hélice α , e um domínio C-terminal (resíduos 109-330) constituído majoritariamente de hélices α . Em relação aos 117 aminoácidos N-terminais extras da CDK9₅₅, essa extensão de 13 kDa contém uma região rica em prolina e uma região rica em glicina, mas não apresenta similaridade significativa com nenhum motivo conhecido (SHORE *et al.*, 2003).

Existem seis motivos funcionais presentes em sua estrutura (HANKS e HUNTER, 1995; PAPARIDIS, DURVALE e CANDURI, 2017):

- i. a alça G (resíduos 26-33), inserida entre as fitas $\beta 1$ e $\beta 2$ e com motivo consenso entre as quinases, Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val, que age como um gancho flexível cobrindo e ancorando os fosfatos não-transferíveis do ATP;
- ii. a hélice αC (resíduos 61-72), a qual contém a maioria dos resíduos que interagem com a ciclina;
- iii. uma dobradiça (resíduos 104-109) que conecta os domínios N e C terminais, e possui resíduos que formam ligações de hidrogênio específicas com a adenina (Asp104 e Cys106) e com o anel ribose do ATP, e resíduos de cadeia apolar que contribuem para o bolsão hidrofóbico que acomoda o anel purina da adenina no sítio de ligação;
- iv. a alça catalítica (resíduos 147-154), que contém os resíduos diretamente responsáveis pela reação de transferência de fosfato - Asp149, Lys151 e Thr191;
- v. o motivo de coordenação ao cátion Mg^{2+} (resíduos 167-169), que contém o tripleto DFG altamente conservado em quinases, cujo resíduo de aspartato participa na coordenação do Mg^{2+} juntamente com os fosfatos β e γ do ATP, posicionando o fosfato γ para a reação;

- vi. o segmento de ativação, ou alça T (resíduos 174-196), que deve sofrer mudanças conformacionais após fosforilação do resíduo de treonina Thr186 e ativação da atividade catalítica da enzima – hipótese ainda não comprovada devido a falta de estrutura cristalográfica da CDK9 na sua forma não-fosforilada, mas deduzida pela comparação com outras CDKs já bem caracterizadas.

A Figura 4 mostra a estrutura cristalográfica da CDK9 em complexo com o análogo de ATP AMPPNP (adenilil imidodifosfato), obtida por BAUMLI *et al.* (2008), com destaque para os motivos funcionais da CDK9.

Figura 4. Estrutura cristalográfica da CDK9 em complexo com AMPPNP, um análogo de ATP (PDB 3BLQ). A estrutura da proteína foi obtida na sua forma ativa, em associação com a ciclina T1 (omitida para melhor visualização da CDK9), e apresenta apenas os primeiros 330 resíduos de aminoácidos dos 372 totais. A) Representação em cores dos elementos de estrutura secundária dos domínios N e C terminais, construída com o PyMOL. B) Destaque dos motivos funcionais presentes na estrutura da CDK9.

FONTE: Adaptado de BAUMLI *et al.* (2008); PAPARIDIS, DURVALE e CANDURI (2017).

O mecanismo reacional com o qual a CDK9 catalisa a transferência do fosfato γ do ATP para resíduos de serina/treonina de seus substratos depende da tríade catalítica de resíduos Asp/Lys/Thr presente na alça catalítica da enzima, localizada no domínio N-terminal e próxima ao sítio catalítico. Asp149, Lys151 e Thr191 formam uma rede de ligações de hidrogênio, dando suporte ao oxigênio da hidroxila no substrato serina e posicionando-o corretamente em direção ao grupo fosfato a ser transferido; enquanto o íon Mg^{2+} se coordena ao resíduo Asp167 do motivo DFG para posicionar o fosfato γ . Dada a similaridade da conformação do segmento de ativação das formas ativas dos complexos CDK2/ciclina A e CDK9/ciclina T1, pode-se inferir que a transferência do fosfato ocorre de maneira concertada, assim como para a catálise da CDK2 (BAUMLI *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2011). Semelhante a uma base na reação de substituição do tipo S_N2 , a carboxila do resíduo Asp149 da CDK9 ataca o resíduo serina do substrato polipeptídico, que, por sua vez, é capaz de atacar nucleofilicamente o fósforo do fosfato γ do ATP e deslocar a molécula de ADP após a ligação com o fósforo. A Figura 5 apresenta o mecanismo simplificado da reação catalisada pela CDK9 em um resíduo de serina do substrato.

Figura 5. Mecanismo simplificado da reação de transferência do fosfato γ do ATP para um resíduo de serina do substrato, catalisada pela CDK9. Somente os resíduos da enzima e do substrato que participam da catálise são mostrados na figura. Em azul, os resíduos catalíticos da CDK9; em roxo a serina do substrato polipeptídico; em verde, a estrutura do ATP; em vermelho escuro, o cátion magnésio(II); as setas vermelhas representam o fluxo de elétrons da reação.

FONTE: Adaptado de SMITH *et al.* (2011) e SANTOS (2015).

Assim como a CDK9 participa na regulação de seus substratos, sua atividade também é regulada. Dentre os mecanismos de regulação da atividade da CDK9 estão a fosforilação de certos resíduos de serina e treonina e a acetilação de resíduos de lisina. Além da Thr186, essencial para a ativação completa da atividade enzimática da CDK9, os seguintes sítios fosforiláveis já foram descritos ou sugeridos: Thr29, Ser90, Ser175, Ser329, Thr330, Thr333, Ser334, Ser347, Thr350,

Ser353, Thr354, Ser357, Thr362 e Thr363 (BAUMLI *et al.*, 2008; CHEN, YANG e ZHOU, 2004; GARBER *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2009). Destes, o resíduo Ser90 foi identificado como alvo da CDK2, e Ser347 foi fosforilado *in vitro* pela proteína quinase A (PKA), o que sugere a possibilidade do mesmo ocorrer *in vivo*, dada as semelhanças deste segmento com o de outros substratos da PKA (BREUER *et al.*, 2012; GARBER *et al.*, 2000). Em experimentos nos quais o complexo P-TEFb foi incubado com ATP, foi confirmado que a CDK9 é capaz de sofrer autofosforilação nos demais resíduos citados, e esse processo ocorre de maneira intramolecular: um mutante inativo do P-TEFb, incapaz de ligar Mg^{2+} , permanece totalmente desfosforilado mesmo após adição de moléculas ativas do complexo (BAUMLI *et al.*, 2008). A acetilação dos resíduos Lys44 e Lys48 pelas proteínas GCN5 e P/CAF (membros da família GNAT de histonas acetiltransferases) resulta na inibição da atividade enzimática da CDK9, através da redução da afinidade do ATP pela enzima, dado que a Lys48, assim como a Lys33 na CDK2, poderia auxiliar na orientação do ATP bem como na ligação do Mg^{2+} no sítio catalítico (SABO *et al.*, 2008).

A correlação entre a estrutura secundária da CDK9 e sua sequência primária, bem como os principais resíduos a sofrer fosforilação/acetilação, estão representados na Figura 6.

Figura 6. Sequência primária da CDK9 e a correlação com elementos de estrutura secundária. Os motivos funcionais e os sítios de fosforilação e acetilação estão destacados.

FONTE: Adaptado de BAUMLI *et al.* (2008); PAPARIDIS, DURVALE e CANDURI (2017).

O complexo CDK9/ciclina é excepcionalmente estável, porém a CDK9 recém-sintetizada no núcleo, livre e desprotegida, é degradada rapidamente. Investigando a exata composição do complexo P-TEFb ativo, pesquisadores da Universidade da

Califórnia, em Berkeley, identificaram as chaperonas moleculares Hsp70 e Hsp90 dentre as proteínas associadas à CDK9. Esta descoberta levou os cientistas a determinar a via de estabilização/enovelamento da CDK9 e a montagem do complexo P-TEFb dependente de chaperona (Figura 7): a CDK9 recém-sintetizada é estabilizada e tem seu enovelamento correto inicialmente mediado pela Hsp70; em um dado momento, a Hsp70 transfere a proteína para o complexo Hsp90/Cdc37, o qual completa e mantém o enovelamento da CDK9 até que ela possa rapidamente se ligar a ciclina no estágio final da via. As moléculas de CDK9 que se desprendem das chaperonas durante a via, assim como as que estão desprotegidas após a tradução, são rapidamente encaminhadas para a degradação (O'KEEFFE *et al.*, 2000).

Figura 7. Via do enovelamento da CDK9 pelas chaperonas Hsp70 e Hsp90/Cdc37.

FONTE: Adaptado de O'Keefe *et al.*, 2000.

1.4 Papel da CDK9 na transcrição do DNA

A produção de uma fita simples de RNA, a partir de um molde de DNA (fita dupla) é o processo denominado de transcrição, e a enzima responsável pela cópia do DNA em código de RNA é a RNA polimerase. A transcrição ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação. Na etapa de iniciação, a RNA polimerase, com o auxílio de fatores de iniciação (dentre eles, TFIIH), primeiramente reconhece e se liga a uma sequência promotora na fita dupla de DNA, para em seguida separar as fitas do DNA em uma bolha de transcrição (região de 12-14 pares de base) e usar uma delas como molde para a produção do RNA; esta etapa é considerada completa quando as duas primeiras bases da cadeia de RNA estão unidas por ligação fosfodiéster. Na etapa de alongamento, a RNA polimerase, já dissociada dos fatores de iniciação, se move na direção 3' → 5' do molde de DNA, deslocando a bolha de transcrição (aproximadamente 14 a 20 bp) e adicionando

novas bases na fita de RNA. Por fim, na etapa de terminação, a RNA polimerase libera a nova molécula de RNA completa no códon de parada da transcrição, e se dissocia do molde de DNA, estando assim, livre para começar outro processo de transcrição (LODISH *et al.*, 2016; CRAMER, 2019).

A transcrição do DNA possui os mesmos princípios fundamentais em procariotos e eucariotos, porém em organismos eucarióticos esse processo apresenta sequências de controle mais complexas e múltiplas RNA polimerases. O núcleo de eucariotos possuem três tipos de RNA polimerases: a RNA polimerase I (RNAP I), que sintetiza os RNAs ribossômicos (rRNA); a RNA polimerase II (RNAP II), que sintetiza os precursores de RNAs mensageiros (mRNA) e a RNA polimerase III (RNAP III), que produz os precursores de 5S rRNA, os RNAs transportadores (tRNA), e vários outros RNAs nucleares e citosólicos menores (VOET, VOET e PRATT, 2016). Em organismos multicelulares, a complexidade do controle da transcrição permite um maior controle da expressão dos genes, o que, por fim, garante a geração e manutenção dos inúmeros tipos de células do organismo através da execução perfeita do programa genético contido no seu DNA e das mudanças corretas na expressão gênica como resposta a mudanças ambientais (LODISH *et al.*, 2016).

A RNA polimerase II é a atuante na expressão gênica (decodificação da informação do DNA em proteína), e os mecanismos que regulam as etapas de transcrição nas quais atua tem sido extensivamente estudados (LODISH *et al.*, 2016; CRAMER, 2019). Um destes mecanismos ocorre no domínio C-terminal (CTD, do inglês *C-terminal domain*) da maior subunidade da RNAP II. Em mamíferos, o CTD possui diversas repetições de consenso PTSPSYS, altamente conservados, cujos resíduos de serina podem sofrer fosforilação reversível. O início da transcrição pela RNAP II só acontece quando o CTD está desfosforilado, enquanto o alongamento começa somente após o CTD ter sido fosforilado. O CTD altamente fosforilado fornece sítios de ligação para vários fatores de transcrição e, devido as repulsões carga-carga entre grupos fosfato próximos, é deslocado para longe da porção globular da enzima (VOET, VOET e PRATT, 2016).

A CDK9, em complexo com sua parceira ciclina, constitui um dos fatores de transcrição que atuam fosforilando o CTD da RNAP II, o *fator positivo do alongamento da transcrição b* (P-TEFb). A atividade enzimática da CDK9 acontece em um momento logo após o início da transcrição no qual a RNAP II está em um

impasse: entrar em um processo de alongamento abortivo – onde a síntese do transcrito é interrompida após a adição de poucas dezenas de nucleotídeos, ou em um alongamento produtivo, no qual a síntese continua até que o transcrito completo é obtido (MARSHALL e PRICE, 1992).

Dois fatores negativos do alongamento, o fator de indução da sensibilidade a DRB (5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol) (DSIF, do inglês *DRB-sensitivity inducing factor*) e o fator negativo do alongamento (NELF, do inglês *negative elongation factor*) cooperativamente reprimem a ação da RNAP II, encaminhando-a para o alongamento abortivo. Tais fatores negativos se ligam à forma hipofosforilada da polimerase, inibem a velocidade do alongamento e aumentam a duração do tempo em que a RNAP II permanece em sítios de pausa (RENNER *et al.*, 2001; WADA *et al.*, 1998). O alongamento produtivo é então alcançado pela ação concomitante do complexo P-TEFb no CTD da RNAP II e nos fatores negativos NELF e DSIF. O P-TEFb, sendo um fator positivo, prepara a RNAP II para recrutar fatores de alongamento e processamento do DNA ao fosforilar o CTD, e a fosforilação dos fatores NELF e DSIF faz com que o primeiro se dissocie da RNAP II, e o segundo seja convertido de um fator negativo para um positivo (FUJINAGA *et al.*, 2004; KIM e SHARP, 2001).

