

Fernanda Coelho

**Clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína ciclina D3
obtida pela expressão em sistema bacteriano (*Escherichia coli*)**

São Carlos

2022

USP- Universidade de São Paulo
IQSC- Instituto de Química de São Carlos

Fernanda Coelho

**Clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína ciclina D3
obtida pela expressão em sistema bacteriano (*Escherichia coli*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica.

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

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2022

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

Coelho, Fernanda

Clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína ciclina D3 obtida pela expressão em sistema bacteriano (*Escherichia coli*) / Fernanda Coelho. — São Carlos, 2022.

119 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri



AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida e por tudo que me proporcionou.

Aos meus pais por toda dedicação e esforço para que eu tivesse acesso ao conhecimento. Ao meu esposo, pelo amor, compreensão, apoio, amizade e incentivo.

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade concedida.

A Professora Dra. Fernanda Canduri pela orientação, compreensão, incentivo, amizade e conselhos profissionais.

Aos amigos do Laboratório e do IQSC por todo apoio, ensinamento, incentivo e principalmente pela amizade, que foi essencial para tornar o ambiente de trabalho agradável, em especial às amigas Rebeka, Diandra, Jessyka, Tatiane e Fabiana.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos pelo sequenciamento das amostras.

A todos do Laboratório do Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED) em especial aos Professores Dr. Carlos Alberto Montanari e Dr. Andrei Leitão e a técnica Fabiana Rosini.

Ao Professor Dr. Alessandro Silva Nascimento, do Grupo de Biotecnologia Molecular do IFSC/USP, pelo auxílio na modelagem molecular.

A Professora Dra. Fernanda Andreia Rosa, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelos inibidores.

Ao pessoal do CAQI pelas análises realizadas, em especial aos técnicos, Aldimar Tadeu e André Luiz Tognon.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação e da biblioteca do IQSC.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo financiamento dos projetos do laboratório.

E a todos que contribuíram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

Proteínas quinases são importantes alvos de estudo devido atuarem como reguladores diretos do ciclo celular. A progressão do ciclo de divisão celular é conduzida por ciclinas, que ligam e ativam seus parceiros catalíticos, as quinases dependentes de ciclina (CDKs). As CDKs compreendem uma família de proteínas que podem ser subdivididas em dois grupos funcionais majoritários baseados na sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional. Os complexos heterodiméricos específicos de CDK-ciclina fosforilam diversas proteínas celulares, as quais promovem a entrada no ciclo celular, a regulação da síntese de DNA e a segregação dos cromossomos recém-duplicados durante a mitose. A ciclina D3 tem como função atuar na fase G1 como subunidade reguladora de CDK4 e CDK6, e também como parceiro da CDK11p⁵⁸ na fase G2/M durante a progressão do ciclo celular. A superexpressão da ciclina D3 se correlaciona com o aumento da proliferação celular e crescimento tumoral, além de ser capaz de inibir a atividade de transativação do receptor de andrógenos. O objetivo do presente estudo é a superexpressão da ciclina D3 utilizando o sistema de expressão bacteriano (*Escherichia coli*) a fim de obter a proteína purificada e com pureza adequada para a realização de ensaios de caracterização estrutural e de atividade quinase do complexo CDK11Δ-ciclinaD3. A utilização de diferentes tipos de vetores permitiu obter a proteína de interesse por meio de processo de reenovelamento e de forma nativa. Os resultados obtidos para a expressão em ambos os vetores, produziram proteínas com mais de 95% de pureza. Os ensaios de caracterização por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) da proteína ciclina D3 na forma nativa (solúvel) apresentou um padrão muito parecido de estruturas secundárias por CD quando comparado ao resultado da proteína reenovelada, com cerca de 39% de hélices α e 15% de fitas β . Por espectroscopia de emissão de fluorescência, foi demonstrado que a proteína é estável frente ao agente caotrópico ureia, porém instável na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina. O ensaio de atividade quinase do complexo CDK11Δ- ciclinaD3 permitiu assegurar a conformação correta das proteínas recombinantes obtidas em ambos os vetores. Esses dados validam o protocolo de reenovelamento, servindo de base para estudos futuros envolvendo a produção de proteínas recombinantes e para estudos envolvendo possíveis inibidores para este complexo.

Palavras- chave: Proteínas recombinantes, expressão heteróloga, protocolo de reenovelamento, atividade quinase

ABSTRACT

Protein kinases are important targets for study due they act as direct regulators of the cell cycle. The progression of the cell division cycle is driven by cyclins, which bind and activate their catalytic partners, cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs comprise a family of proteins that can be subdivided into two major functional groups based on their function in the cell cycle and / or transcriptional control. The CDK- cyclin specific heterodimeric complexes phosphorylate several cellular proteins, which promote entry into the cell cycle, regulation of DNA synthesis and segregation of newly duplicated chromosomes during mitosis. Cyclin D3 has the function of acting in phase G1 as a regulatory subunit of CDK4 and CDK6, and also as a partner of CDK11p⁵⁸ in phase G2 / M during the progression of the cell cycle. Overexpression of cyclin D3 correlates with increased cell proliferation and tumor growth, in addition to being able to inhibit the androgen receptor transactivation activity. The aim of the present study is to overexpress cyclin D3 using the bacterial expression system (*Escherichia coli*) in order to obtain the purified protein with adequate purity for structural characterization and kinase activity of the CDK11Δ- cyclinD3 complex. The use of different vectors types allowed obtaining the interest protein of through a refolding process and in a native way. The results obtained for the expression in both vectors, produced proteins with more than 95% of purity. The result of the circular dichroism (CD) spectroscopy characterization assays of the cyclin D3 protein in the native (soluble) form showed a very similar pattern of secondary structures per CD when compared to the result of the refolded protein, with about 39% of α helices and 15% β -strands. By fluorescence emission spectroscopy, it was shown that the protein is stable against the chaotropic agent urea, but unstable in the presence of increasing concentrations of guanidine chloride. The kinase activity assay of the CDK11Δ- cyclinD3 complex allowed to ensure the correct conformation of the recombinant proteins obtained in both vectors. These data validate the refolding protocol, serving as a basis for future studies involving the production of recombinant proteins and for studies involving possible inhibitors for this complex.

Keywords: Recombinant proteins, heterologous expression, refolding protocol, kinase activity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O ciclo de divisão celular em organismos eucarióticos.....27
- Figura 2.** Complexo heterodimérico CDK-ciclina. (A) Proteína CDK representada com o sítio ativo bloqueado pela alça T. (B) Complexo CDK-ciclina parcialmente ativo, com deslocamento da alça T do sítio ativo. (C) Complexo CDK-ciclina totalmente ativo, após fosforilação da alça T.....28
- Figura 3.** Inibidores de CDK4/6. (A) palbociclibe, (B) ribociclibe e (C) abemaciclib.....30
- Figura 4.** Representação esquemática da regulação do ciclo celular. A Myc influencia aumento da atividade da G1-Cdk (ciclina D-Cdk4), que aciona a fosforilação de membros da família de proteínas Rb. Isso inativa as proteínas Rb, liberando a proteína reguladora gênica E2F para ativar a transcrição de genes de G1/S, incluindo os genes de uma G1/S-ciclina (ciclina E) e de uma S-ciclina (ciclina A). As atividades resultantes da G1/S-Cdk e da S-Cdk estimulam ainda mais a fosforilação da proteína Rb, formando um ciclo de retroalimentação positiva. As proteínas E2F também estimulam a transcrição de seus próprios genes, formando outro ciclo de retroalimentação positiva.....31
- Figura 5.** Ilustração esquemática do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S (síntese de DNA), G2 e M (mitose). A progressão do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e suas CDKs cognatas. A fosforilação sequencial por complexos de quinase CDK 4/6: ciclina D: causa mudanças conformacionais na estrutura de Rb e liberação de E2F. A liberação de E2F é necessária para a expressão dos genes das fases S.....34
- Figura 6.** Ilustração das três isoformas de ciclina do tipo D. Representação dos locais conservados para Thr286 na ciclina D1, Thr280 na ciclina D2 e Thr283 na ciclina D3.....35
- Figura 7.** Análise da cadeia polipeptídica da ciclina D3 utilizando o PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Círculos em vermelho delimitam a sequência obtida (da Leu21 a Ser263).39
- Figura 8.** Análise de códons raros pelo programa SVKDIPMPPS-RARECODON.....40
- Figura 9.** Sequência do cDNA da ciclina D3 com os sítios da *NdeI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A sequência referente a cauda de histidina é indicada no início da sequência em verde, o códon de início é mostrado em amarelo e o códon de

terminação em azul ciano. Em vermelho é mostrado o sítio de restrição da *NdeI* e em azul, o sítio de restrição da *BamHI*.40

Figura 10. Sequência do cDNA da ciclina D3 em PETSUMO. O códon de início é destacado em amarelo e o códon de terminação destacado em verde. A sequência referente a cauda de histidina é indicada no início da sequência em laranja, a sequência referente a proteína SUMO (roxo claro) e estão destacados os sítios da *EcoRI* (roxo) e *XhoI* (azul).41

Figura 11. Exemplos de espectros associados à diferentes tipos de estruturas.....51

Figura 12. Gel de agarose dos produtos do PCR de colônia realizado a partir de células DH5 α obtidas na propagação do transformante. Na canaleta 6, é possível observar o produto de PCR com 738 pb, referente ao tamanho do DNA codante da ciclina D3.....60

Figura 13. Gel de agarose dos produtos do PCR de colônia realizado a partir de células One Shot obtidas na propagação do transformante. Na canaleta 8, 9 e 10 é possível observar o produto de PCR com 738 pb, referente ao tamanho do DNA codante da ciclina D3.....60

Figura 14. Análise do sequenciamento pelo programa Multalin Analysis. Em vermelho, de ATG a TGA, os códons de iniciação e terminação do DNA codante da ciclina D3. Na linha “direto” refere-se ao amplificado utilizando o primer T7 promoter, e na linha “reverso” refere-se ao amplificado a partir do primer T7 terminator. Em azul está parte do vetor pET28a, flanqueado pelos primers.....61

Figura 15. Análise do sequenciamento pelo programa Multalin Analysis. Em vermelho, de ATG a TGA, os códons de iniciação e terminação do DNA codante da ciclina D3. Na linha “direto” refere-se ao amplificado utilizando o primer T7 promoter, e na linha “reverso” refere-se ao amplificado a partir do primer T7 terminator. Em azul está parte do vetor pETSUMO, flanqueado pelos primers.....62

Figura 16. Perfil de co-expressão de ciclina D3 com chaperonas moleculares. (A) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 37°C por 5 horas (B) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 20°C por 24 horas (C) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 16°C por 26 horas. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. -I: extrato celular total antes da indução, +I: extrato celular total após a indução, S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.....63

Figura 17. SDS-PAGE 15 % referente as etapas de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pG-KJE8 utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM

de IPTG a 16°C por 26h. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.). 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3: fração não ligada na coluna de afinidade, 4: fração de lavagem com 300 mM de imidazol, 5: amostra pós reação com trombina, 6: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina, 7: fração de lavagem com 300 mM de imidazol, 8: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina concentrada, 9, 10, 11, 12, 13 e 14: frações de eluição na coluna de exclusão de tamanho. As bandas da proteína de interesse são destacadas com o retângulo.....65

Figura 18. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pG-KJE8 utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 16°C por 26h com a utilização de MgATP na coluna de afinidade. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 2: fração não ligada na coluna de afinidade; 3,4,5,6,7 e 8: frações de lavagem com 5mM de Mg²⁺-ATP, 9: fração de lavagem com 300mM de Imidazol, 10: amostra pós reação com trombina , 11, 12, 13 e 14: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina, 15: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.....66

Figura 19. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da fração insolúvel na coluna de afinidade da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 37°C por 5h. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2, 3, 4 e 5: fração de lavagens do precipitado com Tris-HCl 20mM, 6: sobrenadante pós reação com SDS (reenovelado), 7: fração não ligada na coluna de afinidade, 8: fração de lavagem com 300mM de Imidazol, demonstrando a purificação da proteína de interesse, destacada pelo retângulo em vermelho.....66

Figura 20. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da fração insolúvel na coluna de afinidade da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 37°C por 5h. Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1: proteína na concentração de 1,7 mg/ml, 2: proteína na concentração de 0,85 mg/ml, 3: proteína na concentração de 0,425 mg/ml, 4: proteína na concentração de 0,212 mg/ml.....67

Figura 21. Perfil de expressão de ciclina D3 em células BL21(DE3) em 37°C por 5 horas; em 20°C por 24 horas; e em 12°C por 72 horas, após a indução. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.....69

Figura 22. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspensos precipitados, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol e concentrada, 7: fração pós troca de tampão, 8: fração pós reação com sumo protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com o retângulo.....70

Figura 23. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20°C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1, 2, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6, 7 e 8: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.....70

Figura 24. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspensos precipitados, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada à coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol – (amostra concentrada) , 7: fração do filtrado da concentração da amostra 6; 8: fração pós reação com SUMO protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.....71

Figura 25. Cromatograma referente à segunda etapa de purificação da Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO aplicando cromatografia de exclusão molecular do

experimento. Tampão empregado: 50mM de NaH₂PO₄, 100mM de NaCl e 10% de glicerol, pH 7,4. Fluxo do tampão 0,5 mL min⁻¹. Coluna: HiLoad16/600 Superdex 75 pg.