O CTD da RNAP II humana possui 52 repetições da sequência consenso Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7, que apresentam algumas poucas variações na região C-terminal. Inicialmente foi atribuído as CDKs 7, do TFIIH, e 8, do complexo mediador, a fosforilação de Ser5 na fase de iniciação da transcrição, e a fosforilação de Ser2 pela CDK9 do P-TEFb no início da fase de alongamento (EGLOFF e MURPHY, 2008; PETERLIN e PRICE, 2006; ZHOU *et al.*, 2000). Entretanto, um estudo mais recente verificou os seguintes aspectos da atuação da CDK9 na transcrição: i) o substrato preferido pela CDK9 é o CTD fosforilado previamente na posição Ser7 pela CDK7; ii) a reação catalisada pela CDK9 não ocorre se o CTD é pré-fosforilado nas posições Ser5 e Ser2; iii) apesar da CDK9 ser capaz de fosforilar tanto Ser5 quanto Ser2, a transferência do fosfato γ do ATP ocorre majoritariamente para a Ser5; iv) a CDK9 atua em Ser2 com uma frequência bem menor; v) a CDK9 é incapaz de promover fosforilações duplas Ser2/Ser5 (CZUDNOCHOWSKI, BOSKEN e GEYER, 2012). A Figura 8 apresenta de maneira simplificada como a CDK9 atua na transcrição da RNA polimerase II.

Figura 8. Função do P-TEFb no controle da transcrição da RNA polimerase II. 1) Após a ativação do complexo pré-iniciação e o início da síntese do mRNA transcrito, ocorre a transição da etapa de iniciação para a de alongamento: a CDK7, quinase do fator de transcrição IIH, fosforila o CTD da RNAP II; a RNAP II se dissocia dos fatores de iniciação; a CDK9 do P-TEFb é ativada; e fatores negativos do alongamento podem se ligar a RNAP II, causando a inibição da transcrição. 2) A CDK9 na sua forma ativa, fosforila o CTD hipofosforilado da RNAP II e os fatores negativos NELF e DSIF; NELF se dissocia da polimerase e DSIF torna-se um fator positivo.

FONTE: Adaptado de LODISH *et al.* (2016).

Estudos utilizando o inibidor ATP-competitivo DRB verificaram que a transferência do fosfato γ ocorre através da formação ordenada e sequencial do complexo ternário CDK9/ATP/CTD regida por mudanças conformacionais na cauda C-terminal da CDK9 (BAUMLI *et al.*, 2012). Mutantes da CDK9 sem a cauda C-terminal (CDK9₃₃₀, 1-330 resíduos) apresentaram apenas 30% da atividade quinase da proteína completa (CDK9₃₇₂), sem haver diminuição da afinidade da enzima pelo CTD. Experimentos de inibição com ADP revelaram que ele é um potente inibidor da CDK9₃₇₂, agindo como um inibidor do tipo misto com respeito ao substrato CTD e

como um inibidor competitivo frente ao ATP; porém, na presença da CDK9 com o C-terminal deletado, o ADP age como inibidor competitivo de ambos os substratos. Tais resultados levaram a estudos da cinética da fosforilação do CTD pela CDK9, os quais sugeriram que a cauda C-terminal da CDK9 atua para que o primeiro substrato a se ligar à enzima seja o ATP, seguido pelo CTD, e que após a transferência do fosfato γ , o CTD fosforilado seja liberado antes do ADP (BAUMLI *et al.*, 2012).

O modelo proposto para o ciclo catalítico da CDK9 é composto de quatro etapas (Figura 9): i) a apoenzima CDK9 possui uma cauda flexível na extremidade C-terminal, que, ao se ligar ao ATP (primeiro substrato), adota uma conformação ordenada, cobrindo parcialmente o sítio de ligação ao ATP para que o substrato não seja deslocado; ii) o CTD da RNAP II (segundo substrato) se liga ao complexo CDK9/ATP para formar um complexo ternário apto para a reação de transferência; iii) após a fosforilação, o CTD fosforilado é liberado; iv) com a saída do CTD, o ADP é liberado e a enzima volta ao estado inicial apo com a cauda C-terminal flexível, estando livre para recomençar o ciclo (BAUMLI *et al.*, 2012).

Figura 9. Ciclo catalítico da CDK9 na fosforilação do CTD da RNA polimerase II.

FONTE: Adaptado de BAUMLI *et al.* (2012).

In vivo, os principais reguladores da atividade do complexo CDK9/ciclina T1 na transcrição são o complexo 7SK snRNA/HEXIM1 (ou HEXIM2) e a proteína bromodomínio Brd4. O 7SK é um RNA não codificante, de 331 nucleotídeos, que é produzido pela RNA polimerase III e altamente conservado em eucariotos superiores (DIRIBARNE e BENSAUDE, 2009). A proteína Brd4 é uma proteína nuclear de 200 kDa, cujo duplo bromodomínio se associa com histonas acetiladas da cromatina. Após a ligação da CDK9 com a ciclina, metade das moléculas P-TEFb se associam com a Brd4, formando um complexo de baixa massa molecular, enquanto a outra

metade se associa com o 7SK snRNA em um complexo de alta massa molecular (ZHOU *et al.*, 2009).

A interação do P-TEFb com o 7SK snRNA e a proteína HEXIM1 resulta na inibição da atividade catalítica da CDK9. O 7SK snRNA sozinho é capaz de se ligar ao P-TEFb, mas precisa da proteína HEXIM1 (ou HEXIM2) para inativar a CDK9. As proteínas HEXIM1 e HEXIM2, na forma de um homo ou heterodímero, se ligam a uma molécula de 7SK snRNA, formando um complexo denominado 7SK snRNP (*7SK small nuclear ribonucleic acid particle*), capaz de sequestrar e inibir duas moléculas de P-TEFb ativas (fosforiladas em Thr186) (BLAZEK *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). O complexo 7SK snRNP possui também outras duas proteínas que interagem com o 7SK snRNA: a proteína MEPCE (7SK snRNA methylphosphate capping enzyme), que metila o fosfato γ do primeiro nucleotídeo 5' do RNA; e a proteína LARP7 (La-related protein 7), que estabiliza a molécula de RNA ao se ligar e proteger a cauda 3'-UUUU-OH da degradação por exonucleases (HE, N. *et al.*, 2008; JERONIMO *et al.*, 2007).

A ligação do P-TEFb e da HEXIM1 leva o 7SK snRNP a assumir uma conformação aberta, na qual a extremidade 5' forma uma estrutura do tipo haste-alça estendida, com o motivo 7SK padrão, que permite a interação P-TEFb/HEXIM1, e consequentemente, a inibição do P-TEFb. Quando o P-TEFb se dissocia, a proteína HEXIM1 é também deslocada do complexo, a MEPCE e a LARP7 permanecem associadas ao RNA, e o 7SK snRNA retorna à sua conformação fechada (com a extremidade 5' do 7SK próxima à 3'), estabilizada por hnRNPs (ribonucleoproteínas heterogêneas) (BROGIE e PRICE, 2017; DIRIBARNE e BENSAUDE, 2009; KRUEGER *et al.*, 2008). A dissociação do P-TEFb deste complexo inibidor 7SK snRNP ocorre sob situações de estresse – como na presença de actinomicina D, DRB e luz ultravioleta, ou em resposta a sinais celulares (NGUYEN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001).

A proteína Brd4, por sua vez, atua recrutando o complexo P-TEFb para os promotores de diversos genes a fim de estimular a transcrição. Diversos estudos demonstraram que a Brd4 se liga ao P-TEFb no qual a CDK9 está fosforilada nos resíduos Thr186 e Ser175 e acetilada em Lys44 ou Lys48 (FU, J. *et al.*, 2007; MBONYE *et al.*, 2013); a pSer175 favorece a interação do P-TEFb com a Brd4 ao mesmo tempo que a previne com o complexo 7SK snRNP (MBONYE *et al.*, 2013). Portanto, a Brd4 forma um complexo com o P-TEFb inativo antes de se ligar a outras

proteínas para a formação do complexo de pré-iniciação (PIC, *preinitiation complex*) da transcrição. Além da fosforilação em Ser175 na CDK9, a acetilação da Lys386 da ciclina T1 e a fosforilação da Ser158 da HEXIM1 também contribuem para a dissociação do P-TEFb do complexo 7SK RNP e a associação com a Brd4 (BROGIE e PRICE, 2017). A Figura 10 mostra o ciclo de ativação e inativação do P-TEFb envolvendo as proteínas do 7SK RNP e a Brd4.

Figura 10. Associação do P-TEFb com as proteínas do complexo 7SK snRNP e a proteína Brd4. Após o enovelamento correto da CDK9 e a ligação com a ciclina T1, o P-TEFb segue dois destinos: a interação com a proteína Brd4, que recruta o P-TEFb para a transcrição gênica, e a interação com o complexo 7SK RNP, que resulta na inativação do P-TEFb. O primeiro destino é favorecido por fosforilação da CDK9 nos resíduos S175, T186, e acetilação em K44/48 da CDK9 e K386 da ciclina T1. A ligação de duas moléculas de P-TEFb e duas da HEXIM1 no 7SK RNA, leva a uma alteração conformacional do RNA da estrutura fechada para a aberta.

FONTE: Adaptado de BROGIE e PRICE (2017) e MBONYE *et al.* (2013).

Ainda antes da formação do PIC, a CDK9, do complexo P-TEFb/Brd4, é fosforilada pela CDK2 na posição Ser90 (BREUER *et al.*, 2012), e inativada em Thr186 pela fosfatase PPM1A ou por PP1 (AMMOSOVA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2008). Após a formação do PIC, a CDK9 permanece inibida em Thr186 pelo fator TFIIH (ZHOU *et al.*, 2001), que impede a autofosforilação deste resíduo, e por uma autofosforilação inibitória em Thr29, induzida pela Brd4 (ZHOU *et al.*, 2009). Uma vez que a inibição da CDK9 é revertida com a saída dos fatores inibitórios, a ativação do P-TEFb ocorre somente no complexo de alongamento, com a autofosforilação em Thr186 pela CDK9 e desfosforilação em Ser175 pelo complexo PP1/PIP2 (AMMOSOVA *et al.*, 2011). Estes mecanismos de regulação ocorrem a fim de impedir a ação prematura da CDK9 durante as primeiras etapas da transcrição.

1.5 CDK9 e o ciclo celular

A comprovação de que os níveis de expressão da CDK9 e da ciclina T1, bem como a atividade do P-TEFb, não se alteram durante o ciclo celular descartou por alguns anos a possibilidade da CDK9 também participar da regulação do ciclo (GARRIGA *et al.*, 2003). Entretanto, essa possibilidade voltou a ser considerada após a descoberta da interação do P-TEFb com a proteína Brd4. Com esta questão novamente levantada, pesquisadores da Universidade da Califórnia – Berkeley realizaram experimentos a fim de relacionar as duas principais funções da Brd4: sua interação com histonas acetiladas, a qual persiste mesmo durante a mitose, quando a cromatina está altamente condensada e a transcrição está interrompida; e a interação com o P-TEFb para estimular a transcrição (YANG, HE e ZHOU, 2008). Os resultados demonstraram que a interação P-TEFb/Brd4 aumenta drasticamente em células progredindo do final da mitose para o início da fase G1, ainda que o nível de P-TEFb se mantém constante no ciclo celular, indicando que o recrutamento do P-TEFb para os cromossomos dependente da Brd4 permite o P-TEFb estimular a transcrição dos genes essenciais para a progressão celular em G1 (YANG, HE e ZHOU, 2008).

O P-TEFb, deslocado dos cromossomos para o citoplasma durante a prófase, metáfase e início da anáfase, é abruptamente recrutado pela Brd4 e se reassocia aos cromossomos antes da remontagem do envelope e da lâmina nucleares,

enquanto outros fatores da transcrição entram no núcleo filha apenas após a formação do envelope e da lâmina. Isto sugere que seu recrutamento antecipado para a cromatina pode ajudar na marcação de genes cujo ciclo de transcrição não pode entrar em alongamento abortivo, e a expressão deve ser preservada ativa durante a divisão celular. Apesar da dependência da Brd4, este recrutamento não é garantido apenas pela presença da Brd4, e os resultados preliminares da pesquisa indicaram que outros fatores, bem como modificações pós-traducionais na Brd4 e/ou P-TEFb, podem estar também envolvidos no controle deste processo (YANG, HE e ZHOU, 2008).

1.6 Relação da CDK9 com o desenvolvimento de diversas doenças

Devido à importante participação das CDKs na regulação dos processos do ciclo celular e da transcrição, estas enzimas tem sido objetos de pesquisa como potenciais alvos de inibição no combate ao câncer. A divisão e crescimento celular incontrolado de tumores cancerígenos frequentemente são resultados de mutações nos genes envolvidos na progressão do ciclo celular (CANAVESE, SANTO e RAJE, 2012). Estudos de sequenciamento do genoma cancerígeno também têm revelado recorrentes mutações somáticas em células tumorais, as quais afetam praticamente todo DNA, RNA e componente proteico do controle transcricional normal (BRADNER, HNISZ e YOUNG, 2017).

Um exemplo da relação da CDK9 com o surgimento de câncer é sua interação com o gene supressor de tumor p53. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear que participa no controle da proliferação celular, reparo de danos no DNA e apoptose. O gene p53 é ativado diretamente pelo complexo P-TEFb em resposta a qualquer anormalidade genética que é detectada durante o ciclo celular, e a proteína p53 induz a parada do ciclo celular e/ou apoptose pela transativação de seus genes alvo. Portanto, a ausência, ou mesmo a diminuição da expressão da CDK9, resulta na redução da atividade da proteína p53, o que consequentemente permite a progressão do ciclo celular ainda que sinais de parada para reparo do DNA sejam emitidos (FRANCO *et al.*, 2018; OZAKI e NAKAGAWARA, 2011).

Diversas pesquisas que foram capazes de relacionar a CDK9 e o desenvolvimento dos vários tipos de câncer e outras doenças, *in vivo* e/ou *in vitro*,

estão listadas na revisão de FRANCO *et al.* (2018). A Tabela 1 apresenta os cânceres e doenças que tem o envolvimento da CDK9 no seu desenvolvimento.

Tabela 1. Tipos de câncer e outras doenças ligadas a CDK9.

Sistema afetado	Tipo de câncer
Sistema nervoso central	Neuroblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo (PNET)
Hematológico	Leucemias: linfótica crônica (CLL), mielogênica aguda (AML), linfoblástica aguda (ALL); Linfomas: de células do manto (MCL)●, difuso de grande células B (DLBCL), anaplásico de grandes células (ALCL)●, de Burkitt, de células T periféricas (PTCL), de Hodgkin; Mieloma múltiplo (MM).
Fígado	Carcinoma hepatocelular (HCC)
Músculo	Rabdomiossarcoma (RMS)●
Mama	Adenocarcinoma de mama: Câncer de mama receptor de estrogênio positivo (BAC-ER+ve); Câncer de mama triplo negativo (TNBC)
Sistema reprodutivo masculino	Câncer de próstata (PC)
Sistema reprodutivo feminino	Lesões cervicais pré-invasivas no carcinoma espinocelular de pele; câncer de ovário
Cólon	Adenocarcinoma de cólon
Pulmão	Adenocarcinoma de pulmão; câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC)●
Pancreas	Adenocarcinoma do duto pancreático; câncer pancreático metastático
Pele	Melanoma❖
Peritônio	Câncer primário de peritônio (PPC)
Outros	Carcinoma NUT da linha média★, sarcoma de Kaposi, carcinoma de nasofaringe❖, carcinoma humano de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), câncer adrenocortical (ACC)
Outras patologias	
Sistema cardiovascular	Hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia dilatada, aterosclerose
Músculo esquelético	Atrofia muscular
Tecido adiposo	Obesidade (em ratos)

● Estudos *in vitro* com inibidores de CDK9

❖ Estudos *in vivo* com inibidores de CDK9

FONTE: Adaptado de FRANCO *et al.* (2018)

Da mesma forma que as células eucarióticas, genomas virais utilizam o mecanismo de transcrição da RNAP II do organismo hospedeiro para expressar seus genes. A transcrição do genoma do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)

requer o recrutamento do complexo P-TEFb pela proteína Tat do HIV, e este sistema já foi utilizado diversas vezes para estudar o papel da CDK9 na transcrição pela RNAP II. Além do HIV, a ação do P-TEFb também está relacionada com o desenvolvimento dos seguintes tipos de vírus: citomegalovírus, influenza A, vírus da dengue, vírus Epstein-Barr, adenovírus, herpes simplex, vírus linfotrópico da célula T humana (HTLV-1), e herpesvirus associado ao Sarcoma de Kaposi (ZABOROWSKA, ISA e MURPHY, 2016).

1.7 Justificativa e objetivos gerais

Apesar de muito já ter sido revelado sobre a atuação da CDK9 no processo de transcrição e sua importância como alvo de inibidores para o tratamento de cânceres e viroses, ainda é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para que seja completamente compreendido o envolvimento do P-TEFb (CDK9/ciclina) com estas doenças. Em estudos já publicados, a CDK9 foi expressa fusionada a proteína GST (*glutathione S-transferase*) ou a MPB (*maltose binding protein*), em células de *Escherichia coli* (GRANA *et al.*, 1994), e também complexada à ciclina T quando expressas em células de inseto da espécie *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21) coinfectadas com baculovirus (BAUMLI *et al.*, 2008; HOLE *et al.*, 2013).

Apesar das dificuldades encontradas na expressão de enzimas humanas biologicamente ativas em sistemas bacterianos, o grupo de pesquisa possui ótimos resultados preliminares (LEOPOLDINO *et al.*, 2006; SANTOS, 2015). O estudo publicado por LEOPOLDINO *et al.* (2006), com participação da professora Dra. Fernanda Canduri, foi o primeiro a descrever a expressão e purificação da CDK9 solúvel, sem fusão a outras proteínas, a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)pLys. A proteína solúvel, expressa com indução por IPTG utilizando o vetor pET23a(+), foi purificada em duas etapas cromatográficas (troca iônica e afinidade ao ATP), e então caracterizada por espectroscopia de dicroísmo circular, sendo o rendimento final médio 20 mg de proteína por litro de meio de cultura.

Partindo deste primeiro estudo, SANTOS (2015) realizou diversos testes a fim de ter resultados semelhantes ao de LEOPOLDINO *et al.* (2006) na obtenção da proteína, e prosseguir com as pesquisas relacionadas a CDK9. Entretanto, utilizando ambos DNA recombinantes, pET23a:HsCDK9 (construção) e pET28a:HsCDK9 (Epoch Life Sciences) em diferentes cepas de *E. coli*, não foi possível reproduzir o

protocolo de LEOPOLDINO *et al.* (2006), e a proteína foi expressa majoritariamente insolúvel em corpos de inclusão.

A alternativa encontrada por SANTOS (2015) foi solubilizar os corpos de inclusão em tampão contendo 8M ureia e 0,5% SDS, para então purificar a CDK9 por cromatografia de afinidade a níquel, com gradiente negativo de ureia. O reenovelamento da CDK9 purificada foi testado por incubação da solução de proteína contendo 0,5% SDS após a adição do co-solvente anfipático 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), durante 24h em temperatura ambiente. O rendimento de proteína reenovelada obtido por SANTOS (2015), entretanto, foi cerca de 25 vezes menor que o de LEOPOLDINO *et al.* (2006).

Com o intuito de realizar outros estudos de caracterização além do realizado por LEOPOLDINO *et al.* (2006), este projeto propôs a obtenção da CDK9 a partir de *Escherichia coli*, sem fusão a outras proteínas, envolvendo métodos simples, de baixo custo, alto nível de expressão e fácil purificação.

1.8 **Objetivos específicos**

- Expressar a quinase dependente de ciclina 9 humana (CDK9) em *E. coli*;
- Purificar a CDK9 por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinar os elementos de estrutura secundária da CDK9 por espectroscopia de dicroísmo circular (CD);
- Estudar a desnaturação térmica da CDK9 por CD;
- Estudar a desnaturação da CDK9 induzida por ureia por espectroscopia de fluorescência.
- Verificar a interação da CDK9 com o ATP por espectroscopia de fluorescência.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Expressão e purificação da CDK9 no sistema bacteriano de *E. coli*

2.1.1 Transformação das cepas de propagação

O DNA recombinante pET28a::HsCDK9 (Epoch Life Sciences), contendo a sequência codificante da CDK9₄₂ humana depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, código NM_001261.4), inserida entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI do vetor, foi utilizado para transformar as cepas de propagação. Os procedimentos de preparação e transformação de células competentes foram idênticos aos que são descritos a seguir para as cepas de expressão. Colônias isoladas na placa de ágar foram selecionadas para inocular culturas em meio líquido. O recombinante pET28a::CDK9 clonado foi isolado a partir dos inóculos, empregando o kit de extração de DNA plasmidial *GeneJet™ Plasmid Miniprep* (Fermentas). Para confirmar a presença do DNA recombinante após a extração das células, uma amostra do plasmídeo purificado foi enviada para sequenciamento, o qual foi realizado no sequenciador *310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), do laboratório do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), utilizando o método de Sanger automatizado.

2.1.2 Transformação das cepas de expressão

Amostras de células competentes para transformação bacteriana foram preparadas pelo método de MgCl_2 - CaCl_2 adaptado do de SAMBROOK e RUSSELL (2001), no qual as células são preparadas em solução gelada de 80 mM de MgCl_2 e 20 mM de CaCl_2 e congeladas em solução 0,1 M de CaCl_2 e 20% glicerol a -80°C .

Para os experimentos de transformação, cada amostra contendo 100 μL de células competentes recém descongeladas receberam aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e em seguida sofreu choque térmico a 42°C por 2 min. Após o choque térmico, 400 μL de meio LB líquido foram adicionados, e a suspensão foi então mantida a 37°C e agitação constante de 200 rpm no shaker por 1 h. A suspensão de células foi centrifugada por 1 min a 5000 rpm e em seguida o excesso de meio foi descartado. As células, ressuspensas no meio restante, foi aplicada em placa de Petri contendo meio LB-ágar e 30 $\mu\text{g/mL}$ de

antibiótico canamicina. A placa foi mantida a 37°C, durante a noite na estufa para o crescimento das colônias.

2.1.3 Experimentos de expressão por indução com IPTG

Uma colônia isolada de células transformadas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo 30 µg/mL de antibiótico canamicina. O crescimento das células no pré-inóculo foi obtido após agitação a 250 rpm, a 37°C, por um período de 12 a 16 h. No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, 1L ou 2L, contendo 100 mL, 200 mL ou 400 mL de meio LB enriquecido, cuja composição é 20 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, 5,0 g/L de NaCl, 4,0 g/L de KCl, 3,0 g/L de MgCl₂, 1% glicerol, 50 mM Tris-HCl e 30 µg/mL de antibiótico canamicina.

Após a adição do pré-inóculo ao erlenmeyer, o crescimento celular foi monitorado através da medição da densidade ótica da suspensão por espectrofotometria. Quando a densidade ótica medida em 600 nm atingiu um valor próximo a 0,3, a temperatura programada do shaker foi abaixada para o valor desejado; uma vez alcançada a temperatura, o frasco foi mantido em repouso por 30 min a fim de entrar em equilíbrio térmico; em seguida foi adicionado IPTG para a indução da expressão da CDK9. Os experimentos de expressão foram realizados variando a temperatura do shaker e o tempo de indução para serem determinadas as melhores condições experimentais (Tabela 2).

Tabela 2. Condições testadas em experimentos de indução.

Concentração de IPTG (mM)	Temperatura (°C)	Tempo de indução (h)
0,1	30	4
0,1	20	16
0,1	12	24

FONTE: Autoria própria.

Após o término da indução, o meio de cultura foi centrifugado a 8000 x g por 30 min a 4 °C para a recuperação do sedimento bacteriano, o qual foi armazenado a -20 °C até a próxima etapa.

2.1.4 Lise celular

O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em tampão de lise (50 mM HEPES (ou Tris-HCl), 10 mM MgCl₂ . 6H₂O, 10% glicerol, pH 7,4, contendo 100, 150, 300 ou

500 mM NaCl) na proporção 1g de precipitado (*pellet*) : 5mL de tampão, dentro de banho de gelo. Em seguida foram adicionados à suspensão PMSF (com concentração final de 1 mM), 0,5 unidades da enzima DNase I e 0,1 mg/mL da enzima lisozima. A amostra foi mantida em repouso no gelo por 30 min para a ação da lisozima. Após a lise química, a amostra sofreu sonicação (10 pulsos de 30s, com intervalos de 60s, e 20% amplitude) no equipamento *Sonic Dirmembratos Model 500* (Fisher Scientific) a fim de romper todas as células e corpos de inclusão não lisados quimicamente. Por fim, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 30 min a 4°C para a separação da fração insolúvel (*pellet*) do sobrenadante. A fração insolúvel foi armazenada a -20°C e o sobrenadante a 4°C.

2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A fim de avaliar o conteúdo proteico das amostras obtidas ao final dos testes de indução, foi realizada a técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). As amostras de fração insolúvel foram ressuspendidas em tampão de lise (ou tampão contendo 8,0 M ureia, ou 2% dodecil sulfato de sódio (SDS)) com volume equivalente ao do sobrenadante para comparação entre elas. Em seguida, todas as amostras a serem analisadas receberam tampão de amostra desnaturante (0,188 M Tris-HCl; pH 6,8 contendo 6% SDS; 6 mM EDTA; 30% glicerol, 0,01% azul de bromofenol e 10% β-mercaptoetanol (βME)) na proporção volumétrica 1 (amostra) : 1 (tampão) e foram aquecidas a 95 °C por 5 min antes da aplicação no gel. Além das amostras, também foi aplicado ao gel o marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific) para a comparação das bandas de proteínas e estimativa das massas moleculares. A eletroforese foi realizada segundo o método de LAEMMLI (1970), com voltagem entre 120 e 160 V. Após a eletroforese, o gel foi impregnado com solução corante de Coomassie Brilliant Blue R e então descorado com solução descorante (50% etanol, 10% ácido acético) ou por aquecimento em água destilada para a visualização das bandas proteicas.

2.1.6 Purificação da CDK9 por cromatografia líquida

Para o isolamento e obtenção da CDK9 a partir do *pellet* celular foram realizados testes de purificação utilizando três tipos diferentes de colunas cromatográficas: coluna de interação hidrofóbica; coluna de afinidade à íon metálico

(níquel II (Ni^{2+}) ou cobalto II (Co^{2+}), dado que o plasmídeo pET28a::CDK9 expressa uma cauda de histidina (6xHis tag) N-terminal na proteína; e coluna de exclusão molecular. Após estes testes de purificação inicial, as frações contendo alta concentração da CDK9 foram aplicadas em coluna de cromatografia de troca iônica a fim de remover contaminantes.

2.1.6.1 Testes de purificação em coluna de interação hidrofóbica

O *pellet* do lisado bacteriano foi solubilizado em tampão desnaturante e a solução resultante, centrifugada a 10000xg, 4°C, por 15 min. 5 mL da solução foi então aplicada na coluna de interação hidrofóbica *HiPrep 16/10 Butyl FF* (GE Healthcare), previamente equilibrada com eluente A (Tabela 2). A cromatografia foi realizada por gradiente linear de 100% eluente A até 100% eluente B, utilizando o equipamento *ÄKTApurifier* (GE Healthcare). As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%. A Tabela 3 apresenta os materiais e as condições testadas em cada experimento.

Tabela 3. Condições testadas em purificação por cromatografia de interação hidrofóbica.

Teste	Tampão desnaturante	Condições experimentais
1	3,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM KH_2PO_4 , 8,0 M ureia, pH 7,0	Eluente A: 3,0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,0 Eluente B: 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,0
2	8,0 M ureia	Eluente A: 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,4 Eluente B: 0,1M NaCl, 0,02 M KH_2PO_4 , pH 7,4
3	8,0 M ureia	Eluente A: 3M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 Eluente B: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4

FONTE: Autoria própria.