.....72

Figura 26. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24 h, purificada previamente por cromatografia de afinidade e clivada pela proteína SUMO protease. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1, 2, 3, 4 e 5: Frações 8, 20, 21, 32 e 33 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente.....73

Figura 27. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspensão precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol (amostra concentrada), 7: fração do filtrado da concentração do amostra 6; 8: fração pós reação com sumo protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.....74

Figura 28. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: fração não ligada na coluna de afinidade, 2: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 3: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.....74

Figura 29. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β-mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. A concentração final da proteína ciclina D3 é de 4 μM.....76

Figura 30. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β-mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. As concentrações verificadas da proteína ciclina D3 foram de 4 μM, 6 μM e 8μM.....77

Figura 31. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20°C e na concentração de 8 μ M. Os períodos avaliados foram de 7, 14 e 21 dias após armazenamento.....	78
Figura 32. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3. A concentração da proteína estava em 4 μ M em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A Tm temperatura de transição, foi de 60,76°C, obtida através da regressão sigmoidal.....	79
Figura 33. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3. A concentração da proteína estava em 4 μ M em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados entre 195 a 208 nm.....	79
Figura 34. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. A concentração final da proteína ciclina D3 é de 4 μ M.....	80
Figura 35. Espectro de CD para a ciclina D3 reenovelamento (azul) e para a ciclina D3 obtida da fração solúvel (laranja). As proteínas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. A concentração final de ambas as proteínas ciclina D3 foram de 4 μ M....	81
Figura 36. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20°C e na concentração de 8 μ M. Os períodos avaliados foram de 7, 14 e 21 dias após armazenamento.....	82
Figura 37. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3 obtida de forma solúvel. A concentração da proteína estava em 4 μ M em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A TM temperatura de transição, foi de 62,86°C, obtida através da regressão sigmoidal.....	83
Figura 38. Perfil da desnaturação da ciclina D3 induzida pela ureia. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ureia variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 310 a 420 nm, com excitação em 295 nm a 25°C.....	84

Figura 39. Perfil da desnaturação da ciclina D3 induzida pela guanidina. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de guanidina variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.....	85
Figura 40. Perfil da desnaturação da ciclina D3 (solúvel) induzida pela guanidina. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de guanidina variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.....	86
Figura 41. Modelagem molecular comparativa da ciclina D3 (bege) a partir da estrutura 3G33 (azul). Região modelada destacada em vermelho.....	87
Figura 42. Docagem molecular do complexo CDK11Δ- ciclina D3.....	89
Figura 43. Perfil de co-expressão do pET28a::CDK11 com o pET28a::cicD3 em células BL21(DE3). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. - S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos.....	90
Figura 44. Teste de Cross-link com adição de 1% de formaldeído nas amostras contendo 10 μM de cada proteína. As amostras foram submetidas ao gel nativo e coradas com azul de Coomassie. Após a adição do formaldeído, foram avaliados períodos diferentes de incubação (5 min, 15 min, 30 min, 1 hora e 3 horas)	91
Figura 45. Ensaios de incubação das proteínas CDK11-ciclina D3. As amostras foram submetidas ao gel nativo e coradas com azul de Coomassie. As letras de A-L são descritas na tabela 9. B1- Ciclina D3 em tampão 1. B2- CDK11 em tampão 1. B3- Ciclina D3 em tampão 2. B4- CDK11 em tampão 2. B5- Ciclina D3 em tampão 3. B6- CDK11 em tampão 3. B7- Ciclina D3 em tampão 4. B8- CDK11 em tampão 4.....	93
Figura 46. Dados representativos gerados para o complexo CDK11Δ- ciclina D3 (proteínas obtidas por reenovelamento) com o substrato peptídico do kit Z'-LYTETM (Ser/Thr 12). O ensaio foi realizado em uma placa de ensaio de 384 poços seguindo o procedimento de otimização do ensaio em 1X Kinase Buffer suplementado com 100 μM ATP. O gráfico (A) representa os valores da razão de emissão em função da concentração de quinase-ciclina D3 e o gráfico (B) representa a porcentagem de fosforilação calculada em função da concentração de quinase-ciclina D3.....	95
Figura 47. Dados representativos gerados para o complexo CDK11Δ- ciclina D3 (CDK11 obtidas por reenovelamento) com o substrato peptídico Z'-LYTETM (Ser/Thr 12). O ensaio foi realizado em uma placa de ensaio de 384 poços seguindo o procedimento de otimização do ensaio em 1X Kinase Buffer suplementado com 100 μM ATP. O gráfico (A) representa os	

valores da razão de emissão em função da concentração de quinase-ciclina D3 e o gráfico (B) representa a porcentagem de fosforilação calculada em função da concentração de quinase-ciclina D3.....	96
Figura 48. 4-aminometil-N-arilpirazóis em forma livre. Composto 3a: R ¹ : F, R ² : H. Composto 3f: R ¹ : OMe, R ² : H.....	101
Figura 49. SDS-PAGE 15% da expressão e purificação de CDK8 usando afinidade de metal Ni-NTA. M: marcador de proteína (Protein Unstained Marker (Thermo Scientific)); 1: lisado após centrifugação de células sonicadas (fração solúvel); 2: lavagem por precipitado (corpos de inclusão) com Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); 3: precipitado antes da adição de solução de SDS a 1%; 4: precipitado após solubilização com solução de SDS a 1% e choque térmico a 4°C (amostra aplicada à coluna); 5: fração não ligada à coluna de afinidade; 6: fração eluída com imidazol 300 mM.....	103
Figura 50. Elipticidade média de resíduos [Θ] de CDK8. O espectro de CD representa uma proteína característica de hélices α e folhas β.....	103
Figura 51. Transição da desnaturação térmica da CDK8. A concentração da proteína estava em 4 μM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β-mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A temperatura de transição - T _m , foi de 43,9°C, obtida a partir da regressão sigmoidal.....	104
Figura 52. Transição da desnaturação térmica da CDK8. A concentração da proteína estava em 4 μM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β-mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados entre 195 a 208 nm.....	105
Figura 53. Perfil da desnaturação da CDK8 induzida pela ureia. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ureia variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 310 a 420 nm, com excitação em 295 nm a 25°C.....	105
Figura 54. Perfil de interação da CDK8 na presença de ATP. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ATP variando de 0 a 800μM. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.....	106
Figura 55. Perfil de interação da CDK8 na presença de ATP. (A) Fo / F versus [Q] para CDK8 em função da concentração de ATP. (B) Ajuste linear do log (Fo-F / F) versus log [ATP] para CDK8.....	107
Figura 56. Perfil de interação da CDK8 na presença dos possíveis inibidores. As amostras foram expostas a diferentes concentrações dos compostos 3a e 3f, variando de 0 a 200μM. As	

medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm, a 25°C. (A) Composto 3a (B) Composto 3f.....	108
Figura 57. Perfil de interação da CDK8 na presença dos compostos 3a e 3f. F_o / F versus $[Q]$ para CDK8 em função da concentração dos compostos, e Ajuste linear do $\log (F_o - F / F)$ versus $\log [Compostos]$ para CDK8.....	108
Figura 58. Linhagens celulares mantidas em cultivo. (A) Balb/C3T3; (B) MDA-MB-231, (C) MCF-7.....	109
Figura 59. Experimentos de viabilidade celular. Viabilidade de células Balb/C3T3, MDA-MB-231 e MCF-7 na presença de cada composto (10 μ M, 50 μ M e 100 μ M) após 72 h de incubação, avaliada por métodos colorimétricos MTT. CP – controle positivo e CN – controle negativo.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibidores de CDK em fase de testes clínicos.....	32
Tabela 2. Condições do PCR utilizadas para amplificação da ciclina D3.....	42
Tabela 3. Descrição das condições do termociclador para amplificação da ciclina D3.....	42
Tabela 4. Condições do PCR utilizadas para amplificação da ciclina D3- vetor pETSUMO.....	43
Tabela 5. Protocolo da reação de digestão do inserto e do vetor (volume da reação 50 µL)..	44
Tabela 6. Protocolo da reação de ligação do inserto-vetor (volume da reação 70 µL).....	44
Tabela 7. Protocolo da reação de digestão do inserto (volume da reação 25 µL).....	44
Tabela 8. Protocolo da reação de digestão do vetor (volume da reação 25 µL).....	44
Tabela 9. Protocolo da reação de ligação do inserto-vetor (volume da reação 70 µL).....	45
Tabela 10. Protocolo da reação de PCR de colônia (volume da reação 10 µL).....	46
Tabela 11. Comparação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3.....	77
Tabela 12. Comparação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3, a partir dos dois protocolos utilizados, reenovelamento e proteína solúvel.....	81
Tabela 13. Comparação entre os resíduos ativos envolvidos diretamente na interação entre os complexos. (A) Comparação entre CDK2 e CDK11 (B) Comparação entre ciclina A e ciclina D3.....	88
Tabela 14. Condições de formação de complexos CDKs- ciclinas, os quais possuem estruturas cristalográficas depositadas no PDB.....	91
Tabela 15. Condições testadas nos ensaios para promover a formação do complexo CDK11Δ-ciclina D3.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPC/C	<i>anaphase-promoting complex/ cyclosome</i>
ATP	adenosine 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 dependente kinase</i>
CDC20	<i>cell division cycle protein 20</i>
CDH1	<i>cadherin 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CKI	proteínas inibidoras de quinases dependente de ciclina, do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
ddNTPs	<i>dideoxynucleotide triphosphates</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOPE	Discrete Optimized Protein Energy
DO	densidade ótica
DTT	dithiothreitol
E2F	<i>E2 factor</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	transferência de ressonância de fluorescência de energia, do inglês <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
HADDOCK	<i>High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing</i>
hATF5	human activating transcription factor 5 , do inglês <i>human activating transcription factor 5</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IPTG	isopropil B-D-1-tiogalactopiranosídeo
IQSC	Instituto de Química de São Carlos

LB	<i>Luria-Bertani</i>
LLA-T	Leucemia linfóide aguda tipo T
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	RNA mensageiro
NIH	Instituto nacional de saúde, do inglês <i>National Institutes of Health</i>
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas, do inglês <i>non-small cell lung cancer</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	banco de dados de proteína, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PFK1	Fosfofrutoquinase- 1, do inglês <i>phosphofructokinase- 1</i>
PKM2	Piruvato quinase M2, do inglês <i>Pyruvate Kinase M2</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil, do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Rb	retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
RMN	Ressonância magnética nuclear
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>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VLPs	partículas semelhantes a vírus, do inglês <i>virus like particles</i>