2.1.6.2 Testes de purificação e reenovelamento em coluna IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography)

O *pellet* do lisado bacteriano foi primeiramente lavado em tampão 20 mM HEPES (ou Tris-HCl), 300 mM NaCl, pH 7,4 para remoção de proteínas que são carregadas junto com os corpos de inclusão após a centrifugação do lisado. Em seguida, os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão desnaturante contendo ureia ou SDS, e a solução resultante sofreu sonicação (5 pulsos de 10s, com intervalos de 30s, e 20% de amplitude) no equipamento *Sonic Dirmembratos Model 500* (Fisher Scientific), antes da centrifugação a 15000xg, 4°C, por 15 min. Uma amostra de 5, 10 ou 20 mL da fração sobrenadante foi aplicada na coluna de

afinidade *HisTrap FF 5 mL* (GE Healthcare), preenchida com íons Ni^{2+} e previamente equilibrada com eluente contendo o desnaturante. A cromatografia foi realizada utilizando o equipamento *ÄKTApurifier* (GE Healthcare). Para a renaturação da proteína dentro da coluna de afinidade, primeiramente foi realizado um gradiente linear negativo para a remoção do desnaturante; em seguida, um gradiente linear positivo de imidazol levou à eluição da proteína. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

Também foi testada a renaturação da proteína em solução pela precipitação à frio de SDS, baseada no procedimento de HE e OHNISHI (2017). A solução de proteínas desnaturadas por SDS sofreu sonicação e então foi mantida a 4°C por um período de 30 min a 2h para a precipitação de cristais de SDS. Após a precipitação, o excesso de SDS foi removido por centrifugação a 10000xg, 4°C, por 15 min. O remanescente de SDS presente no sobrenadante foi retirado de duas maneiras: em uma delas, foi adicionado KCl (200 ou 400 mM) para a precipitação à frio de cristais de KCl-SDS; na outra, as proteínas ligadas à coluna foram lavadas com eluente sem SDS e baixa concentração de imidazol (5 mM). A cromatografia foi realizada em coluna preenchida com íons Ni^{2+} ou Co^{2+} , e com gradiente linear positivo de imidazol de 5 a 300 mM, e as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

A Tabela 4 apresenta os materiais e as condições testadas em cada um dos experimentos com a coluna de afinidade.

Tabela 4. Condições testadas na purificação por cromatografia de afinidade.

Teste	Metal	Tampão desnaturante	Condições experimentais
4	Ni^{2+}	8,0 M ureia	Eluição gradiente partindo de A para B Eluente A: 30 mM HEPES, 600 mM NaCl, 15 mM imidazol, 8,0 M ureia, 10% glicerol, pH 7,4 Eluente B: 30 mM HEPES, 600 mM NaCl, 250 mM imidazol, 8,0 M ureia, 10% glicerol, pH 7,4
5	Ni^{2+}	30 mM HEPES, 600 mM NaCl, 5 mM imidazol, 8,0 M ureia, 10% glicerol, 0,5% SDS, pH 8,0	1. Gradiente negativo de ureia, partindo de A para B Eluente A: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 8,0 M ureia, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0 Eluente B: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0 2. Gradiente positivo de imidazol, partindo de B para C Eluente C: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0

6	Ni ²⁺	30 mM HEPES, 600 mM NaCl, 5 mM imidazol, 4,0 M ureia, 10% glicerol, 0,5% SDS, pH 8,0	1. Gradiente negativo de ureia, partindo de A para B Eluente A: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 4,0 M ureia, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0 Eluente B: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0 2. Gradiente positivo de imidazol, partindo de B para C Eluente C: 30 mM HEPES, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol, 0,5% SDS (m/v), pH 8,0
7	Ni ²⁺	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,5% SDS, 10% glicerol, 5 mM imidazol, pH 8,0	1. Gradiente negativo de SDS, partindo de A para B Eluente A: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,5% SDS, 10% glicerol, 5 mM imidazol, pH 8,0 Eluente B: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM imidazol, pH 8,0 2. Gradiente positivo de imidazol, partindo de B para C Eluente C: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 500 mM imidazol, pH 8,0
8	Ni ²⁺	50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2% SDS, 10% glicerol, pH 7,4	1. Precipitação de excesso de SDS por resfriamento a 4°C. 2. Retirada dos cristais de SDS por centrifugação. 3. Purificação com gradiente positivo de imidazol. Eluente A: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4 Eluente B: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4
9	Co ²⁺	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2% SDS, 10% glicerol, pH 7,4	1. Precipitação de excesso de SDS por resfriamento a 4°C. 2. Retirada dos cristais de SDS por centrifugação. 3. Purificação com gradiente positivo de imidazol. Eluente A: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4 Eluente B: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4
10	Co ²⁺	Similar ao do teste 9, com 5 mM de β- mercaptoetanol	Idênticas ao do teste 9.

FONTE: Autoria própria.

2.1.6.3 Testes de purificação e reenvolvimento em coluna de exclusão por tamanho

O *pellet* do lisado bacteriano foi solubilizado em tampão 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 2% SDS, 10% glicerol, pH 7,4 e a solução resultante, centrifugada a 10000xg, 4°C, por 15 min. 5 mL da solução foi então aplicada na coluna de exclusão molecular *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade* (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,4. A cromatografia foi realizada com eluição isocrática, através do equipamento *ÄKTApurifier* (GE Healthcare). As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

2.1.6.4 Testes de purificação de polimento em coluna de troca iônica

As frações contendo majoritariamente a CDK9, obtidas em etapa anterior de purificação, foram dialisadas contra tampão de baixa força iônica (tampão de ligação) e aplicadas em coluna de troca iônica para a remoção de contaminantes. As três condições testadas na coluna *MonoS* (GE Healthcare), cuja resina é trocadora de cátions, estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições testadas em purificação por cromatografia de troca iônica.

Teste	Condições experimentais
12	Tampão de ligação: 20 mM HEPES, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,4. Tampão de eluição: 20 mM HEPES, 1M NaCl, 10% glicerol, pH 7,4. Eluição gradiente até 0,5M NaCl, seguida de eluição isocrática com 1M NaCl.
13	Tampão de ligação: 20 mM HEPES, 10% glicerol, pH 7,4. Tampão de eluição: 20 mM HEPES, 1M NaCl, 10% glicerol, pH 7,4. Eluição gradiente até 0,5M NaCl, seguida de eluição isocrática com 1M NaCl.
14	Tampão de ligação: 50 mM ácido acético, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 5,0. Tampão de eluição: 50 mM ácido acético, 1M NaCl, 10% glicerol, pH 5,0. Eluição gradiente até 0,5M NaCl, seguida de eluição isocrática com 1M NaCl.

FONTE: Autoria própria.

2.2 Caracterização estrutural da CDK9 por espectroscopia de dicroísmo circular

2.2.1 Análise de estruturas secundárias em diferentes concentrações de CDK9

Espectros de dicroísmo circular usando comprimento de onda UV/visível (260-190 nm) foram coletados a 20°C em cubeta retangular de 0,1 cm, no espectrômetro de dicroísmo circular *Jasco J-815* da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI - IQSC). As proteínas, dialisadas em tampão 20 mM Tris-H₂SO₄, 50 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, 5% glicerol, pH 7,4, foram diluídas com água deionizada até a concentração final desejada. A concentração das amostras foi determinada utilizando a fórmula de Lambert-Beer no espectrofotômetro *DS-11+* (De Novix), do laboratório do Grupo de Estudos em Química Medicinal (NEQUIMED, IQSC/USP).

Após a coleta dos dados, os valores de elipticidade (em graus) medidos no instrumento foram convertidos para elipticidade molar residual segundo a Equação (1). Em seguida, os espectros foram analisados usando os programas gráficos *CDNN Deconvolution* (BÖHM, MUHR e JAENICKE, 1992) e *DichroWeb* (WHITMORE e WALLACE, 2008). Nas análises com o *CDNN Deconvolution* foi utilizado o banco de 13 espectros base, para espectros de CD simples, e nas com *DichroWeb* foram usados o método CDSSTR (SREERAMA e WOODY, 2000) e o banco de dados SMP180 (ABDUL-GARNER, MILES e WALLACE, 2011).

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \quad (1)$$

onde, θ é a elipticidade em graus, M é a massa molecular da proteína em kDa, C é a concentração em mg/ml, l é o caminho ótico em cm, n é o número de resíduos de aminoácidos, e $[\theta]$ é a elipticidade molar residual em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

2.2.2 Análise de elementos de estrutura secundária em diferentes temperaturas

Para análise da mudança nos elementos de estrutura secundária com o aumento da temperatura, espectros de dicróismo circular foram coletados a cada 5°C, a partir de temperatura inicial de 20°C até a final de 90°C, com gradiente de 2°C/min. O intervalo de comprimento de onda analisado foi de 190 a 260 nm e a coleta de dados, com 10 acumulações, foi iniciada somente após 60s em que a temperatura foi estabilizada em $\pm 0,1^\circ\text{C}$ do valor desejado.

2.2.3 Determinação da Tm por desnaturação/renaturação térmica monitorada em comprimento de onda fixo

Para determinar a temperatura de desnaturação da CDK9, o sinal de elipticidade foi obtido em 208 nm, a cada 0,5°C, de 20 a 90°C. A coleta do sinal foi iniciada somente após 30s em que a temperatura foi estabilizada em $\pm 0,1^\circ\text{C}$ do valor desejado. Após a desnaturação até 90°C, o retorno à temperatura inicial de 20°C foi monitorado com os mesmos parâmetros utilizados para o aumento da temperatura. A curva de temperatura *versus* elipticidade molar residual foi ajustada utilizando o ajuste sigmoidal de Boltzmann, no programa *Origin 2019*, e a temperatura de desnaturação (T_m) da proteína foi obtida diretamente deste ajuste.

2.3 Caracterização estrutural da CDK9 por espectroscopia de fluorescência

2.3.1 Desnaturação química induzida com ureia

As proteínas (0,1 mg/ml), em tampão 20 mM Tris-H₂SO₄, 50 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7,4, foram desnaturadas em diferentes concentrações de ureia, variando de 0 a 8 M, por 1h em temperatura ambiente. As curvas de emissão de fluorescência para cada solução foram obtidas no espectrofluorofotômetro *RF-5301PC* (*Shimazu Europe*), no intervalo de 305 a 420 nm, em cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico, após excitação da amostra em 295 nm. As larguras de fendas de excitação e emissão utilizadas foram 3 e 5 nm, respectivamente.

2.3.2 Análise da supressão da fluorescência induzida pela interação com ATP

A supressão da fluorescência da CDK9 resultante da ligação do ATP foi realizada por titulação da proteína (0,05 mg/ml, em tampão 20 mM Tris-H₂SO₄, 50 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7,4) com ATP.Mg²⁺ (0,5 M). O espectro de emissão de fluorescência da proteína foi coletado após cada adição de alíquotas de 0,24 µL da solução de ATP, com a amostra excitada em 280 nm e o espectro de emissão obtido no intervalo de 295 a 420 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1,0 cm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sequenciamento do DNA recombinante pET28a::CDK9

A fim de expressar a CDK9 em células de *E. coli*, o plasmídeo pET28a::CDK9, produzido sob encomenda pela empresa *Epoch Life Sciences*, foi primeiramente propagado em *E. coli* DH5 α competentes através de transformação bacteriana. As principais características do vetor escolhido, pET28a, são: resistência ao antibiótico canamicina, promotor híbrido T7/lac, origem de replicação f1, sequência de His.Tag N-terminal, sítio de clivagem por trombina, Tag T7 interna e sequência opcional de His.Tag C-terminal. O plasmídeo contém a sequência codificante completa da isoforma CDK9₄₂ (1119 bp), inserida entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, o que confere à proteína expressa uma cauda de histidina (6xHisTag), um sítio de clivagem da 6xHisTag por trombina, e o epítipo T7 fusionados à sua sequência N-terminal. O mapa do plasmídeo utilizado está representado na Figura 11.

Figura 11. Mapa do plasmídeo usado para expressão da CDK9 em *E. coli*, contendo o vetor pET28a(+) e a sequência completa da CDK9.

FONTE: Fornecido por *Epoch Life Sciences*.

O plasmídeo purificado após a propagação em *E. coli* DH5α foi levado para sequenciamento pelo método de Sanger automatizado. A integridade do DNA recombinante pET28a::CDK9 foi verificada através do alinhamento da sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento da amostra com a sequência fornecida pela empresa *Epoch Life Sciences* e a sequência codificante da CDK9₄₂ humana depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com código NM_001261.4, com o auxílio do software *MultiAlin* (CORPET, 1988). O resultado do alinhamento é apresentado na Figura 12.

Figura 12. Alinhamento da sequência de nucleotídeos da CDK9 humana (NM_001261.4:116-1234) com a sequência encomendada pela empresa *Epoch Life Sciences*, e o resultado do sequenciamento para o molde direto (nucleotídeos 1 ao 650) e o molde reverso (nucleotídeos 651 ao 1348, em caixa pontilhada). Vermelho: nucleotídeos idênticos entre as sequências alinhadas; azul: baixo consenso entre os nucleotídeos; preto: nucleotídeos sem alinhamento.

Fonte: Autoria própria.

Comparando a sequência da CDK9 depositada no NCBI com o resultado do sequenciamento para ambas as fitas de DNA (A = direta, B = reversa) é possível verificar a integridade do DNA recombinante pela identidade entre as sequências alinhadas.

3.2 Experimentos de expressão

Os experimentos de expressão da CDK9 em células de *E. coli* da cepa BL21(DE3) foram avaliados por eletroforese SDS-PAGE 15%. Na Figura 13 está o gel com amostras dos experimentos realizados com indução por 0,1 mM de IPTG a 12°C por 24 horas (raias 2 e 3), a 20°C por 16 horas (raias 4 e 5), e a 30°C por 4h (raias 6 a 7). Comparando as bandas obtidas para estas condições, é possível verificar que não houve diferença significativa na obtenção da CDK9 solúvel quando a indução é realizada em maior tempo e menor temperatura (12°C, 24 horas). A proteína de interesse, cuja massa molecular é aproximadamente 46 kDa (com a cauda de histidina), é expressa majoritariamente insolúvel. Com o aumento da temperatura, a produção da CDK9 na fração insolúvel é consideravelmente maior em um tempo de indução menor. No trabalho de SANTOS (2015), foram realizados diversos outros testes de expressão na tentativa de expressar a CDK9 solúvel em bactéria a partir do mesmo DNA recombinante; entretanto, a CDK9 foi também superexpressa na fração insolúvel do lisado celular.

Figura 13. Gel de SDS-PAGE dos experimentos de indução com 0,1 mM de IPTG em diversas temperaturas. Da esquerda para direita: 1 = marcador, 2, 3 = sobrenadante e *pellet* do lisado após 24h de indução a 12°C; 4, 5 = após 16h de indução a 20°C; 6, 7 = após 4h de indução a 30°C.

FONTE: Autoria própria.

A lise das células obtidas nos testes de expressão foi realizada em tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10% glicerol, pH 7,4. Para verificar a influência da quantidade de NaCl na obtenção da CDK9 na fração sobrenadante, foram feitos testes de lise em tampões com diferentes concentrações do sal (100, 150, 300 e 500 mM de NaCl). O resultado apresentado na Figura 14 mostra que não há diferença no padrão de solubilização da proteína de interesse com o aumento da concentração de NaCl.

Figura 14. Testes de solubilidade da CDK9 em diferentes concentrações de NaCl no tampão de lise. Condições de expressão: indução com 0,1 mM IPTG, a 30°C por 6 horas. Da esquerda para a direita, 1 = marcador, 2, 3 = sobrenadante e *pellet* da lise com 100 mM NaCl, 4, 5 = lise com 150 mM NaCl, 6, 7 = lise com 300 mM NaCl, 8, 9 = lise com 500 mM NaCl.

FONTE: Autoria própria.

O uso de células de *E. coli* para expressão heteróloga de proteínas possui várias vantagens em relação ao uso de células eucarióticas: i) cinética de crescimento muito rápido; ii) culturas celulares de alta densidade são facilmente obtidas; iii) o meio de cultura rico em nutrientes pode ser preparado a partir de componentes baratos e facilmente disponíveis comercialmente; iv) o processo de transformação com o DNA exógeno é rápido e fácil (ROSANO e CECCARELLI, 2014). As principais desvantagens do sistema bacteriano na produção de proteínas de organismos eucarióticos são a incapacidade do maquinário celular bacteriano de produzir modificações pós-tradicionais complexas na proteína (por exemplo, glicosilação), e a formação de agregados insolúveis da proteína inativa na forma de corpos de inclusão (VALLEJO e RINAS, 2004).

Apesar da CDK9 ter sido expressa em corpos de inclusão, é possível encontrar vantagens neste resultado. Corpos de inclusão possibilitam a produção de

proteínas que são tóxicas para a célula hospedeira, geralmente em alto nível de expressão e alto grau de pureza na fração agregada; podem ser facilmente separados das proteínas citoplasmáticas da bactéria por centrifugação e conferem proteção contra degradação proteolítica em comparação à fração solúvel (ROSANO e CECCARELLI, 2014; VALLEJO e RINAS, 2004). Portanto, as próximas etapas foram experimentos de solubilização dos corpos de inclusão e reenovelamento da CDK9 superexpressa na forma inativa.

3.3 Testes de reenovelamento e purificação

A fim de purificar e recuperar a estrutura da CDK9 expressa insolúvel, foram testados diversos protocolos de solubilização com agentes desnaturantes e estratégias de purificação com reenovelamento. Os métodos utilizados foram escolhidos a partir de propriedades físico-químicas estimadas através de análise da estrutura primária da proteína (com a cauda de histidina N-terminal) no programa online *Protparam*. Em todos os testes de purificação, a proteína insolúvel foi obtida por indução da expressão a 30°C e adição de 0,1 mM IPTG.

3.3.1 Testes de purificação em coluna hidrofóbica

Nos primeiros experimentos de purificação (Tabela 2) foi utilizada a coluna de interação hidrofóbica *HiPrep 16/10 Butyl FF* (GE Healthcare), cujo princípio de separação é o grau de hidrofobicidade das proteínas. A tentativa inicial de solubilização do *pellet* em tampão 20 mM KH_2PO_4 , 3,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8,0 M ureia, pH 7,0 não foi bem-sucedida, pois o sulfato de amônio, muito aplicado em cromatografia de interação hidrofóbica, é também usado como agente precipitante de proteínas e dificultou a solubilidade daquelas presentes no *pellet*. Foi possível a solubilização das proteínas utilizando somente 8,0 M de ureia, porém as tentativas de purificação por este método não apresentaram resultados positivos: as proteínas aderiram fortemente à coluna ou precipitaram na mesma, ainda que o sulfato de amônio utilizado no eluente A, tivesse sido trocado pelo cloreto de sódio, sal de menor força iônica.

3.3.2 Testes de purificação em coluna de afinidade a metal

A purificação da CDK9 também foi testada em coluna de afinidade ao níquel. Inicialmente o *pellet* de proteínas aplicado à coluna foi solubilizado em tampão

contendo ureia (8,0 ou 4,0 M) e 0,5% de SDS (Testes 4, 5 e 6, Tabela 3). A CDK9 desnaturada se ligou à coluna, porém após o gradiente negativo de ureia, a proteína ainda permaneceu desnaturada devido a presença de 0,5% de SDS. No teste 7 (Tabela 3), o *pellet* foi solubilizado em tampão contendo apenas 0,5% SDS, e a cromatografia com gradiente negativo de SDS seguido de gradiente positivo de imidazol foi executada a fim de promover o reenovelamento e purificação da CDK9 dentro da coluna. Foi necessária maior quantidade de tampão para solubilizar todo o *pellet*, e ao fim do processo foi observado que o SDS não foi totalmente removido, devido a precipitação do sal após armazenamento das frações coletadas a 4°C.

Enquanto estavam sendo realizados os testes utilizando a coluna de afinidade ao níquel, também foi testado o reenovelamento e purificação da CDK9 em coluna de exclusão molecular. O *pellet* solubilizado em tampão contendo 2% SDS foi aplicado na coluna *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade* previamente equilibrada em tampão sem desnaturante, e a cromatografia foi realizada pela eluição isocrática com tampão 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,4. Provavelmente pela retirada do glicerol durante o processo, parte da CDK9 precipitou; a outra parte foi eluída juntamente com proteínas de maior massa molecular.

Com base no procedimento de solubilização e reenovelamento de proteínas em corpos de inclusão descrito por HE e OHNISHI (2017), o *pellet* de proteínas foi solubilizado em tampão 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2% SDS, 10% glicerol, pH 7,4. O excesso de SDS foi então retirado da solução por precipitação à frio (~4°C) na geladeira, de 2h a 16h. Após a precipitação, os cristais de SDS foram separados por centrifugação. Em seguida, testes para a remoção do restante de SDS, com a adição de KCl foram realizados. Infelizmente, a adição de KCl (400 ou 200 mM) resultou na precipitação de grande parte da proteína solubilizada (Figura 15).

Figura 15. Gel de SDS-PAGE dos testes de reenovelamento da CDK9 por precipitação do SDS com KCl. 1 = marcador; 2 = sobrenadante da lise (30 mL); 3 = sobrenadante da lavagem do *pellet* (10 mL); 4 = *pellet* solubilizado em 2% SDS (9,5 mL); 5 = sobrenadante após precipitação do SDS (9,5 mL); 6 = precipitado de SDS solubilizado em 9,5 mL de tampão desnaturante; 7, 8 = sobrenadante e *pellet* após adição de 200 mM KCl; 9, 10 = sobrenadante e *pellet* após adição de 400 mM KCl.

FONTE: Autoria própria.

Devido à precipitação das proteínas após a adição de KCl, esta etapa foi excluída do Teste 8 (Tabela 4). Após a centrifugação do SDS precipitado, a solução de proteínas foi aplicada na coluna de afinidade preenchida com níquel ou cobalto. Para garantir a remoção total do SDS, após a injeção da amostra foram aplicados 10 volumes de coluna de tampão de ligação (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4). Em seguida, foi aplicado o gradiente de imidazol, com tampão de eluição (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10% glicerol, pH 7,4), para a retirada da proteína de interesse da coluna. A Figura 16 apresenta o cromatograma obtido neste experimento e a Figura 17 mostra os géis de SDS-PAGE 15% contendo a composição proteica das soluções em cada etapa do processo de purificação.

Figura 16. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de afinidade ao níquel. A eluição foi alcançada com 90,55 mM de imidazol (29% de tampão de eluição).

FONTE: Autoria própria.

Figura 17. Géis de SDS-PAGE 15% do teste de reenovelamento e purificação da CDK9 por precipitação do SDS e cromatografia de afinidade ao níquel. (A) 1 = marcador; 2 = sobrenadante da lise; 3 = lavagem do *pellet* com tampão 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,4; 4 = *pellet* solubilizado com SDS; 5 = *pellet* solúvel após precipitação do SDS; 6 = fração 5 da cromatografia; 7 a 10 = frações 69 a 72 eluídas no gradiente de imidazol. (B) 1 = marcador; 2 a 10 = frações 69 a 77 da cromatografia de afinidade.

FONTE: Autoria própria.

Observa-se que na cromatografia de afinidade, parte da CDK9 não se ligou ao níquel e foi eluída logo após sua aplicação; a fração de proteína ligada foi eluída com alto grau de pureza durante o gradiente de imidazol (raias 7 a 10 do gel A da Figura 17).

A fim de recuperar a quantidade de CDK9 que é perdida durante as etapas de aplicação da amostra e lavagem da coluna de afinidade a níquel, o mesmo método cromatográfico foi testado com afinidade ao cobalto (Teste 9), devido à maior interação específica que o cobalto possui com caudas de histidina, o que resulta em menor interação não-específica com outras proteínas, quando comparado com o níquel. A alteração do metal, entretanto, não resultou em garantia de alto rendimento de purificação; os resultados obtidos após diversos experimentos com a coluna de afinidade apresentaram rendimentos bem variáveis – enquanto em algumas purificações praticamente toda a proteína recombinante se ligava à coluna; em outras, parte era perdida na lavagem da coluna com tampão de ligação.

A partir destes primeiros resultados, algumas considerações foram feitas: o tempo de descanso da solução a 4°C para a precipitação do SDS influencia na quantidade de SDS removido, e portanto, na porcentagem de proteínas parcialmente ou totalmente reenoveladas; quando desnaturada, a proteína se liga à coluna por meio da cauda de histidina, porém na forma estruturada, não deve se ligar devido à conformação adotada pela cauda, que tira as histidinas da exposição ao meio. Controlar a quantidade de SDS precipitado em um mesmo tempo de incubação é muito difícil, pois diversos fatores influenciam neste processo; portanto, o tempo no qual a solução é mantida a 4°C é variável – no caso da CDK9, esse tempo foi de 30 min a 2h, dependendo da velocidade de precipitação verificada. Quanto à hipótese da cauda se esconder na proteína enovelada, a predição de elementos de estrutura secundária, feita a partir da sequência primária da CDK9 com o programa *PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench*, contribuiu ainda mais para a consideração desta hipótese (Figura 18): a presença de uma volta de hélice nos resíduos 21 e 22 da sequência contribuem para o dobramento da extremidade N-terminal da proteína, que pode esconder a cauda.

Figura 18. Predição de elementos de estrutura secundária da sequência da CDK9 com cauda de histidina, feita a partir do programa PSIPRED.

FONTE: PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench.

Devido a presença de cisteínas na sequência primária da CDK9, foi adicionado 5% de β -mercaptoetanol (β ME) como agente redutor no tampão de solubilização das proteínas contendo 2% SDS; o agente redutor previne a formação de pontes dissulfeto incorretas, contribuindo para o reenovelamento correto da proteína. O β ME foi excluído dos tampões devido a redução indesejada dos íons metálicos ligados na coluna, e adicionado novamente ao tampão de diálise pós-purificação. Após a adição do β ME no tampão de amostra, as proteínas parcialmente enoveladas, que se ligaram à coluna de afinidade após a injeção, foram eluídas com maior concentração de imidazol do que os experimentos anteriores, o que indica maior afinidade da cauda de histidina pelo metal (Figura 19). O gel de SDS-PAGE realizado após o experimento de purificação é apresentado na Figura 20.

Figura 19. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de afinidade ao cobalto, com adição de β ME ao tampão de solubilização da amostra. A eluição foi alcançada com ~240 mM de imidazol (~80% de tampão de eluição).

FONTE: Autoria própria.

Figura 20. Gel de SDS-PAGE 15% do teste de reenovelamento e purificação da CDK9 por precipitação do SDS e cromatografia de afinidade ao cobalto. 1 = marcador; 2 = sobrenadante da lise; 3 = sobrenadante da lavagem do *pellet*; 4 = *pellet* solubilizado com SDS; 5 = *pellet* solubilizado após precipitação do SDS; 6 = proteínas eluídas logo após a injeção da amostra; 7 = frações do pico eluído no gradiente de imidazol (3,921 mg/mL); 8 = diluição 2x da amostra em 7; 9 = diluição 8x da amostra em 7.

FONTE: Autoria própria.

Para calcular a porcentagem de pureza da proteína eluída na cromatografia de afinidade foi utilizado o *software ImageJ*, desenvolvido pelo NIH (*National Institute of Health*). O resultado da análise da raia 9 da Figura 20 mostrou que a banda da CDK9 representa aproximadamente 97,6% do total de proteínas no gel. O rendimento total desta etapa de purificação variou entre as replicatas devido as perdas decorrentes da proteína não ligada à coluna de afinidade, sendo 27,4 mg de proteína purificada por litro de meio de cultura o valor máximo obtido, e 8 mg por litro o menor valor. A reconstrução do DNA recombinante, garantindo a exposição da cauda de histidina, poderia levar ao aumento dos rendimentos alcançados.