LISTA DE EQUAÇÕES

- (1) $\theta_m = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MM}{c.l.n}$ 52
- (2) % Fosforilação = $\left(1 - \frac{(ratio \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + (ratio \times (F_{100\%} - C_{0\%}))} \right) \times 100$ 58
- (3) $\log \left\{ \frac{F_0 - F}{F} \right\} = \log K_a + n \log [Q]$ 107
- (4) % de Viabilidade Celular: $\frac{(A\tau - AB)}{(AU - AB)} \times 100$ 109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Proteínas Recombinantes	23
1.2 Produção de Proteínas Recombinantes em Sistemas de Expressão Bacterianos	23
1.3 Produção de proteínas recombinantes para estudos biofísicos e estruturais	25
1.4 O Ciclo Celular	25
1.4.1 Reguladores do Ciclo Celular	27
1.4.2 Inibidores de CDKs	29
1.5 Ciclinas	32
1.5.1 Ciclinas D	34
1.5.1.1 Ciclinas D3	36
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Principal	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Clonagem do Gene <i>CCND3</i>	39
3.1.1 Planejamento do clone do gene <i>CCND3</i>	39
3.1.1.1 Planejamento do clone do gene <i>CCND3</i> - Vetor pET28a	40
3.1.1.2 Planejamento do clone do gene <i>CCND3</i> - Vetor pETSUMO	41
3.1.2 Amplificação do cDNA da ciclina D3	41
3.1.2.1 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pET28a	41
3.1.2.2 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pETSUMO	43
3.1.3 Hidrólise usando enzimas de restrição específica e Reação de ligação	43
3.1.3.1 Inseto cDNA- ciclina D3 – vetor pET28a	43
3.1.3.2 Inseto cDNA- ciclina D3 – vetor pETSUMO	44
3.1.4 Transformação do produto de ligação em cepas de <i>E. coli</i>	45
3.1.5 PCR de colônia	45
3.1.6 Sequenciamento	46
3.2 Ensaio de Expressão e Purificação da Ciclina D3	47
3.2.1.1 Indução da expressão da proteína recombinante pET28a::cicD3	47
3.2.1.2 Indução da expressão da proteína recombinante pETSUMO::cicD3	47
3.2.2.1 Lise das células contendo o recombinante pET28a::cicD3	47
3.2.2.2 Lise das células contendo o recombinante pETSUMO::cicD3	48
3.2.3 Ensaio de solubilização dos corpos de inclusão a partir de protocolo de reenoveloamento	48
3.2.4.1 Purificação da proteína obtida a partir do recombinante pET28a::cicD3	48
3.2.4.2 Purificação da proteína obtida a partir do recombinante pETSUMO::cicD3	49
3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	50
3.2.6 Diálise e determinação da pureza e concentração da proteína	50
3.3 Ensaio de Caracterização Estrutural da Ciclina D3	51
3.3.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	51

3.3.1.1	Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3.	52
3.3.1.2	Determinação da influência da concentração no percentual de estrutura secundária da ciclina D3.	52
3.3.1.3	Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência do tempo.	52
3.3.1.4	Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura.	52
3.3.2	Espectroscopia de emissão de fluorescência	53
3.3.2.1	Avaliação da estabilidade química na presença de ureia e guanidina	54
3.4	Ensaio de Interação CDK11 p58- ciclina D3	54
3.4.1	Análises de bioinformática	54
3.4.1.1	Modelagem de região de loop	54
3.4.1.2	Docagem proteína-proteína.....	55
3.4.2	Ensaio in vitro	55
3.4.2.1	Co-expressão heteróloga das proteínas recombinantes	55
3.4.2.2	Teste de Cross-link das proteínas expressas separadamente	55
3.4.2.3	Teste de incubação das proteínas expressas separadamente sem cross-link.....	56
3.4.2.4	Teste de identificação de atividade quinase (CDK11Δ- ciclina D3)	56
4.	RESULTADOS	59
4.1	Clonagem do Gene <i>CCND3</i>	59
4.1.1.1	Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pET28a	59
4.1.1.2	Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pETSUMO	59
4.1.2	PCR de colônia	59
4.1.3	Sequenciamento	61
4.2	Ensaio de Expressão e Purificação da ciclina D3	62
4.2.1.1	Indução da expressão do recombinante pET28a::cicD3	62
4.2.1.2	Purificação da ciclina D3 a partir do recombinante pET28a::cicD3	65
4.2.1.3	Diálise e determinação da pureza e concentração da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pET28a::cicD3	67
4.2.2.1	Indução da expressão do recombinante pETSUMO::cicD3	68
4.2.2.2	Purificação da ciclina D3 a partir do recombinante pETSUMO::cicD3	69
4.2.2.3	Determinação da pureza e da concentração da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pETSUMO::cicD3	75
4.3	Ensaio de Caracterização Estrutural da ciclina D3	75
4.3.1.1	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para a ciclina D3 expressa a partir do recombinante pET28a::cicD3	75
4.3.1.1.1	Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3	75
4.3.1.1.2	Determinação da influência da concentração no percentual de estrutura secundária da ciclina D3.....	77
4.3.1.1.3	Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 após armazenamento a 4 °C	77
4.3.1.1.4	Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura.	78

4.3.1.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pETSUMO::cicD3	80
4.3.1.2.1 Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3	80
4.3.1.2.2 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência do tempo	81
4.3.1.2.3 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura	82
4.3.2 Espectroscopia de emissão de Fluorescência	83
4.3.2.1 Espectroscopia de emissão de Fluorescência da ciclina D3 obtida a partir do recombinante pET28a::cicD3	83
4.3.2.2 Espectroscopia de emissão de Fluorescência da ciclina D3 obtida a partir do recombinante pETSUMO::cicD3	85
4.4 Ensaio de Interação CDK11 p58- ciclina D3	86
4.4.1 Análises de bioinformática	86
4.4.1.1 Modelagem de região de loop	86
4.4.1.2 Docagem Proteína-Proteína	87
4.4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	89
4.4.2.1 Co-expressão heteróloga das proteínas recombinantes CDK11 e ciclina D3	89
4.4.2.2 Testes de Cross-link das proteínas expressas separadamente	90
4.4.2.3 Testes de incubação das proteínas expressas separadamente sem cross-link	91
4.4.2.4 Teste de identificação de atividade quinase (CDK11 Δ - ciclina D3)	94
5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÃO	99
7. PARTICIPAÇÃO EM OUTROS PROJETOS	100
7.1 Purificação e Caracterização Biofísica da CDK8	100
7.1.1 CDK8	100
7.1.2 Materiais e Métodos	101
7.1.3 Resultados e Discussão	102
7.1.3.1 Expressão, renovelamento e purificação da CDK8	102
7.1.3.2 Ensaio de Caracterização Estrutural da CDK8	103
7.1.3.2.1 Determinação do percentual de estrutura secundária da proteína CDK8	103
7.1.3.2.2 Determinação da estabilidade térmica da proteína CDK8	104
7.1.3.2.3 Determinação da estabilidade química da proteína CDK8	105
7.1.3.2.4 Ensaio de interação com ATP e inibidores 3a e 3f usando espectroscopia de emissão de fluorescência	106
7.1.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular	109
7.1.4 Conclusão	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas Recombinantes

As doenças infecciosas juntamente com os cânceres estão entre as principais causas de morte entre os seres humanos em todo o mundo. A aplicação de diferentes tecnologias do DNA recombinante para a produção em larga escala de proteínas bioterapêuticas tem revolucionado a medicina. O número de moléculas e suas aplicações aumentaram significativamente nos últimos 15-20 anos, juntamente com as quantidades utilizadas para atender as indicações específicas (RUDGE e LADISCH, 2020; TRIPATHI e SHRIVASTAVA, 2019).

A produção de proteínas recombinantes em larga escala tem sido cada vez mais requisitado para estudos biofísicos e estruturais (OLIVEIRA e DOMINGUES, 2018), como também para o tratamento de diversas doenças (TRIPATHI & SHRIVASTAVA, 2019). A produção industrial destas proteínas necessita cada vez mais do desenvolvimento de estratégias eficientes de bioprocessamento, uma vez que se destacam no uso diagnóstico, preventivo e terapêutico (RUDGE e LADISCH, 2020; TRIPATHI e SHRIVASTAVA, 2019).

O campo de produção de proteínas recombinantes constitui um mercado multibilionário, uma vez que parte significativa dos principais produtos do mercado biotecnológico são provenientes destas proteínas (OLIVEIRA e DOMINGUES, 2018). Otimizações no processo produtivo tem sido relatado, como o uso de dispositivos de alto rendimento e de sistemas descartáveis; processamento *upstream* contínuo; cromatografia contínua; bioprocessamento contínuo integrado e tecnologias analíticas de processo para obtenção de produtos de qualidade com maior rendimento (TRIPATHI e SHRIVASTAVA, 2019).

A demanda do mercado instigou o desenvolvimento de vários hospedeiros de expressão de proteínas e tecnologia de bioprocessamento, o que tem tornado o rendimento muito maior a um custo menor (TRIPATHI e SHRIVASTAVA, 2019). A utilização da tecnologia de proteínas recombinantes tem permitido que a expressão de biofármacos à base de proteínas recombinantes, seja alcançada através do uso de diferentes sistemas heterogêneos (OWCZAREK et al., 2019).

1.2 Produção de Proteínas Recombinantes em Sistemas de Expressão Bacterianos

A obtenção em larga escala e o isolamento de proteínas a partir de fontes naturais tem se tornado um entrave para as indústrias de biotecnologia (GEISSE e FUX, 2009). A

utilização de métodos de engenharia genética permite que células sintetizem quantidades suficientes de proteínas de interesse, as quais mesmo sendo consideradas proteínas heterólogas, podem ser purificadas e utilizadas para pesquisas, aplicações industriais e terapêuticas (AHMAD et al., 2019). Diversos sistemas heterogêneos são projetados para a expressão de proteínas heterólogas, entre eles: de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, células de insetos, plantas e células de mamíferos (KI e PACK, 2020).

Aspectos importantes no desenho molecular do procedimento para obtenção destas proteínas devem ser destacados, como: a introdução de marcadores na clonagem de genes, o uso de bioinformática para prever as propriedades e estruturas destas proteínas e o processo de purificação. A purificação de proteínas recombinantes destaca-se não apenas por ser a etapa mais cara do processo, mas principalmente por impactar na função e aplicação da proteína obtida (OLIVEIRA e DOMINGUES, 2018).

O procedimento de purificação depende do sistema de expressão escolhido, ou seja, se a proteína é expressa dentro ou fora das células do hospedeiro. O sistema de expressão de leveduras, como a *Pichia pastoris*, promove a produção de proteínas direcionada para o meio extracelular, local em que ocorrerá modificações (como, glicosilação) e produzirá baixos níveis de proteínas nativas. Neste caso, a purificação é relativamente simples, sendo efetiva em uma única etapa de purificação (OLIVEIRA e DOMINGUES, 2018).

Proteínas expressas em *Escherichia coli* normalmente requerem etapas de purificação mais complexas, uma vez que as proteínas recombinantes são produzidas principalmente no interior das células e podem compreender até 50% da proteína celular total. A purificação eficiente de uma proteína alvo a partir de um extrato celular bruto nem sempre é simples e, às vezes, mais de uma etapa de purificação é necessária para atingir um nível de pureza adequado (KI e PACK, 2020).

Escherichia coli é um dos sistemas de expressão heterólogos mais utilizados, produzindo mais de um terço das proteínas terapêuticas (WALSH, 2010; KI e PACK, 2020). Esse sistema apresenta diversas vantagens, como o fácil manuseio e alto rendimento de proteínas recombinantes (FOSSUM et al., 2007), entretanto, são encontradas desvantagens, como a falta de modificações pós-traducionais eucarióticas, baixa solubilidade, dobramento inadequado de proteínas e formação de corpos de inclusão (BAESHEN et al., 2014).