Ainda que neste trabalho a CDK9 foi obtida por reenovelamento da proteína super expressa insolúvel em corpos inclusão, a metodologia utilizada apresenta diversas vantagens em relação às aplicadas nos estudos de LEOPOLDINO *et al.* (2006) e SANTOS (2015), pois possui uma única etapa de purificação, menor tempo de execução, procedimentos mais simples e maior rendimento final da proteína na forma enovelada, e a otimização da etapa de purificação tem potencial de fornecer rendimentos ainda mais altos que os aqui apresentados.

3.3.3 Testes de purificação de polimento em coluna de troca iônica

As frações de CDK9 com pureza abaixo de 95%, eluídas na cromatografia de afinidade a cobalto, foram aplicadas em coluna de troca iônica a fim de separar as proteínas co-eluídas na primeira etapa de purificação. No Teste 12 (Tabela 5), a CDK9 em tampão contendo 300 mM NaCl e ~80 mM imidazol, foi dialisada em membrana de ultrafiltração contra tampão 20 mM HEPES, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,4. A amostra foi aplicada na coluna de troca catiônica *MonoS*, porém nenhuma fração se ligou à coluna, sendo eluída logo que injetada, como atestado pelo cromatograma na Figura 21.

Figura 21. Cromatograma da purificação da CDK9 em coluna de troca catiônica.

FONTE: Autoria própria.

A próxima tentativa (Teste 13) consistiu na remoção de todo sal da amostra, a fim de verificar se a proteína se ligava à coluna. Porém foi observado o mesmo resultado obtido no Teste 12. Ainda que o pI teórico da CDK9 (com a cauda de histidina) seja 9,12, indicando o uso da coluna de troca catiônica com pH 7,4, apenas estudando a composição de aminoácidos da proteína foi possível encontrar a causa da CDK9 não se ligar à coluna nesse pH: aminoácidos carregados positivamente (arginina, lisina e histidina) correspondem a 17% dos resíduos da proteína, enquanto os carregados negativamente (aspartato e glutamato) somam 10,9% do total; em pH 7,4 resíduos de histidina (3,7%, incluindo as da 6xHis tag) tem sua cadeia lateral ($pK_a = 6,0$) na forma neutra; dessa forma, a carga positiva líquida da proteína em pH 7,4 é de 2,6%, sendo muito baixa para proporcionar uma ligação efetiva na coluna de troca catiônica.

O Teste 14 foi a última tentativa de purificação com a cromatografia de troca iônica. Nele a proteína eluída na cromatografia de afinidade foi dialisada em membrana de ultrafiltração contra tampão 50 mM ácido acético, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 5,0. Entretanto, a proteína, obtida solúvel por um processo de renaturação, não suportou as condições aplicadas, precipitando no processo de diálise. Após estes três testes com a coluna catiônica *MonoS*, foi verificada a inviabilidade do uso da técnica para a segunda etapa de purificação da CDK9 renaturada.

3.4 Experimentos com espectroscopia de dicroísmo circular

Dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) refere-se a absorção diferencial das luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda, componentes de igual magnitude da luz plano-polarizada. A radiação resultante do dicroísmo circular possui polarização elíptica, e o sinal de CD é observado quando o cromóforo é oticamente ativo. Em proteínas, os cromóforos intrínsecos são: a ligação peptídica, com absorção abaixo de 240 nm; as cadeias de laterais de aminoácidos aromáticos, que absorvem entre 260 e 320 nm; e ligações dissulfeto, que apresentam bandas de absorção amplas e fracas próximas a 260 nm (KELLY, JESS e PRICE, 2005). A ligação peptídica possui dois tipos de transição eletrônica decorrentes da absorção de luz: a transição $n \rightarrow \pi^*$, eletronicamente proibida e magneticamente permitida, gera bandas negativas amplas e fracas, centradas em 220 nm, e a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, que é responsável pela banda mais forte próxima a 190 nm. Os diferentes tipos de estrutura secundária comumente encontrados em proteínas resultam em espectros de dicroísmo circular característicos devido aos diferentes perfis de absorção que apresentam (KELLY, JESS e PRICE, 2005).

3.4.1 Análise de estruturas secundárias em diferentes concentrações de CDK9

A fim de analisar a presença de estrutura secundária da CDK9 obtida a partir do reenovelamento de proteínas em corpos de inclusão, foram coletados espectros de dicroísmo circular (CD) em diferentes concentrações da proteína. Antes das análises, as proteínas, já dialisadas para remoção do imidazol, foram diluídas em

água deionizada até as concentrações desejadas. A Figura 22 apresenta os espectro de CD obtidos em 2, 4 e 6 μM de proteína e a

Tabela 6 mostra os resultados das análises de estruturas secundárias obtidas nos programas *CDNN Deconvolution* e *DichroWeb* para a média dos espectros das três concentrações, e compara estes valores com os obtidos na literatura.

Figura 22. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 em diferentes concentrações da proteína.

FONTE: Autoria própria.

Tabela 6. Comparação dos dados obtidos na literatura com os resultados das análises de estrutura secundária, feitas com os programas CDNN Deconvolution e DichroWeb

Tipo de estrutura secundária	CDNN	DichroWeb	LEOPOLDINO et al. (2006)	BAUMLI et al., 2008
Hélices α	33,1%	31%	30-34%	32%
Fitas β	17,1%	20%	33-36%	14%
Voltas	16,8%	14%	-	-
Estruturas não periódicas	33,3%	35%	21-29%	-

FONTE: Autoria própria.

As porcentagens de cada estrutura secundária calculadas para os dados experimentais (31-33% hélices α , 17-20% fitas β , 14-17% voltas, 33-35% *coil*) encontram-se muito próximas dos resultados obtidos por LEOPOLDINO et al. (2006)

– 30-34% de hélices α , 33-36% de folhas β e 21-29% de estruturas não periódicas, e também das porcentagens determinadas por estrutura cristalográfica (32% hélices α , 14% fitas β , PDB 3BLH, (BAUMLI *et al.*, 2008)). A obtenção deste resultado a partir de expressão heteróloga em *E. coli*, ainda que em corpos de inclusão, é muito interessante, pois indica que a CDK9 adquiriu estrutura enovelada similar, senão idêntica, à apresentada nos trabalhos publicados mencionados, nos quais a proteína é obtida em células de inseto, ou com baixo rendimento a partir da fração solúvel do lisado de *E. coli*, e através de métodos mais complexos e dispendiosos.

3.4.2 Estabilidade estrutural da CDK9 frente ao tempo de estocagem a 4°C

Após a diálise da CDK9 reenovelada e purificada, a proteína foi mantida na geladeira a 4°C, em concentração de aproximadamente 6 mg/mL. A fim de verificar mudanças na estrutura secundária decorrentes do tempo de estocagem, foram coletados espectros de CD dias e meses após a etapa de reenovelamento e purificação. A Figura 23 mostra os espectros obtidos logo após a purificação e diálise, e com 15, 30, e 60 dias após estas etapas. Considerando o erro dado pelo equipamento, a proteína apresentou boa estabilidade estrutural com o tempo de estocagem, mantendo sua estrutura secundária por no mínimo 60 dias.

Figura 23. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 (4 μ M) com diferentes tempos de estocagem a 4°C.

FONTE: Autoria própria.

3.4.3 Análise de elementos de estrutura secundária em diferentes temperaturas

Através da espectroscopia de dicroísmo circular foi também possível analisar as mudanças na estrutura secundária da proteína em função da temperatura. Cada tipo de estrutura secundária possui bandas de absorção características: proteínas onde as hélices α são predominantes apresentam bandas negativas em 208 e 222 nm, e uma banda positiva em 193 nm; proteínas com folhas β pregueadas antiparalelas bem-definidas possuem bandas negativas em 218 nm e bandas positivas em 195 nm; proteínas que não possuem estruturas tão definidas (desordenadas) possuem bandas negativas próximas a 195 nm e elipticidade muito baixa acima de 210 nm (GREENFIELD, 2007). A Figura 24 apresenta os espectros de CD da CDK9 em temperaturas entre 20 e 90°C.

Figura 24. Espectros de dicroísmo circular da CDK9 (4 μ M) em diversas temperaturas.

FONTE: Autoria própria.

Comparando as curvas entre 20 e 60°C, verifica-se que as hélices α são os primeiros elementos a perder estrutura com o aumento da temperatura, devido a ocorrência de maior variação de sinal em aproximadamente 208 nm. Somente a partir de 60°C, a banda negativa em torno de 220 nm (onde a absorção das hélices α e folhas β estão sobrepostas) tem sua intensidade drasticamente diminuída com o

aumento da temperatura. Acima de 75°C, a estrutura das proteínas encontra-se majoritariamente desordenada.

3.4.4 Determinação da T_m por desnaturação térmica monitorada em comprimento de onda fixo

Com a medição da elipticidade da CDK9 com concentração de 6 μM , no comprimento de onda de 208 nm e em diferentes temperaturas, foi possível verificar a estabilidade da proteína em relação aos processos de desnaturação e renaturação térmica. O perfil sigmoidal da curva obtida com o tratamento dos dados indica que a desnaturação térmica da CDK9 ocorre sem a formação de intermediários, partindo do estado enovelado para o totalmente desenovelado. Com o aumento da temperatura, de 20 até 90°C, a elipticidade molar residual se manteve constante até aproximadamente 50°C, como mostra a Figura 25. A temperatura de desnaturação, definida como a temperatura na qual 50% da proteína está desenovelada, pode ser determinada em 65,9°C. A renaturação da proteína com o retorno a temperatura inicial não foi observada.

Figura 25. Desnaturação térmica da CDK9 (6 μM) monitorada por dicroísmo circular em 208 nm. Em cinza, os pontos obtidos em duplicata; em vermelho, a curva obtida pelo método de Boltzmann no ajuste da média dos dados.

Fonte: Autoria própria.

3.5 Experimentos com espectroscopia de fluorescência

Proteínas podem ser intrinsicamente fluorescentes devido à presença de resíduos aromáticos na sua sequência primária, os quais são triptofano, tirosina e fenilalanina. Os coeficientes de extinção molar destes aminoácidos são $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (com máximo de absorção em 280 nm) para o triptofano, $1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (em 280 nm) para a tirosina, e $195 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (em 258 nm) para fenilalanina (JAMESON, 2014; PACE *et al.*, 1995). Triptofanos, por possuírem coeficiente de extinção bem mais alto do que os outros dois tipos de aminoácidos, geralmente dominam o espectro de emissão de proteínas (JAMESON, 2014).

Quando é desejado a excitação apenas de triptofanos, experimentos de fluorescência podem ser conduzidos com excitação entre 295-305 nm, pois abaixo desta faixa de comprimento de onda, os resíduos de tirosina também possuem absorção. Além disso, os resíduos de triptofano são sensíveis ao meio no qual estão inseridos; em água, a emissão máxima do triptofano ocorre próximo a 350 nm, e é altamente dependente da polaridade do meio, pois a formação de pontes de hidrogênio no nitrogênio imino do anel indol do triptofano desloca o espectro de fluorescência para comprimentos de onda maiores (LAKOWICZ, 2006).

A sequência primária da CDK9 contém 33 resíduos de aminoácidos que emitem fluorescência: sendo 5 triptofanos, 14 tirosinas e 14 fenilalanina. Portanto, com excitação em 280 nm, a contribuição das tirosinas ($14 \times 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 20860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o coeficiente de extinção molar da proteína é próxima a dos triptofanos ($5 \times 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Considerando estas informações, foram realizados experimentos com fluorescência para verificar a desnaturação química da CDK9 induzida com ureia e a supressão de fluorescência da CDK9 com a ligação da proteína ao ATP.

3.5.1 Desnaturação química induzida com ureia

A estabilidade química da CDK9 frente a desnaturação com ureia foi estudada por espectroscopia de emissão de fluorescência intrínseca da proteína em temperatura ambiente após excitação da amostra em 295 nm. A Figura 26 apresenta o espectro de emissão de fluorescência da CDK9 em diferentes concentrações de ureia.

Figura 26. Espectro de emissão de fluorescência da CDK9 em diferentes concentrações de ureia. Amostra com concentração de $\sim 2 \mu\text{M}$, excitada em 295 nm.

FONTE: Autoria própria.

O espectro de fluorescência da proteína na ausência do desnaturante apresentou intensidade máxima de emissão em 336 nm, indicando que os resíduos de triptofano da CDK9 reenovelada se encontravam acomodados no interior hidrofóbico de sua estrutura. Com a adição do desnaturante, o ponto máximo do espectro foi deslocado para a direita, até o comprimento de onda de 350 nm em 8M de ureia, característico de triptofanos expostos ao meio aquoso no estado completamente desenovelado da proteína. É possível observar também que a intensidade de fluorescência aumenta conforme a proteína é desnaturada e expõe seus resíduos ao solvente, o que sugere a supressão intramolecular da fluorescência de um ou mais triptofanos no interior da proteína nativa (ROYER, 2006).

Para obter o perfil de desnaturação da CDK9 em função do aumento da concentração de ureia, foram calculadas as frações de proteínas desnaturadas (f_d) a partir do centro de massa (ou comprimento de onda de emissão médio, λ_{cm}) de cada espectro de fluorescência coletado, utilizando as Equações 2 e 3 (CARUSO, 2007; JAMESON, 2014).

$$\lambda_{cm} = \sum_{i=1}^N (I_i \lambda_i) / \sum_{i=1}^N (I_i) \quad (2)$$

$$f_d = \frac{(\lambda_{cm})_n - (\lambda_{cm})_{obs}}{(\lambda_{cm})_n - (\lambda_{cm})_d} \quad (3)$$

onde, $(\lambda_{cm})_{obs}$ é o centro de massa da área do pico do espectro de fluorescência da amostra em uma determinada condição, $(\lambda_{cm})_n$ e $(\lambda_{cm})_d$ são os centros de massa para os estados nativo e totalmente desnaturado, I é a intensidade máxima de fluorescência em um dado comprimento de onda λ .