Apesar das desvantagens apresentadas para a *E. coli*, os avanços da biotecnologia têm permitido que esse sistema de expressão de proteínas continue sendo atraente e bastante utilizado (BAESHEN et al., 2015). Alguns marcadores de fusão tem sido acrescentados para melhorar a expressão, a solubilidade e facilitar a purificação dessas proteínas, reduzindo as

etapas de purificação ao mínimo, enquanto aumenta o rendimento e a pureza. A principal questão é decidir sobre a escolha e quantidade destes marcadores, a posição que devem ser inseridos na proteína e se devem ou não ser removidas durante o processo de purificação (KI e PACK, 2020).

A fim de validar o processo de produção e purificação recombinante de uma amostra de proteína, é necessário realizar o controle de qualidade desta amostra, assegurando desta forma a sua pureza, homogeneidade, conformidade estrutural, e a reprodutibilidade do processo (KI e PACK, 2020).

1.3 Produção de proteínas recombinantes para estudos biofísicos e estruturais

Quantidades aceitáveis de proteínas solúveis para estudos de biologia estrutural, quase sempre são alcançados utilizando-se de sistemas de expressão baseados em *Escherichia coli* (LUNDSTROM, 2007).

A utilização de estratégias desde a clonagem molecular até a superexpressão de proteínas recombinantes em bactérias permitiu que uma grande variedade de estruturas de proteínas fossem determinadas por cristalografia de raios X (WOLBERGER, 2021).

O avanço de técnicas em cristalografia de raios X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e, mais recentemente, microscopia crioeletrônica (crio-EM) aumentou em muitas ordens de magnitude, o número e a complexidade de estruturas de proteínas que passaram a ser depositadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB) (WOLBERGER, 2021).

A disponibilidade no PDB de tantas estruturas de fatores de transcrição individuais, enzimas e nucleossomos permitiu a determinação da estrutura de grandes complexos que continham muitas dessas macromoléculas. O fácil acesso destas estruturas tem impulsionado novas ciências, principalmente fornecendo insights estruturais e biofísicos sobre as características moleculares de diferentes proteínas (WOLBERGER, 2021).

A superfamília de quinases dependentes de ciclina (CDKs) e seus parceiros ciclinas são os principais reguladores do ciclo celular. A desregulação de CDKs é encontrada com alta frequência em muitas células cancerígenas humanas, e obter dados biofísicos e estruturais destas proteínas tem permitido encontrar pequenas moléculas capazes de inibi-las farmacologicamente e fornecer uma estratégia eficaz para o tratamento do câncer.

1.4 O Ciclo Celular

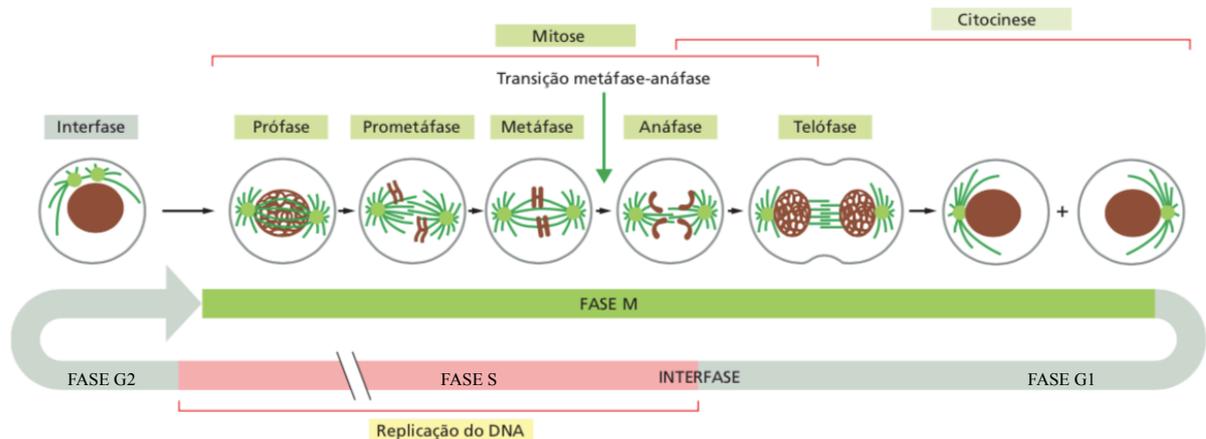
De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NIH), o ciclo

celular é definido como uma série de eventos que ocorrem em uma célula à medida que ela cresce e se divide. O ciclo celular mitótico é dividido em duas fases distintas, a interfase e a fase M (mitose). As células passam a maior parte do tempo na fase de interfase, em que os eventos de crescimento, replicação dos seus cromossomos e preparo para a divisão celular são identificados. Após a saída da fase interfase, as células sofrem o processo de mitose e completam a divisão. As células resultantes, conhecidas como células-filhas, entram em sua própria interfase e iniciam uma nova rodada do ciclo celular. A complexa rede de elementos reguladores que formam o ciclo celular tem como objetivo promover a duplicação e segregação oportuna e precisa do DNA genômico (MATTHEWS et al., 2022).

A replicação do DNA é definida como o tempo na interfase durante o qual a replicação do DNA é iniciada, mas não completada. Dois períodos-chave para a regulação do ciclo celular são historicamente conhecidas como “fases de intervalo”, ou seja intervalos que ocorrem entre os dois principais eventos, duplicação e segregação do DNA. O período G1 antecede a fase S, e G2 ocorre após a fase S, durante G1 ocorre a decisão crucial de entrar no ciclo celular, e em G2 de iniciar o processo que leva à segregação cromossômica (MATTHEWS et al., 2022).

Durante a fase G1 pré-replicativa, as células podem optar por iniciar a replicação do DNA e entrar no ciclo celular ou permanecer na fase G1. (Fig. 1). Durante esta fase, as células podem optar também pela saída do ciclo celular para um estado não proliferativo conhecido como quiescência ou G0. Grande parte das células em um corpo adulto encontra-se neste estado não proliferativo e necessita percorrer por G1 antes de iniciar a replicação do DNA e entrar no ciclo celular. Durante a fase G2 pós-replicativa, ocorre a outra janela de decisão, em que as células podem comprometer-se a entrar na fase M iniciando a condensação da cromatina e o alinhamento central de cromossomos. Durante a fase M, as células participam da segregação precisa do material genético (mitose) e da divisão de todo conteúdo celular em duas novas filhas (citocinese), as quais se comprometem em reiniciar o ciclo celular para retornar à interfase (MATTHEWS et al., 2022).

Figura 1. O ciclo de divisão celular em organismos eucarióticos.



Fonte: ALBERTS et al., 2017.

O processo de divisão celular, em organismos eucariotos unicelulares e multicelulares, é controlado por uma complexa rede de mecanismos reguladores, verificações e balanços, a fim de garantir que nenhum erro seja gerado antes que uma célula inicie o processo de divisão (MATTHEWS et al., 2022).

1.4.1 Reguladores do Ciclo Celular

O processo contínuo e excessivo de divisão das células é representado por um grupo de doenças denominada de câncer. O ciclo celular possui várias etapas conhecidas como *checkpoints*, as quais funcionam como mecanismos de vigilância do DNA. Durante a divisão celular, os *checkpoints* bloqueiam o acúmulo e a propagação de erros genéticos. Este mecanismo adia a progressão do ciclo celular ou, em situações de danos irreparáveis no DNA, induzem a saída do ciclo celular, levando à morte celular (MATTHEWS et al., 2022).

O regulador chave dos processos do ciclo celular, é a atividade das proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que formam complexos heterodiméricos com as ciclinas. A abundância de atividade CDK durante a interfase e a fase M, impulsiona a progressão do ciclo celular. A inibição desta atividade ocorre durante a mitose através do complexo aPC/C com a proteína ativadora CDC20; e durante G1 através do complexo aPC/C com a proteína ativadora CDH1, levando a degradação das ciclinas e marcando o retorno para a interfase (MATTHEWS et al., 2022).

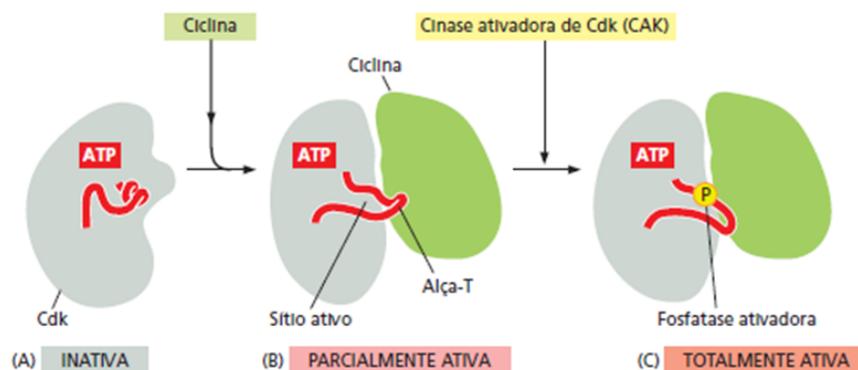
As CDKs representam a subunidade catalítica, enquanto as ciclinas são a subunidade reguladora, ou seja, parte indispensável para a atividade das CDKs (MOIOLA et al., 2010). As CDKs são um grupo de aproximadamente 20 proteínas serina/treonina quinases sendo que

algumas atuam diretamente na regulação do ciclo celular (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 e CDK6) e outras atuam indiretamente, na síntese de DNA, na regulação da transcrição (CDK7, CDK8, CDK9, CDK10 e CDK11), e em funções pós-mitóticas (CDK5) (DIPIPO et al., 2016). Desta forma, a família das CDKs pode ser subdividida em dois grupos funcionais majoritários baseados na sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional (MYERS E KORNBERG, 2000; SIMMONS et al., 2012).

Transições críticas do ciclo celular eucariótico são reguladas por eventos padrões de fosforilação de proteínas governadas predominantemente pela atividade catalítica de CDKs (GALLORINI et al., 2012). A atividade das quinases é regulada entre si por reações de fosforilação-desfosforilação sítio-específico (KREK e NIGG, 1991; SOLOMON, 1994), e no caso das CDKs, a associação com subunidades regulatórias positivas (ciclina) (HUNT, 1991) e negativas (inibidores de CDKs – CKIs) (ELLEGE e HARPER, 1994; CUOMO et al., 2011).

A progressão através do ciclo de divisão celular é conduzida pelas ciclina. Para garantir que essa progressão ocorra de maneira ordenada, os complexos heterodiméricos específicos de CDK-ciclina (Fig. 2) fosforilam diversas proteínas celulares, as quais promovem a entrada no ciclo celular e na fase G1, a regulação da síntese de DNA (durante a fase S) e a segregação dos cromossomos recém-duplicados durante a mitose (HYDBREND et al., 2016). A degradação controlada de ciclina pelo proteossomo é um mecanismo importante de regulação da atividade de complexos CDK-ciclina durante o ciclo celular, e muitas ciclina contêm motivos estruturais que marcam proteínas para serem alvos de ubiquitina – ligases (ALBERTS et al., 2017).

Figura 2. Complexo heterodimérico CDK-ciclina. (A) Proteína CDK representada com o sítio ativo bloqueado pela alça T. (B) Complexo CDK-ciclina parcialmente ativo, com deslocamento da alça T do sítio ativo. (C) Complexo CDK-ciclina totalmente ativo, após fosforilação da alça T.



A sinalização proliferativa sustentada que leva a ciclos contínuos e excessivos de divisão celular, é a marca registrada do câncer. Recentes descobertas revelaram que mutações que impedem a apoptose e comprometem a saída do ciclo celular são as responsáveis por impulsionar a divisão celular (MATTHEWS et al., 2022).