A Figura 27 mostra a relação da concentração de ureia em solução com a fração de CDK9 desnaturada.

Figura 27. Perfil de desnaturação da CDK9 induzida por ureia, medida por fluorescência. Em cinza, os pontos obtidos em duplicata; em vermelho, a curva obtida pelo método de Boltzmann no ajuste da média dos dados.

FONTE: Autoria própria.

Esse perfil sigmoide da curva obtida sugere que a desnaturação da CDK9 induzida por ureia segue um mecanismo de dois estados, nativo (N) e totalmente desnaturado (D). O ajuste dos dados pelo método de Boltzmann apresentou coeficiente de determinação R^2 de 0,99666, e ponto médio na concentração de 4,92 M de ureia.

No processo de desnaturação composto por dois estados, $N \rightleftharpoons D$, a constante de equilíbrio aparente, K_D , para cada concentração de ureia pode ser determinada pela Equação (4), e a partir de K_D , é possível calcular a variação da energia livre de Gibbs, ΔG – Equação (5) (AHMAD e BIGELOW, 1982; KURTIN e LEE, 2002).

$$K_D = \frac{[D]_{eq}}{[N]_{eq}} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{f_D}{1 - f_D} \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_D \quad (5)$$

onde, $[D]_{eq}$ e $[N]_{eq}$ são as concentrações da proteína desnaturada e nativa no equilíbrio, f_D e f_N as frações de proteína desnaturada e nativa, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta.

A extrapolação linear do gráfico de ΔG versus concentração de ureia fornece o valor de ΔG da proteína em equilíbrio na ausência do desnaturante, ΔG^{H_2O} , também denominada energia livre de estabilização – Equação (6) (AHMAD e BIGELOW, 1982).

$$\Delta G = \Delta G^{H_2O} - m[U] \quad (6)$$

onde, m é a inclinação da reta e $[U]$ é a concentração de ureia.

Assim, a partir das Equações 4-6, o gráfico de ΔG versus $[U]$ foi construído e é mostrado na Figura 28. O intercepto da curva é o valor de ΔG^{H_2O} , aproximadamente $8384,99 \text{ J mol}^{-1}$.

Figura 28. Variação do ΔG da desnaturação da CDK9 com o aumento da concentração de ureia.

Fonte: Autoria própria.

3.5.2 Supressão da fluorescência induzida pela interação com ATP

A interferência da ligação do ATP no sítio ativo da CDK9 na fluorescência intrínseca da proteína foi verificada por titulação de uma amostra, contendo aproximadamente 1 μM de proteína, com incrementos de 40 μM de ATP. A Figura 29 mostra o perfil médio dos espectros de fluorescência coletados em triplicata, após a adição de cada alíquota de ligante.

Figura 29. Efeitos da interação CDK9-ATP no espectro de emissão de fluorescência intrínseco da proteína. Amostra com concentração de 1 μ M, excitada em 280 nm.

FONTE: Autoria própria.

A supressão na fluorescência observada após a introdução do ATP na solução indica que houve interação deste ligante com a proteína. Com excitação da amostra em 280 nm, tanto os resíduos de tirosina quanto os de triptofano absorvem luz e podem então emitir fluorescência. A excitação das amostras em 295 nm também foi realizada para verificar se a supressão ocorre nos resíduos de triptofanos, porém não foi observada nenhuma alteração na intensidade de fluorescência máxima com a excitação neste comprimento de onda; isto sugere, em conjunto com a supressão em 280 nm, que a supressão decorrente da ligação do ATP ocorre majoritariamente nos resíduos de tirosina.

Existem dois tipos de supressão da fluorescência: a colisional (ou dinâmica), que ocorre quando o fluoróforo no estado excitado é desativado por contato com a molécula supressora, e a estática, que ocorre quando o fluoróforo no estado fundamental forma um complexo não-fluorescente com a molécula supressora. Ambos os tipos resultam em uma relação linear da concentração de supressor, Q , com a razão das intensidades de fluorescência na ausência (F_0) e presença do supressor (F), porém podem ser diferenciados pela variação da temperatura, da viscosidade ou por medidas de tempo de vida (τ) da fluorescência. Temperaturas

maiores aumentam a velocidade de difusão das moléculas, e portanto, aumentam o número de supressões colisionais. Na supressão estática não ocorre variação no tempo de vida, pois as moléculas de fluoróforos que não foram suprimidas continuam emitindo fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

No caso de proteínas, onde populações diferentes de fluoróforos podem estar presentes, é possível a ocorrência combinada das supressões colisional e estática, o que resulta em uma curva exponencial positiva, ao invés de uma reta, ao graficar concentração de supressor versus F_0/F (LAKOWICZ, 2006). A Figura 30 mostra uma representação de cada um destes tipos.

Figura 30. Comparação das curvas de $[Q]$ versus F_0/F e τ_0/τ para os tipos de supressão. $[Q]$ é a concentração de supressor, F é a intensidade de fluorescência, τ é o tempo de vida de fluorescência. O subscrito 0 indica os valores na ausência do supressor.

FONTE: Adaptado de LAKOWICZ (2006).

A partir dos dados obtidos da titulação com o ATP, uma curva de concentração de ATP versus F_0/F foi construída a fim de determinar o tipo de supressão que ocorre na interação proteína-ATP (Figura 31).

Figura 31. Supressão da fluorescência da CDK9 em função do aumento da concentração de ATP.

FONTE: Autoria própria.

Comparando o perfil exponencial da curva obtida na Figura 31 com os da Figura 30, verifica-se a combinação dos dois tipos de supressão (colisional e estática) quando o ATP liga-se a CDK9. Parte dos resíduos fluorescentes é suprimida por contato após a colisão do supressor ATP, e a outra parte por formação de um complexo não-fluorescente.

A afinidade da CDK9 e o ATP pode ser inferida pelos valores da constante de associação, K_b , e pelo número de sítios ocupados pelo ligante, n , na estrutura da proteína. Tais parâmetros podem ser calculados a partir da Equação (7), e a regressão linear de $\log [Q]$ versus $\log [(F_0 - F)/F]$ (PRADO, 2017).

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad (7)$$

Figura 32. Gráfico duplo-log da supressão de fluorescência da CDK9 pelo ATP.

FONTE: Autoria própria.

A partir do ajuste linear dos dados apresentados na Figura 32, encontra-se que, para a supressão da CDK9 com o ATP, $n = 1,17$ e $K_b = 14,26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Este valor de constante de associação indica uma interação de afinidade fraca entre o ATP e a CDK9, dado que é consenso na literatura a seguinte classificação da interação pelos valores de K_b : constantes abaixo da ordem de 10^4 M^{-1} definem interações de afinidade fracas, da ordem de 10^4 a 10^6 M^{-1} são interações moderadas, e de ordem acima de 10^7 M^{-1} , interações fortes (PRADO, 2017).

A constante de dissociação, K_d , é o inverso da constante de associação, K_b ; logo, para a CDK9 e o ATP, K_d é $7,01 \times 10^{-5} \text{ M}$. Esta é uma informação que pode ser útil no desenho de inibidores da CDK9 análogos ao ATP, pois tais inibidores devem possuir uma constante de dissociação menor do que a obtida para o ATP a fim de inibir a atividade enzimática da proteína.

4 CONCLUSÕES

O estudo das quinases dependentes de ciclinas é de grande interesse para o desenvolvimento de potenciais fármacos contra o câncer e outras doenças, devido à função essencial dessas enzimas no ciclo celular e na transcrição do DNA. Este projeto propôs a obtenção, purificação e caracterização da CDK9, uma das 21 CDKs já identificadas no genoma humano, utilizando o sistema bacteriano de *E. coli*. Apesar da CDK9 ser expressa majoritariamente em corpos de inclusão, o método de solubilização e reenovelamento com SDS apresentou ótimos resultados na obtenção da proteína nativa em solução, com rendimento máximo de 27 mg de proteína por litro de meio de cultura.

Experimentos utilizando espectroscopia de dicroísmo circular demonstraram os elementos de estrutura secundária da proteína e sua alta estabilidade frente à variação de temperatura e tempo de estocagem a 4°C. A proteína obtida por reenovelamento dos corpos de inclusão apresentou 31-33% de hélices α , 17-20% fitas β , 14-17% de voltas, e 33-35% de estruturas não periódicas – valores próximos aos reportados por LEOPOLDINO *et al.* (2006) e por BAUMLI *et al.* (2008). Na concentração de 6 μ M, a desnaturação térmica da CDK9 se mostrou um processo composto de dois estados (enovelado e desenovelado), sendo a temperatura de desnaturação obtida em 65,9%. Em relação ao tempo de estocagem a 4°C, a análise dos espectros de CD da proteína em diferentes períodos de armazenagem mostrou que a estrutura secundária da CDK9 manteve-se estável por no mínimo dois meses.

Também foi possível analisar o comportamento da proteína frente à desnaturação com ureia, e a interação da proteína com o ATP, um dos seus substratos naturais, utilizando espectroscopia de fluorescência. Similarmente à desnaturação térmica, a desnaturação química seguiu um mecanismo de dois estados, sem a presença de estados intermediários entre as estruturas enovelada e desenovelada da proteína, com ponto médio em 4,92 M de ureia e ΔG^{H_2O} (variação de energia livre de Gibbs na ausência do desnaturante) de 8384,99 J mol⁻¹.

Na interação da CDK9 com o ATP foi observada a supressão da fluorescência nos resíduos de tirosina da proteína, e não nos resíduos de triptofano, dado que a diminuição da intensidade de fluorescência ocorreu somente após excitação da amostra em 280 nm, e não 295 nm. A supressão acontece tanto por colisão das

moléculas de ATP quanto por formação de complexo não-fluorescente com a proteína. O valor encontrado para a constante de afinidade, $K_b = 14,26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, define esta interação como sendo fraca.

Os resultados obtidos neste projeto possibilitarão um melhor entendimento do comportamento físico-químico da CDK9, e servirão como base para o desenvolvimento de novos estudos visando a obtenção de inibidores da atividade enzimática da CDK9. A metodologia aplicada é de baixo custo e não possui procedimentos complexos, se comparada a outras existentes; fato que simplifica a obtenção desta proteína para os estudos *in vitro*.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar experimentos de expressão a partir de nova construção do DNA recombinante pET28a::CDK9, a fim de obter a superexpressão da CDK9 na fração solúvel em células de *E. coli*.
- Realizar experimentos de cinética enzimática com a CDK9 reenovelada e uma de suas parceiras ciclinas.
- Estudar a interação da CDK9 com potenciais inibidores por *docking molecular*.
- Estudar os efeitos *in vivo* da interação da CDK9 com potenciais inibidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-GARNER, A.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structure and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1630-1636, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-pdf/27/12/1630/17124163/btr234.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.
- AHMAD, F.; BIGELOW, C. C. Estimation of the free energy of stabilization of ribonuclease A, lysozyme, alpha-lactalbumin, and myoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 21, p. 12935-12938, 1982. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/257/21/12935.full.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1427 p.
- AMMOSOVA, T.; OBUKHOV, Y.; KOTELKIN, A.; BREUER, D.; BEULLENS, M.; GORDEUK, V. R.; BOLLEN, M.; NEKHAL, S. Protein phosphatase-1 activates CDK9 by dephosphorylating Ser175. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e18985, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0018985&type=printable>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BAUMLI, S.; HOLE, A. J.; WANG, L. Z.; NOBLE, M. E.; ENDICOTT, J. A. The CDK9 tail determines the reaction pathway of positive transcription elongation factor b. **Structure**, Cambridge, v. 20, n. 10, p. 1788-1795, 2012. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0969-2126%2812%2900292-4>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BAUMLI, S.; LOLLI, G.; LOWE, E. D.; TROIANI, S.; RUSCONI, L.; BULLOCK, A. N.; DEBRECZENI, J. E.; KNAPP, S.; JOHNSON, L. N. The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. **EMBO Journal**, Chichester, v. 27, n. 13, p. 1907-1918, 2008. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.1038/emboj.2008.121>. Acesso em: 10 maio 2019.
- BLAZEK, D.; BARBORIC, M.; KOHOUTEK, J.; OVEN, I.; PETERLIN, B. M. Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 22, p. 7000-7010, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/33/22/7000/4156413/gki997.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering, Design and Selection**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.191>. Acesso em: 21 maio 2019.

BRADNER, J. E.; HNISZ, D.; YOUNG, R. A. Transcriptional addiction in cancer. **Cell**, Cambridge, v. 168, n. 4, p. 629-643, 2017. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2816%2931727-5>. Acesso em: 16 maio 2019.

BREUER, D.; KOTELKIN, A.; AMMOSOVA, T.; KUMARI, N.; IVANOV, A.; ILATOVSKIY, A. V.; BEULLENS, M.; ROANE, P. R.; BOLLEN, M.; PETUKHOV, M. G.; KASHANCHI, F.; NEKHAI, S. CDK2 regulates HIV-1 transcription by phosphorylation of CDK9 on serine 90. **Retrovirology**, London, v. 9, p. 94, 2012. Disponível em: <https://retrovirology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1742-4690-9-94>. Acesso em: 10 maio 2019.

BROGIE, J. E.; PRICE, D. H. Reconstitution of a functional 7SK snRNP. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 6864-6880, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/45/11/6864/17756355/gkx262.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

BUCHAN, D. W. A.; JONES, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 47, n. W1, p. W402-W407. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W402/5480136>. Acesso em: 20 maio 2019.

CANAVESE, M.; SANTO, L.; RAJE, N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. **Cancer Biology & Therapy**, Philadelphia, v. 13, n. 7, p. 451-457, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cbt.19589?needAccess=true>. Acesso em: 16 maio 2019.

CARUSO, C. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de xylella fastidiosa**. 2007. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-29082007-111527/publico/CeliaCaruso.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.

CHEN, R.; YANG, Z.; ZHOU, Q. Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 6, p. 4153-4160, 2004. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/279/6/4153.full.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC338945/pdf/nar00164-0472.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.