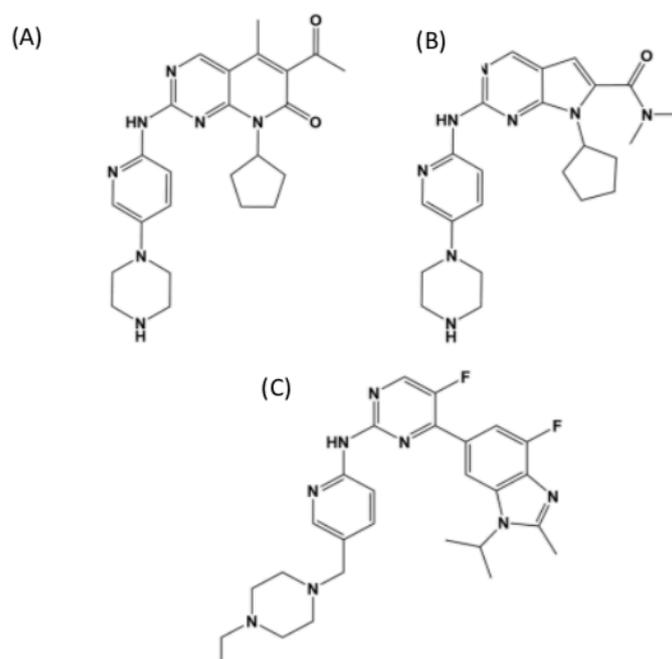
O crescimento do tumor depende da proliferação celular contínua. A atividade de CDK é o principal fator de progressão do ciclo celular, a qual tem sido extensamente relatada em vários tipos de câncer, tornando as CDKs alvos atraentes para novos tratamentos (MALUMBRES & BARBACID, 2009; PEYRESSATRE et al., 2015; CHOCHAN et al., 2018; QIE e DIEHL, 2020).

1.4.2 Inibidores de CDKs

Os inibidores de CDKs podem potencialmente impedir a progressão contínua do ciclo celular, forçando as células cancerígenas a saírem permanentemente do ciclo celular para um estado senescente. Vários medicamentos direcionados às CDKs entraram na fase de desenvolvimento clínico, mas até recentemente poucos alcançaram a eficácia esperada em ensaios clínicos (WHITTAKER et al., 2017). Embora CDK2 seja um alvo atraente para a terapia do câncer, a maioria dos inibidores contra CDK2 são competidores de ATP, os quais são inespecíficos ou altamente tóxicos atribuindo esses fatos às falhas nos ensaios clínicos (ZHANG et al., 2022).

Os exemplos mais proeminentes destes são os inibidores de CDK4/6 palbociclibe, ribociclibe e abemaciclib (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2019) (Fig. 3). Esses medicamentos têm como alvo a atividade de CDKs mais comumente desregulada no câncer, e mostram benefício clínico significativo para o tratamento do câncer de mama metastático positivo para o receptor hormonal, levando à aprovação do FDA para o tratamento desta doença (CHOI & ANDERS, 2014). As três moléculas citadas são inibidores do tipo ATP competitivo, ou seja, ligam-se no bolsão de ligação do ATP das CDKs 4 e 6, impedindo a transferência do fosfato para a proteína alvo (CHOCHAN et al., 2018; LIU et al., 2018).

Figura 3. Inibidores de CDK4/6. (A) palbociclib, (B) ribociclib e (C) abemaciclib.

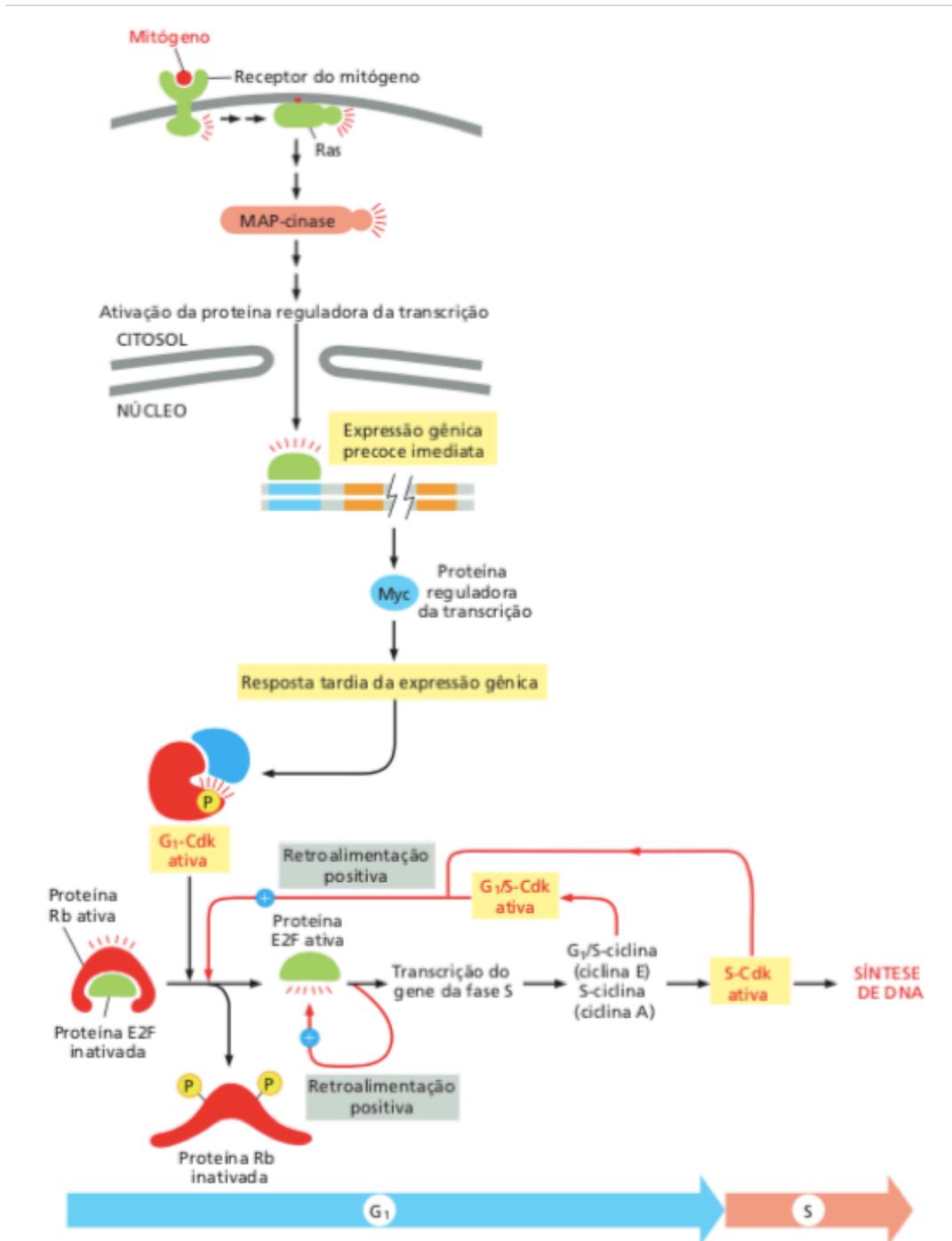


Fonte: Autoria própria

As CDK4/6 associam-se às ciclinas do tipo D. Acredita-se que a atividade da ciclina do tipo D desempenha um papel mais direto na prevenção da saída do ciclo celular do que na condução da entrada do ciclo celular. Estudos publicados relatam que a inibição de CDK4/6 pode ocasionar quiescência, senescência ou apoptose em tipos específicos de câncer, ou seja, os inibidores de CDK4/6 podem forçar a saída das células cancerígenas do ciclo celular (MATTHEWS et al., 2022). Esse novo entendimento prevê que o tratamento com inibidores de CDK4/6 é mais propenso em resultados benéficos para pacientes com mutações em proteínas envolvidas na vias de saída do ciclo celular, como p16, também conhecida com CDKN2 (MATTHEWS et al., 2022).

As CDK 4/6 agem fosforilando a proteína Retinoblastoma (Rb). A inibição destas CDKs impede a fosforilação de Rb, a qual retém o fator E2F, que é necessário para transcrever genes que codificam proteínas que ativam a fase S, levando a parada do ciclo celular na fase G1 e consequente supressão do crescimento tumoral (CHOHAN et al., 2018; LIU et al., 2018) (Fig. 4).

Figura 4. Representação esquemática da regulação do ciclo celular. A Myc influencia aumento da atividade da G1-Cdk (ciclina D-Cdk4), que aciona a fosforilação de membros da família de proteínas Rb. Isso inativa as proteínas Rb, liberando a proteína reguladora gênica E2F para ativar a transcrição de genes de G1/S, incluindo os genes de uma G1/S-ciclina (ciclina E) e de uma S-ciclina (ciclina A). As atividades resultantes da G1/S-Cdk e da S-Cdk estimulam ainda mais a fosforilação da proteína Rb, formando um ciclo de retroalimentação positiva. As proteínas E2F também estimulam a transcrição de seus próprios genes, formando outro ciclo de retroalimentação positiva.



Fonte: ALBERTS et al., 2017.

Diversos outros inibidores encontram-se em fase de testes clínicos, mas ainda não foram aprovados para uso (Tabela 1) (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Tabela 1. Inibidores de CDK em fase de testes clínicos.

Drug	Developer (Originator)	Primary Target	Other targets	Stage of development
Palbociclib = PD-0332991 = Ibrance	Pfizer (Onyx Pharmaceuticals)	CDK4/6		Launched
LEE-011 = Ribociclib = Kisqali	Novartis / Astex	CDK4/6		Launched
Abemaciclib = LY2835219 = Verzenio	Eli Lilly	CDK4/6		Launched
G1T28 = Trilaciclib	G-1 Therapeutics	CDK4/6		Phase II
G1T38 = Lerociclib	G-1 Therapeutics	CDK4/6		Phase II
SHR-6390	Jiangsu Hengrui Medicine	CDK4/6		Phase II
Flavopiridol = Alvociclib	Sanofi (Tolero)	CDK9	CDK1/4/5/6/7, pan-kinase	Phase II
PHA848125 = Milciclib	Nerviano	CDK2, TrKA	CDK1/4/5/7, Src family	Phase II
BCD-115	Biocad	CDK8/19		Phase II
MM-D37K	MetaMax	CDK4/6		Phase I/II
PF-06873600	Pfizer	CDK2/4/6		Phase I/II
TG-02 = SB-1317 = Zotiraciclib	Adastral Pharmaceuticals (Tragara Pharmaceuticals)	CDK9	CDK1/2/3/5/7, FLT3, JAK2, MAPK7	Phase I/II
C7001 = ICEC 0942	Carrick Therapeutics	CDK7		Phase I/II
BEY-1107	BeyondBio	CDK1		Phase I/II
XZP-3287 = Birociclib	Sihuan Pharmaceutical, XuanZhu Pharma	CDK4/6		Phase I
BPI-16350	Beta Pharmaceutical	CDK4/6		Phase I
FCN-437	Chongqing Fochon Pharma	CDK4/6		Phase I
CYC-065	Cyclacel	CDK2/9	CDK5	Phase I
Seliciclib = R-Roscovitine = CY-202	Cyclacel	CDK2/9	CDK1/5/7	Phase I
AT-7519	Astex	CDK9	CDK1/2/3/5/4/6, GSK3b, VEGFR	Phase I
AGM-130 = Inditininb	AnyGen	CDK2	CDK1/4/5/6	Phase I
FN-1501	Shanghai Fosun Pharmaceutical, China Pharmaceutical University	CDK2	CDK4/6, FLT3	Phase I
SY-1365	Syros	CDK7	CDK12	Phase I
AZD-4573	AstraZeneca	CDK9		Phase I
TP-1287 (Flavopiridol prodrug)	Tolero	CDK9		Phase I
P-1446A-05 = Voruciclib	Pyramal (MEI Pharma)	CDK9	CDK1/4	Phase I
BAY-1251152	Bayer	CDK9		Phase I
SCH-727965 = MK-7965 = Dinaciclib	Merck (NCI)	CDK12	CDK1/2/5/9	Phase I
BEBT-209	Guangzhou BeBetter Medicine Technology	CDK4/6		IND filed
TQB-3616	Chia Tai Tianqing Pharmaceutical	CDK4/6		IND filed
BAY-1000394 = Ronciclib	Bayer	CDK1/2/3/4/7/9	VEGFR	Discontinued
BAY-1143572 = Atuvaciclib	Bayer	CDK9		Discontinued
AMG-925 = FLX-925	Amgen (FLX BIO)	CDK4/6	FLT3	Discontinued

Fonte: SÁNCHEZ- MARTÍNEZ et al., 2019.

1.5 Ciclinas

As ciclinas são uma grande família de aproximadamente 30 proteínas, as quais são agrupadas em 16 subfamílias e três grupos principais: grupo I (grupo ciclina: A, B, D, E, F, G, J, I e O); grupo II (grupo ciclina Y); grupo III (grupo ciclina: C, H, K, L e T- principais parceiros das proteínas CDKs transcricionais) (CAO et al., 2014).

As ciclinas apresentam massa molecular que varia de 35-90 kDa. Essas proteínas são definidas estruturalmente pela presença de um domínio particular das ciclinas, o qual possui aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos configurados em cinco hélices- α . Muitas ciclinas possuem dois domínios, um domínio amino-terminal para ligação às CDKs e outro carboxi-terminal, que geralmente é necessário para o dobramento adequado da molécula de ciclina (MALUMBRE, 2014).

A regulação do ciclo celular foi relatada pela primeira vez em 1982 por Timothy Hunt, que verificou a oscilação dos níveis de ciclina durante a divisão celular. O ciclo celular é

conduzido por quatro principais ciclinas: A, B, D e E, cada uma presente em fase distinta do ciclo celular (MATTHEWS et al., 2022).

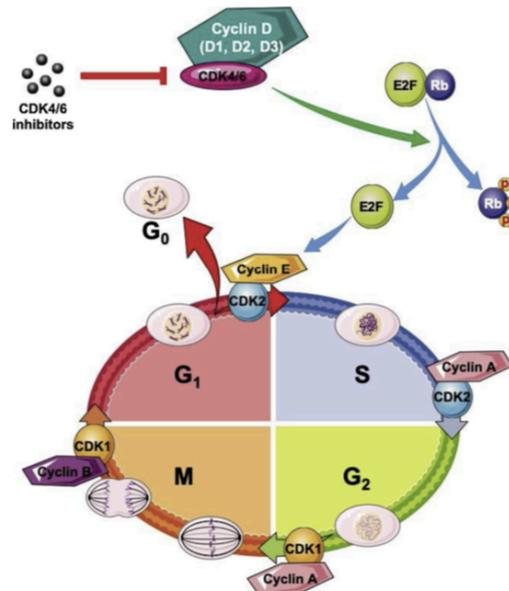
As ciclinas do tipo A, B, D e E interagem com CDKs específicas para formar um complexo proteico. CDK4/6, CDK2 e CDK1 possuem três sítios de ligação que são chamados de domínio de ligação à ciclina, domínio de ligação ao ATP e sítio ativador da alça T. As ciclinas se ligam ao domínio de ligação à ciclina de CDKs para formar complexos heterodiméricos ativos para a progressão do ciclo celular, como visto na Figura 2 (MATTHEWS et al., 2022).

Isômeros de ciclinas do tipo D foram descobertos na década de 90 e mais tarde essas ciclinas foram rotuladas como conectoras entre os sinais e a progressão do ciclo celular. A transcrição do gene da ciclina D ocorre após o recebimento dos sinais mitogênicos da cascata RAS-RAF-MAPK. Em condições ambientais favoráveis, os mitógenos desencadeiam vias de sinalização intracelular, que ativam os promotores das ciclinas D. Estas ciclinas são as responsáveis em mediar entre as vias proliferativas e a maquinaria central do ciclo celular (PAWLONKA et al., 2021).

As ciclinas D heterodimerizam com as CDK 4 e 6 para formar complexos que podem fosforilar e inativar a proteína retinoblastoma (Rb). A inativação de Rb desencadeia a ativação de fatores de transcrição E2F, os quais regulam a expressão de genes cujos produtos direcionam a progressão do ciclo celular (Figura 5) (DIEHL et al., 1997; QIE e DIEHL, 2020). Sem estímulo de sinal externo, Rb se liga ao fator de transcrição E2F para suprimir as atividades de Rb e inibir a proliferação celular, levando à parada do ciclo celular na fase G0/G1. Após o estímulo por sinais mitogênicos externos, as células estáveis entram na fase G1 (ZHANG et al., 2019).

O complexo CDK4/6- ciclina D ao mediar a fosforilação das proteínas Rb, abolem o efeito inibitório de Rb sobre E2F, aumentando assim a expressão de ciclina E. No final da fase G1, Rb é ainda fosforilado pelo complexo ciclina E/CDK2, levando a progressão celular da fase G0/G1 para a fase S em que a ciclina A se liga a CDK2 para modular a síntese e a replicação do DNA. A ciclina A então se associa a CDK1 para estimular a entrada na fase G2/M. Finalmente, CDK1 liga-se à ciclina B e regula o início da mitose (Figura 5) (ZHANG et al., 2019).

Figura 5. Ilustração esquemática do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G₁, S (síntese de DNA), G₂ e M (mitose). A progressão do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e suas CDKs cognatas. A fosforilação sequencial por complexos de quinase CDK 4/6: ciclina D: causa mudanças conformacionais na estrutura de Rb e liberação de E2F. A liberação de E2F é necessária para a expressão dos genes das fases S.



Fonte: QIE e DIEHL, 2020.

Embora originalmente caracterizadas como parceiras das CDKs, as ciclinas também possuem papéis independentes, que incluem a regulação do reparo de danos ao DNA e programas de transcrição que direcionam a diferenciação celular, a apoptose e o fluxo metabólico (WOOD et al., 2018).

1.5.1 Ciclina D

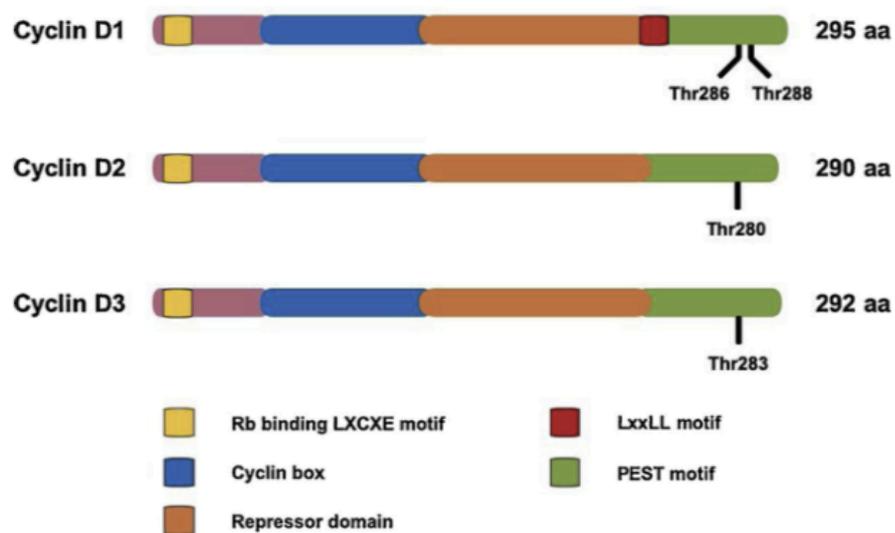
As ciclinas são os principais reguladores da progressão e sobrevivência do ciclo celular. As ciclinas D, particularmente, são as responsáveis em mediar entre as vias proliferativas e a maquinaria central do ciclo celular. A desregulação da expressão de ciclinas resulta em desenvolvimento prejudicado, crescimento celular anormal ou tumorigênese (PAWLONKA et al., 2021).

O desenvolvimento de tumores, na maior parte dos casos, é causado pela superexpressão de ciclinas do tipo D. A superexpressão de ciclina D pode levar a duas possibilidades, sendo a primeira quando o complexo ciclina D-CDK se acumula no núcleo e executa o mecanismo de proliferação celular excessiva. E a segunda possibilidade ocorre quando há um aumento de ciclina D no citoplasma. Esse evento é identificado durante a progressão para a fase S do ciclo celular. No entanto, devido ao alto teor de ciclina D no

citoplasma, o complexo CDK4-ciclina D prontamente fosforila a proteína de suporte no citoplasma, o que acarreta em diminuição da adesão celular e aumento da migração e invasão celular, indicando que o tumor está em fase metastática (FUSTÉ et al., 2016).

As ciclinas do tipo D incluem três isoformas: D1, D2 e D3, com aproximadamente 57% de identidade em todas as isoformas proteicas e 78% de identidade no domínio da caixa da ciclina do N-terminal (MUSGROVE et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6. Ilustração das três isoformas de ciclina do tipo D. Representação dos locais conservados para Thr286 na ciclina D1, Thr280 na ciclina D2 e Thr283 na ciclina D3.



Fonte: QIE e DIEHL, 2020.

As ciclinas D são proteínas altamente lábeis, com meia-vida curta que varia de 10 a 60 minutos, de acordo com as linhagens investigadas (YOSHIDA et al., 2020). O processo de ubiquitinação e degradação das ciclinas D dependem da fosforilação dessas proteínas em etapas críticas do ciclo celular. A fosforilação dessas ciclinas acontece no aminoácido treonina (Thr) 286/288; 280; 283 para a ciclina D1, D2 e D3, respectivamente (BARBASH et al., 2009).

A fosforilação do aminoácido treonina direciona a exportação da ciclina do núcleo para o citoplasma, região em que a ciclina D será ubiquitinada e degradada pelo proteossoma (BENZENO et al., 2006). O processo regulatório depende primordialmente da fosforilação desse aminoácido, uma vez que a ocorrência de uma mutação nessa região, ocasiona uma ciclina constitutivamente nuclear e estável (BARBASH et al., 2009; BENZENO et al., 2006). Diversos tipos de câncer, incluindo o câncer uterino e endometrial demonstram mutações no aminoácido Thr286 e revelaram o potencial oncogênico da ciclina D1 (MORENO-BUENO et

al., 2003).

Estudos indicam a degradação da ciclina D nas fases tardia de G1 e S (LIN et al., 2006), entretanto, alguns estudos apresentaram resultados controversos, com a ubiquitinação e degradação de ciclinas D2 e D3 durante a transição G2-M (CHEN et al., 2012).

As ciclinas do tipo D funcionam como sensores mitogênicos que vinculam a sinalização do fator de crescimento diretamente à progressão da fase G1. A desregulação na degradação e o acúmulo de ciclinas do tipo D estão associados a uma variedade de tumores humanos (QIE e DIEHL, 2020). A expressão elevada de ciclinas D reflete amplificação gênica, aumento da transcrição e tradução de proteínas, diminuição da expressão de microRNA e ineficiência ou perda de degradação de proteínas mediada por ubiquitinação (QIE e DIEHL, 2020).

O gene *CCND1*, referente a proteína ciclina D1, é superexpresso em uma variedade de cânceres humanos, incluindo câncer de pâncreas, carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC), câncer de mama, carcinoma de espinocelular de cabeça e pescoço, melanoma, câncer endotelial, carcinoma espinocelular de esôfago e carcinoma colorretal. A superexpressão da ciclina D1 pode ser causada por mutações na região não traduzida em 3', o que resulta em uma degradação reduzida do mRNA mediada por microRNAs; os níveis da ciclina D1 se correlacionam diretamente com o tamanho do tumor, invasão local e metástase (QIE e DIEHL, 2020).

A superexpressão de ciclina D2 está associada à invasão tumoral, metástase e prognóstico em pacientes com câncer de cólon e carcinoma gástrico (DING et al., 2019), além disso, o gene *CCND2* é amplificado no glioblastoma e no astrocitoma anaplásico (YU et al., 2003). O gene *CCND2* juntamente com *CCND3* estão associados à tumorigênese e são considerados promissores biomarcadores para prever o prognóstico de pacientes com neoplasias malignas (DING et al., 2019).

1.5.1.1 Ciclina D3

A ciclina D3 tem como função atuar na fase G1 como subunidade reguladora de CDK4 e CDK6, e também como parceira da CDK11^{p58} na fase G2/M durante a progressão do ciclo celular (DUAN et al., 2010). A associação da ciclina D3 com a CDK11^{p58} foi relatada por afetar negativamente a atividade transcricional do receptor androgênico, enquanto que a associação com CDK11^{p110} afetou positivamente a transcrição de numerosos genes repórteres (LOYER et al., 2008). Além disso, a ciclina D3 já foi identificada associada às CDK1, CDK2 e CDK14 (WHITTAKER et al., 2017).