CRAMER, P. Organization and regulation of gene transcription. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.

CZUDNOCHOWSKI, N.; BOSKEN, C. A.; GEYER, M. Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. **Nature Communications**, London, v. 3, p. 842, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms1846.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

DIRIBARNE, G.; BENSAUDE, O. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. **RNA Biology**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 122-128, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/rna.6.2.8115>. Acesso em: 12 maio 2019.

ECHALIER, A.; ENDICOTT, J. A.; NOBLE, M. E. Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1804, n. 3, p. 511-519, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.002>. Acesso em: 8 maio 2019.

EDWARDS, M. C.; WONG, C.; ELLEDGE, S. J. Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 18, n. 7, p. 4291-4300, 1998. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/18/7/4291.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

EGLOFF, S.; MURPHY, S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 280-288, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.008>. Acesso em: 12 maio 2019.

FRANCO, L. C.; MORALES, F.; BOFFO, S.; GIORDANO, A. CDK9: A key player in cancer and other diseases. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 119, n. 2, p. 1273-1284, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.26293>. Acesso em: 16 maio 2019.

FU, J.; YOON, H. G.; QIN, J.; WONG, J. Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 27, n. 13, p. 4641-4651, 2007. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/27/13/4641.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

FU, T. J.; PENG, J.; LEE, G.; PRICE, D. H.; FLORES, O. Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 49, p. 34527-34530, 1999. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/274/49/34527.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

FUJINAGA, K.; IRWIN, D.; HUANG, Y.; TAUBE, R.; KUROSU, T.; PETERLIN, B. M. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 2, p. 787-795, 2004. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/24/2/787.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

GARBER, M. E.; MAYALL, T. P.; SUESS, E. M.; MEISENHOLDER, J.; THOMPSON, N. E.; JONES, K. A. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, n. 18, p. 6958-6969, 2000. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/20/18/6958.full.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

GARRIGA, J.; BHATTACHARYA, S.; CALBO, J.; MARSHALL, R. M.; TRUONGCAO, M.; HAINES, D. S.; GRANA, X. CDK9 is constitutively expressed throughout the cell cycle, and its steady-state expression is independent of SKP2. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 23, n. 15, p. 5165-5173, 2003. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/23/15/5165.full.pdf>. Acesso em: 16 maio 2019.

GRANA, X.; DE LUCA, A.; SANG, N.; FU, Y.; CLAUDIO, P. P.; ROSENBLATT, J.; MORGAN, D. O.; GIORDANO, A. PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 9, p. 3834-3838, 1994. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/pnas/91/9/3834.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

GREENFIELD, N. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2728378/pdf/nihms126151.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768349>. Acesso em: 10 maio 2019.

HE, C.; OHNISHI, K. Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 490, n. 4, p. 1250-1253, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.003>. Acesso em: 21 maio 2019.

HE, N.; JAHCHAN, N. S.; HONG, E.; LI, Q.; BAYFIELD, M. A.; MARAIA, R. J.; LUO, K.; ZHOU, Q. A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 29, n. 5, p. 588-599, 2008. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2808%2900036-1>. Acesso em: 12 maio 2019.

HOLE, A. J.; BAUMLI, S.; SHAO, H.; SHI, S.; HUANG, S.; PEPPER, C.; FISCHER, P. M.; WANG, S.; ENDICOTT, J. A.; NOBLE, M. E. Comparative structural and functional studies of 4-(thiazol-5-yl)-2-(phenylamino)pyrimidine-5-carbonitrile CDK9 inhibitors suggest the basis for isotype selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 56, n. 3, p. 660-670, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm301495v?rand=qcupk8nj>. Acesso em: 16 maio 2019.

JAMESON, D. M. **Introduction to fluorescence**. Boca Raton: CRC Press, 2014. 308 p.

JERONIMO, C.; FORGET, D.; BOUCHARD, A.; LI, Q.; CHUA, G.; POITRAS, C.; THERIEN, C.; BERGERON, D.; BOURASSA, S.; GREENBLATT, J.; CHABOT, B.; POIRIER, G. G.; HUGHES, T. R.; BLANCHETTE, M.; PRICE, D. H.; COULOMBE, B. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 27, n. 2, p. 262-274, 2007. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2807%2900417-0>. Acesso em: 12 maio 2019.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 292, n. 2, p. 195-202, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>. Acesso em: 20 maio 2019.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>. Acesso em: 22 maio 2019.

KIM, J. B.; SHARP, P. A. Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 15, p. 12317-12323, 2001. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/276/15/12317.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

KRUEGER, B. J.; JERONIMO, C.; ROY, B. B.; BOUCHARD, A.; BARRANDON, C.; BYERS, S. A.; SEARCEY, C. E.; COOPER, J. J.; BENSAUDE, O.; COHEN, E. A.; COULOMBE, B.; PRICE, D. H. LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 2219-2229, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/36/7/2219/7176355/gkn061.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

KURTIN, W. E.; LEE, J. M. The free energy of denaturation of lysozyme: an undergraduate experiment in biophysical chemistry. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Hoboken, v. 30, n. 4, p. 244-247, 2002. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bmb.2002.494030040083>. Acesso em: 22 maio 2019.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.

LAKOWICZ, J. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006. 954 p.

LEOPOLDINO, A. M.; CANDURI, F.; CABRAL, H.; JUNQUEIRA, M.; DE MARQUI, A. B.; APPONI, L. H.; DA FONSECA, I. O.; DOMONT, G. B.; SANTOS, D. S.; VALENTINI, S.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; FOSSEY, M. A.; DE AZEVEDO, W. F., JR.; TAJARA, E. H. Expression, purification, and circular dichroism analysis of human CDK9. **Protein Expression & Purification**, Maryland Heights, v. 47, n. 2, p. 614-620, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.012>. Acesso em: 22 maio 2019.

LI, Q.; PRICE, J. P.; BYERS, S. A.; CHENG, D.; PENG, J.; PRICE, D. H. Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 31, p. 28819-28826, 2005. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/280/31/28819.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

LIU, H.; RICE, A. P. Genomic organization and characterization of promoter function of the human CDK9 gene. **Gene**, Amsterdam, v. 252, n. 1-2, p. 51-59, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00215-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00215-8). Acesso em: 10 maio 2019.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A.; MARTIN, K. C. **Molecular cell biology**. 8. ed. New York: W. H. Freeman, 2016. 1278 p.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 6, p. 122-132, 2014. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/gb4184>. Acesso em: 8 maio 2019.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 630-641, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>. Acesso em: 8 maio 2019.

MARSHALL, N. F.; PENG, J.; ZHI, X.; PRICE, D. H. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 43, p. 27176-27183, 1996. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/271/43/27176.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

MARSHALL, N. F.; PRICE, D. H. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 12, n. 5, p. 2078-2090, 1992. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/12/5/2078.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

MARSHALL, N. F.; PRICE, D. H. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 21, p. 12335-12338, 1995. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/270/21/12335.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

MBONYE, U. R.; GOKULRANGAN, G.; DATT, M.; DOBROWOLSKI, C.; COOPER, M.; CHANCE, M. R.; KARN, J. Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4(+) T lymphocytes. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e1003338, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003338&type=printable>. Acesso em: 12 maio 2019.

NGUYEN, V. T.; KISS, T.; MICHELS, A. A.; BENSAUDE, O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. **Nature**, London, v. 414, n. 6861, p. 322-325, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35104581>. Acesso em: 12 maio 2019.

O'KEEFFE, B.; FONG, Y.; CHEN, D.; ZHOU, S.; ZHOU, Q. Requirement for a kinase-specific chaperone pathway in the production of a Cdk9/cyclin T1 heterodimer responsible for P-TEFb-mediated tat stimulation of HIV-1 transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 1, p. 279-287, 2000. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/275/1/279.full.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in cell death and human cancers. **Cancers**, Basel, v. 3, n. 1, p. 994-1013, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3756401/pdf/cancers-03-00994.pdf>. Acesso em: 16 maio 2019.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, Hoboken, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pro.5560041120>. Acesso em: 22 maio 2019.

PAPARIDIS, N. F.; DURVALE, M. C.; CANDURI, F. The emerging picture of CDK9/P-TEFb: more than 20 years of advances since PITALRE. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 246-276, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6mb00387g>. Acesso em: 10 maio 2019.

PENG, J.; MARSHALL, N. F.; PRICE, D. H. Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 22, p. 13855-13860, 1998. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/273/22/13855.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.

PETERLIN, B. M.; PRICE, D. H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 297-305, 2006. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2806%2900429-1>. Acesso em: 12 maio 2019.

PRADO, A. K. M. **Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a proteína Transaldolase isolada de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2017. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/150451/prado_akm_me_sjrp.pdf. Acesso em: 22 maio 2019.

RENNER, D. B.; YAMAGUCHI, Y.; WADA, T.; HANDA, H.; PRICE, D. H. A highly purified RNA polymerase II elongation control system. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 45, p. 42601-42609, 2001. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/276/45/42601.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

ROMANO, G.; GIORDANO, A. Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 7, n. 23, p. 3664-3668, 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cc.7.23.7122?needAccess=true>. Acesso em: 10 maio 2019.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 172, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>. Acesso em: 21 maio 2019.

ROYER, C. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n. 5, p. 1769-1784, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr0404390>. Acesso em: 22 maio 2019.

SABO, A.; LUSIC, M.; CERESETO, A.; GIACCA, M. Acetylation of conserved lysines in the catalytic core of cyclin-dependent kinase 9 inhibits kinase activity and regulates transcription. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 28, n. 7, p. 2201-2212, 2008. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/28/7/2201.full.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Woodbury: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. 2100 p.

SANTOS, N. P. F. D. **Obtenção das quinases dependentes de ciclinas CDK9 e CDK11 humanas utilizando um sistema bacteriano de expressão (*E. coli*)**. 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-16062015-091524/publico/NikolasPaparidisFerreiradosSantosrevisada.pdf>. Acesso em: 16 maio 2019.

SHORE, S. M.; BYERS, S. A.; DENT, P.; PRICE, D. H. Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms. **Gene**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 51-58, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.01.015>. Acesso em: 10 maio 2019.

SHORE, S. M.; BYERS, S. A.; MAURY, W.; PRICE, D. H. Identification of a novel isoform of Cdk9. **Gene**, Amsterdam, v. 307, p. 175-182, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00466-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00466-9). Acesso em: 10 maio 2019.

SMITH, G. K.; KE, Z.; GUO, H.; HENGGE, A. C. Insights into the phosphoryl transfer mechanism of cyclin-dependent protein kinases from ab initio QM/MM free-energy studies. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 115, n. 46, p. 13713-13722, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp207532s>. Acesso em: 10 maio 2019.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4880>. Acesso em: 21 maio 2019.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, London, v. 3, n. 1, p. 11, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517725/pdf/1475-2859-3-11.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level**. 5. ed. Hoboken: Wiley, 2016. 1206 p.

WADA, T.; TAKAGI, T.; YAMAGUCHI, Y.; WATANABE, D.; HANDA, H. Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. **The EMBO Journal**, Chichester, v. 17, n. 24, p. 7395-7403, 1998. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.1093/emboj/17.24.7395>. Acesso em: 12 maio 2019.

WANG, Y.; DOW, E. C.; LIANG, Y. Y.; RAMAKRISHNAN, R.; LIU, H.; SUNG, T. L.; LIN, X.; RICE, A. P. Phosphatase PPM1A regulates phosphorylation of Thr-186 in the Cdk9 T-loop. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, n. 48, p. 33578-33584, 2008. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/283/48/33578.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

WEI, P.; GARBER, M. E.; FANG, S. M.; FISCHER, W. H.; JONES, K. A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 451-462, 1998. Disponível em: [https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674\(98\)00280-0](https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674(98)00280-0). Acesso em: 8 maio 2019.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, Hoboken, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bip.20853>. Acesso em: 21 maio 2019.

WHITTAKER, S. R.; MALLINGER, A.; WORKMAN, P.; CLARKE, P. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, Philadelphia, v. 173, p. 83-105, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>. Acesso em: 8 maio 2019.

YANG, Z.; HE, N.; ZHOU, Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 967-976, 2008. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/28/3/967.full.pdf>. Acesso em: 16 maio 2019.

YANG, Z.; ZHU, Q.; LUO, K.; ZHOU, Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. **Nature**, London, v. 414, n. 6861, p. 317-322, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35104575>. Acesso em: 12 maio 2019.

ZABOROWSKA, J.; ISA, N. F.; MURPHY, S. P-TEFb goes viral. **Inside Cell**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 106-116, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bies.201670912>. Acesso em: 16 maio 2019.

ZHOU, M.; HALANSKI, M. A.; RADONOVICH, M. F.; KASHANCHI, F.; PENG, J.; PRICE, D. H.; BRADY, J. N. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, n. 14, p. 5077-5086, 2000. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/mcb/20/14/5077.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

ZHOU, M.; HUANG, K.; JUNG, K. J.; CHO, W. K.; KLASE, Z.; KASHANCHI, F.; PISE-MASISON, C. A.; BRADY, J. N. Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 2, p. 1036-1044, 2009. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/jvi/83/2/1036.full.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

ZHOU, M.; NEKHAI, S.; BHARUCHA, D. C.; KUMAR, A.; GE, H.; PRICE, D. H.; EGLY, J. M.; BRADY, J. N. TFIIH inhibits CDK9 phosphorylation during human immunodeficiency virus type 1 transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 48, p. 44633-44640, 2001. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/276/48/44633.full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

ZHU, Y.; PE'ERY, T.; PENG, J.; RAMANATHAN, Y.; MARSHALL, N.; MARSHALL, T.; AMENDT, B.; MATHEWS, M. B.; PRICE, D. H. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. **Genes & Development**, Woodbury, v. 11, n. 20, p. 2622-2632, 1997. Disponível em: <http://genesdev.cshlp.org/content/11/20/2622.full.pdf>. Acesso em: 8 maio 2019.