A superexpressão da ciclina D3 se correlaciona com o aumento da proliferação celular e crescimento tumoral em carcinoma hepatocelular, gliomas, carcinoma de bexiga, câncer de próstata e osteossarcoma (DING et al., 2019). Análises univariadas e multivariadas revelaram que a expressão de *CCND3* desempenha um papel oncogênico no câncer de mama e com um maior risco de recorrência, sugerindo que a ciclina D3 pode se tornar um fator prognóstico independente para pacientes com câncer de mama (CHI et al., 2015).

Além disso, a ciclina D3 é capaz de inibir a atividade de transativação do receptor de andrógenos, membro da família de receptores de hormônios esteroides nucleares, de uma maneira independente de quinases, competindo com ele para a ligação P/CAF (HYDBREND et al., 2016).

Outras diversas funções foram relatadas para a ciclina D3 entre elas: aumentar a transativação do receptor de vitamina D; interagir com o fator ativador da transcrição humano 5 (hATF5) e melhorar sua atividade; competir com o fator de ligação nuclear β para a ligação do RUNX1, reduzindo assim a capacidade do RUNX1 para ligar o DNA e ativar a transcrição; função pró-apoptótica pela interação física com a caspase 2, levando à estabilização desta protease e promovendo a sua clivagem em uma forma ativa (HYDBREND et al., 2016).

Diversos mecanismos reguladores, os quais são essenciais para a síntese adequada de DNA e de proteínas para as células filhas geradas, são obtidos pelo processo de fosforilação/desfosforilação e destruição de enzimas metabólicas dependentes do ciclo celular. Exemplos destes mecanismos são exemplificados por mudança de preferência metabólica e de oscilação de intermediários metabólicos. Alterações nestas vias reguladoras ocasionam em mutação do DNA, estresse oxidativo e remodelação do metabolismo, que possivelmente desenvolverá proliferação celular incontrolável e tumorigênese. Este fato é exemplificado em células T de leucemia linfóide aguda (LLA-T), as quais expressam predominantemente ciclina D3, e a superativação do complexo CDK6- ciclina D3, inibe PFK1 e PKM2 reprimindo a glicólise. Este evento, ocasiona maior fluxo para via das pentoses fosfatos e para a via da serina para produção de NADPH redutor e glutatona, o que leva a proliferação e resistência à drogas de células LLA-T. Inibidores de CDK4/6 podem eficientemente reverter esta remodelação metabólica ocasionada pela superexpressão de CDK4/6- ciclina D3 e tornar as células LLA-T suscetíveis ao estresse oxidativo e apoptose (LIU et al., 2022).

Como visto, as ciclinas da fase G1/S que são ciclina D, ciclina E e ciclina A possuem responsabilidade expressivas em estimular o desenvolvimento do câncer devido à sua

expressão excepcional em toda a célula. Entender a expressão de ciclinas tanto no mRNA quanto de proteína, é essencial para ter uma melhor visão dos mecanismos anormais (ZHANG et al., 2019).

Apesar de grandes avanços no descobrimento de inibidores de CDKs, compreender como as células cancerosas superam os pontos de verificação revela vulnerabilidades que podem ser direcionadas terapeuticamente, o que facilitará os oncologistas a maximizar os benefícios clínicos dos inibidores de CDK4/6 e otimizar os regimes terapêuticos após a progressão da doença (HUANG & WANG, 2020).

A utilização de proteínas recombinantes tem ajudado a superar os obstáculos associados aos estudos biofísicos e estruturais. A obtenção de complexos proteicos heterólogos tem fornecido rendimentos consideráveis de proteínas com atividades funcionais. Para ajudar a superar a falta de informações científicas quanto a proteína ciclina D3, este estudo propõe a produção recombinante desta proteína para fins de estudos estruturais e de atividade enzimática na presença de sua parceira CDK11.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína recombinante Ciclina D3 obtida em sistema de expressão heterólogo (*E. coli*).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter alta concentração de proteína recombinante com grau de pureza adequada para estudos biofísicos.
- Realizar ensaios biofísicos com a proteína recombinante, como dicroísmo circular (CD) e espectrofluorimetria, a fim de confirmar sua correta estrutura secundária e estabilidade térmica e química.
- Comparar dados biofísicos de proteínas recombinantes obtidas por meio de processo de renovelamento, com dados de proteínas obtidas de forma nativa.
- Promover a formação do complexo CDK11 Δ - ciclinaD3 e verificar a atividade quinase deste complexo utilizando a metodologia de transferência de ressonância de fluorescência de energia (FRET) entre os fluoróforos cumarina e fluoresceína.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A proteína ciclina D3 foi obtida a partir da clonagem do cDNA e da expressão heteróloga em sistema bacteriano. As metodologias referentes a cada etapa estão descritas a seguir.

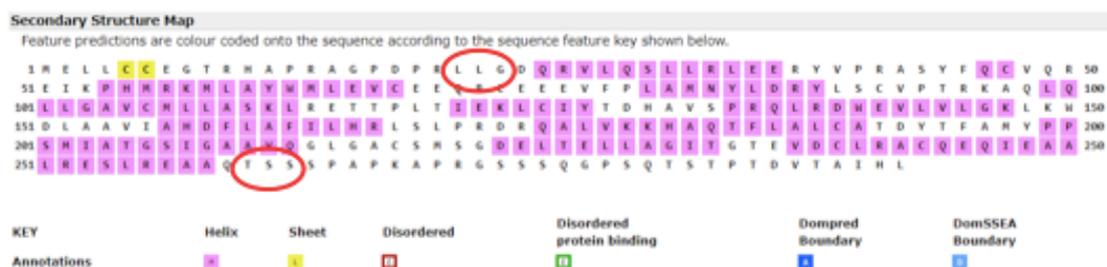
3.1 Clonagem do Gene *CCND3*

O plasmídeo recombinante foi obtido através dos métodos de biologia molecular, cujas etapas essenciais compreenderam:

3.1.1 Planejamento do clone do gene *CCND3*

A sequência do cDNA da ciclina D3 foi obtida pelo GenBank (código de acesso: NM_001760). A sequência de nucleotídeos foi traduzida para a sequência de aminoácidos pela ferramenta *Translate* do programa ExpASY (<https://web.expasy.org/translate/>) e foi realizado a análise da estrutura secundária da proteína ciclina D3 pela ferramenta *Psipred* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Figura 7).

Figura 7: Análise da cadeia polipeptídica da ciclina D3 utilizando o *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Círculos em vermelho delimitam a sequência obtida (da Leu21 a Ser263).



Fonte: Autoria própria

A análise do mapa da estrutura secundária permite identificar regiões desordenadas da cadeia polipeptídica e delimitar a região de interesse a ser clonada. A proteína do presente estudo foi clonada a partir das regiões delimitadas pelos círculos em vermelho.

A presença de códons raros no cDNA foi verificada utilizando o programa SVKDIPMPPS-RARECODON (<http://svkdipmpps-rarecodon-analysis.blogspot.com.br/>). Pela análise foram detectados 23 códons raros, os quais foram alterados por códons comuns em *E. coli* sem modificar a sequência da cadeia polipeptídica da proteína, no momento da expressão heteróloga (Figura 8). Complementarmente, foram incluídos nas extremidades 5' e

3' do cDNA os sítios de restrição para as enzimas escolhidas.

Figura 8. Análise de códons raros pelo programa SVKDIPMPPS-RARECODON.

```
CTG CTG GGG GAC CAG CGT GTC CTG CAG AGC CTG CTC CGC CTG GAG GAG CGC TAC GTA CCG CGC GCC TCC TAC TTC CAG TGC GTG CAG CCG GAG ATC AAG CCG CAC ATG CCG AAG ATG
CTG GCT TAC TGG ATG CTG GAG GTA TGT GAG GAG CAG CGC TGT GAG GAG GAA GTC TTC CCG CTG GCC ATG AAC TAC CTG GAT CGC TAC CTG TCT TGC GTC CCG ACC CGA AAG GCG CAG TTG
CAG CTC CTG GGT GCG GTC TGC ATG CTG CTG GCC TCC AAG CTG CGC GAG ACC ACC CCG CTG ACC ATC GAA AAA CTG TGC ATC TAC ACC GAC CAC GCT GTC TCT CCG CGC CAG TTG CCG
GAC TGG GAG GTG CTG GTC CUA GGG AAG CTC AAG TGG GAC CTG GCT GCT GTG ATT GCA CAT GAT TTC CTG GCC TTC ATT CTG CAC CCG CTC TCT CTG CCG CGT GAC CGA CAG GCC TTG
GTC AAA AAG CAT GCC CAG ACC TTT TTG GCC CTC TGT GCT ACA GAT TAT ACC TTT GCC ATG TAC CCG CCA TCC ATG ATC GCC ACC GGC AGC ATT GGG GCT GCA GTG CAA GGC CTG GGT GCC
TGC TCC ATG TCC GGG GAT GAG CTC ACA GAG CTG CTG GCA GGG ATC ACT GGC ACT GAA GTG GAC TGC CTG CCG GCC TGT CAG GAG CAG ATC GAA GCT GCA CTC AGG GAG AGC CTC AGG
GAA GCC TCT CAG ACC AGC TCC
```

The Number of Bases in the above Sequence = 729

The Number of Codons in the above Sequence = 243

Fonte: Autoria própria

3.1.1.1 Planejamento do clone do gene *CCND3*- Vetor pET28a

Para a clonagem utilizando o vetor pET28a, sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI* foram incluídos nas extremidades 5' e 3' do cDNA, respectivamente.

Os primers foram confeccionados inserindo os mesmos sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*. O programa IDTDNA (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi utilizado para a verificação dos primers considerando suas características quanto à formação de hairpins, temperatura de anelamento e porcentagem de CG.

O primer direto obteve a sequência:

5'-AAACATATGGGCGACCAGCGTGTCTGC-3' com TM: 63,2°C e % CG= 57,1;

O primer reverso obteve a sequência:

5'-AAAGGATCCTCAGGTCTGAGAGGCTTCGCG-3' com TM: 63,4°C e % CG= 56,7.

O vetor pET28a foi escolhido para clonagem e a sequência final do recombinante pode ser observada na Figura 9.

Figura 9. Sequência do cDNA da ciclina D3 com os sítios da *NdeI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A sequência referente a cauda de histidina é indicada no início da sequência em verde, o códon de início é mostrado em amarelo e o códon de terminação em azul ciano. Em vermelho é mostrado o sítio de restrição da *NdeI* e em azul, o sítio de restrição da *BamHI*.

```
5'- ..... ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGCCAT
ATG GGC GAC CAG CGT GTC CTG CAG AGC CTG CTC CGC CTG GAG GAG CGC TAC GTA CCG CGC GCC
TCC TAC TTC CAG TGC GTG CAG CGC GAG ATC AAG CCG CAC ATG CGC AAG ATG CTG GCT TAC TGG
ATG CTG GAG GTA TGT GAG GAG CAG CGC TGT GAG GAG GAA GTC TTC CCG CTG GCC ATG AAC TAC
CTG GAT CGC TAC CTG TCT TGC GTC CCG ACC CGC AAG GCG CAG TTG CAG CTC CTG GGT GCG GTC
TGC ATG CTG CTG GCC TCC AAG CTG CGC GAG ACC ACC CCG CTG ACC ATC GAA AAA CTG TGC ATC
TAC ACC GAC CAC GCT GTC TCT CCG CGC CAG TTG CGC GAC TGG GAG GTG CTG GTC CTG GGC AAG
CTC AAG TGG GAC CTG GCT GCT GTG ATT GCA CAT GAT TTC CTG GCC TTC ATT CTG CAC CGC CTC TCT
CTG CCG CGT GAC CGC CAG GCC TTG GTC AAA AAG CAT GCC CAG ACC TTT TTG GCC CTC TGT GCT
ACA GAT TAT ACC TTT GCC ATG TAC CCG CCA TCC ATG ATC GCC ACC GGC AGC ATT GGC GCT GCA
ACT GGC ACT GAA GTG GAC TGC CTG CGC GCC TGT CAG GAG CAG ATC GAA GCT GCA CTC CGC GAG
AGC CTC CGC GAA GCC TCT CAG ACC TGA GGA TCC TTT..... -3'
```

Fonte: Autoria própria

3.1.1.2 Planejamento do clone do gene *CCND3*- Vetor pETSUMO

O sistema de expressão pET-SUMO é composto pela fusão da proteína SUMO (ubiquitina), capaz de produzir níveis mais altos de proteínas fusionadas na fração solúvel em *E. coli*. O efeito de aumento da solubilidade é atribuído à sua estrutura, a qual possui uma superfície hidrofílica e um núcleo hidrofóbico, promovendo um efeito semelhante ao detergente (BUTT et al., 2005).

Para a produção dos primers foram inseridos os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. O programa IDTDNA (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi utilizado para a verificação dos primers considerando suas características quanto à formação de hairpins, temperatura de anelamento e porcentagem de CG.

O primer direto obteve a sequência:

5'- AATGAATTCGGCGACCAGCGTGTCTGC -3' com TM: 64,9 °C e % CG= 57,1;

O primer reverso obteve a sequência:

5'- AATCTCGAGTCAGGTCTGAGAGGCTTCGCGG -3' com TM: 64,9 °C e % CG= 58,1 .

A sequência final do vetor recombinante pETSUMO-Ciclina D3 pode ser observada na Figura 10.

Figura 10. Sequência do cDNA da ciclina D3 em PETSUMO. O códon de início é destacado em amarelo e o códon de terminação destacado em verde. A sequência referente a cauda de histidina é indicada no início da sequência em laranja, a sequência referente a proteína SUMO (roxo claro) e estão destacados os sítios da *EcoRI* (roxo) e *XhoI* (azul).

```
5' - ..... ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCT
AGC ATG TCG GAC TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC AAG CCT GAG ACT
CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC ACT CCT TTA
AGA AGG CTG ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA AGA TTC TTG TAC GAC
GGT ATT AGA ATT CAA GCT GAT CAG ACC CCT GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG GCT
CAC AGA GAA CAG ATT GGT GGA TCC GAA TTC GGC GAC CAG CGT GTC CTG CAG AGC CTG CTC CGC CTG GAG
GAG CGC TAC GTA CCG CGC GCC TCC TAC TTC CAG TGC GTG CAG CGC GAG ATC AAG CCG CAC ATG CGC AAG
ATG CTG GCT TAC TGG ATG CTG GAG GTA TGT GAG GAG CAG CGC TGT GAG GAG GAA GTC TTC CCG CTG GCC
ATG AAC TAC CTG GAT CGC TAC CTG TCT TGC GTC CCG ACC CGC AAG GCG CAG TTG CAG CTC CTG GGT GCG
GTC TGC ATG CTG CTG GCC TCC AAG CTG CGC GAG ACC ACC CCG CTG ACC ATC GAA AAA CTG TGC ATC TAC
ACC GAC CAC GCT GTC TCT CCG CGC CAG TTG CGC GAC TGG GAG GTG CTG GTC CTG GGC AAG CTC AAG TGG
GAC CTG GCT GCT GTG ATT GCA CAT GAT TTC CTG GCC TTC ATT CTG CAC CGC CTC TCT CTG CCG CGT GAC CGC
CAG GCC TTG GTC AAA AAG CAT GCC CAG ACC TTT TTG GCC CTC TGT GCT ACA GAT TAT ACC TTT GCC ATG
TAC CCG CCA TCC ATG ATC GCC ACC GGC AGC ATT GGC GCT GCA GTG CAA GGC CTG GGT GCC TGC TCC ATG
TCC GGC GAT GAG CTC ACA GAG CTG CTG GCA GGC ATC ACT GGC ACT GAA GTG GAC TGC CTG CGC GCC TGT
CAG GAG CAG ATC GAA GCT GCA CTC CGC GAG AGC CTC CGC GAA GCC TCT CAG ACC TGA CTC GAG CCT...3'
```

Fonte: Autoria própria

3.1.2 Amplificação do cDNA da ciclina D3

3.1.2.1 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pET28a

A reação de amplificação do cDNA da ciclina D3 foi realizada pela reação em cadeia

da polimerase (Polymerase Chain Reaction- PCR), após a aquisição dos primers e do cDNA sintetizado pela Thermo Fisher Scientific. Os parâmetros testados estão descritos na tabela 2. Após amplificação, a amostra foi purificada utilizando o kit de extração em gel (GeneJET Gel Extraction Kit) da Thermo Fisher Scientific.

Tabela 2. Condições do PCR utilizadas para amplificação da ciclina D3.

Reagentes	PCR 1 (µL)	PCR 2 (µL)	PCR 3 (µL)	PCR 4 (µL)	PCR 5 (µL)	PCR 6 (µL)
H ₂ O mili Q	33,0	32,0	15,5	15,5	11,0	11,0
HF Phusion Buffer (5x)	10	10	5	-	5	-
CG Phusion Buffer (5x)	-	-	-	5	-	5
dNTPs (10mM)	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (25mM)	-	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
Primer Rv (10µM)	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25
Primer Fw (10µM)	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25
Template DNA (20ng/µL)	0,5	1	1	1	5	5
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25

Fonte: Autoria própria

As condições do termociclador estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Descrição das condições do termociclador para amplificação da ciclina D3.

Programa			
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	98	30 s	1x
Desnaturação	98	10 s	35x
Anelamento	60,0 - 63,8 - 67,3 - 72 - 79,5	30 s	
Extensão	72	30 s	
Extensão final	72	10 min	1x
	4	∞	

Fonte: Autoria própria

3.1.2.2 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pETSUMO

A reação de amplificação do cDNA da ciclina D3 para inserção no vetor pETSUMO foi realizada utilizando o template de cDNA inserido no pET28a. A amplificação ocorreu pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction- PCR) com as mesmas condições do termociclador descrita anteriormente. A temperatura de anelamento utilizada foi de 72°C, e as condições do PCR utilizadas estão descritas na tabela 4. Após amplificação, a amostra também foi purificada utilizando o kit de extração em gel (GeneJET Gel Extraction Kit) da Thermo Fisher Scientific.

Tabela 4. Condições do PCR utilizadas para amplificação da ciclina D3- vetor pETSUMO

Reagentes	PCR (µL)
H ₂ O mili Q	31,75
HF Phusion Buffer (5x)	10
dNTPs (10mM)	1
MgCl ₂ (25mM)	0,5
Primer Rv (10µM)	2,5
Primer Fw (10µM)	2,5
Template DNA pET28a (94,9 ng/µL)	1.5
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	0,5

Fonte: Autoria própria

3.1.3 Hidrólise usando enzimas de restrição específica e Reação de ligação

3.1.3.1 Inseto cDNA- ciclina D3 – vetor pET28a

A reação de hidrólise e ligação do inserto e do vetor pET-28a foram realizadas concomitantemente e sem a purificação usual, devido a baixa concentração obtida de cDNA após a amplificação. As reações foram planejadas a partir da proporção molar 10:1 (inserto: vetor) na presença do tampão 2x Tango, no qual as enzimas de restrição utilizadas (*NdeI* e *BamHI*) possuem 50-100% de atividade. A reação de digestão foi realizada por 1 hora e meia a 37°C, seguida de 20 minutos a 80°C. A reação de ligação foi realizada por 16 horas a 16°C.

Os protocolos de digestão e ligação estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Protocolo da reação de digestão do inserto e do vetor (volume da reação 50 μ L).

Amostra	Quantidade (μ L)	Concentração
Vetor (pET28a)	1,17uL	126,78 ng/uL
Inserto (cDNA- ciclina D3)	30uL	7,95 ng/uL
Enzima <i>NdeI</i>	1uL	10000U/mL
Enzima <i>BamHI</i>	1uL	20000U/mL
Tampão 2X Tango	10uL	-
H ₂ O	6,83uL	-

Fonte: Autoria própria

Tabela 6. Protocolo da reação de ligação do inserto-vetor (volume da reação 70 μ L).

Amostra	Volume utilizado
Produto da digestão	50uL
Enzima T4 DNA ligase (1 U/uL)	3,5uL
Tampão de ligação da Enzima DNA T4 ligase	7uL
ATP (10mM)	7uL
H ₂ O	2,5uL

Fonte: Autoria própria

3.1.3.2 Inserto cDNA- ciclina D3 – vetor pETSUMO

A reação de hidrólise do inserto e do vetor pETSUMO foram realizadas separadamente. Os protocolos da reação de digestão do inserto estão apresentados na Tabela 7 e do vetor na Tabela 8.

Tabela 7. Protocolo da reação de digestão do inserto (volume da reação 25 μ L).

Amostra	Quantidade (μ L)	Concentração
Vetor (pETSUMO)	2 uL	177 ng/uL
Enzima <i>EcoRI</i>	1uL	10000U/mL
Enzima <i>XhoI</i>	1uL	10000U/mL
Tampão 10x Buffer O	2,5 uL	1X
H ₂ O	18,5 uL	-

Fonte: Autoria própria

Tabela 8. Protocolo da reação de digestão do vetor (volume da reação 25 μ L).

Amostra	Quantidade (μ L)	Concentração
Inserto (cDNA- ciclina D3)	2 uL	186 ng/uL
Enzima <i>EcoRI</i>	1uL	10000U/mL
Enzima <i>XhoI</i>	1uL	10000U/mL

Tampão 10x Buffer O	2,5 uL	1X
H ₂ O	18,5 uL	-

Fonte: Autoria própria

A reação de digestão foi realizada por 1 hora e meia a 37°C, seguida de 20 minutos a 80°C. A concentração do vetor pETSUMO após a reação de digestão foi de 15 ng/uL, e a concentração do inserto cDNA-ciclina D3 após a reação de digestão foi de 30 ng/uL.

A reação de ligação foi planejada a partir da proporção molar 10:1 (inserto: vetor) e realizada por 16 horas a 16°C. O protocolo da reação de ligação está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Protocolo da reação de ligação do inserto-vetor (volume da reação 70 µL).

Amostra	Volume utilizado
(cDNA- ciclina D3)	10uL
Vetor (pETSUMO)	15uL
Enzima T4 DNA ligase (1 U/uL)	3,5uL
Tampão de ligação da Enzima DNA T4 ligase	7uL
ATP (10mM)	7uL
H ₂ O	27,5uL

Fonte: Autoria própria

3.1.4 Transformação do produto de ligação em cepas de *E. coli*

A quantidade de 20 µL referente ao produto de ligação cDNA- ciclina D3/pET28a foi adicionado à 100 µL da alíquota de células DH5α competentes. Para o produto de ligação cDNA- ciclina D3/pETSMO a mesma quantia de 20 µL foi utilizada porém utilizando 100 µL de células One Shot competentes.

A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico (42°C por 2 minutos, seguido de 3 minutos em gelo). Após o choque, foram adicionados à amostra 500µL de meio Luria-Bertani- (LB) líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl), e a mistura foi mantida em agitação a 37°C, 200 rpm por uma hora.

Após o período de agitação para o crescimento de cada inóculo, a mistura foi aplicada em placa de Petri contendo 20 mL de meio sólido LB-ágar, acrescentado de 30 µg/mL do antibiótico canamicina e incubada em estufa a 37°C overnight.

3.1.5 PCR de colônia

Para confirmar a inserção do DNA nas construções de plasmídeo, foi realizado o

método do PCR de colônia. Da placa obtida da transformação do produto de ligação em cepas de *E. coli*, foram selecionadas algumas colônias as quais foram solubilizadas em 15 µL de água Milli Q autoclavada e incubadas por 95°C durante 20 minutos. Posteriormente, para o conteúdo de cada colônia obtida foram adicionados os reagentes, conforme indicado na tabela 10.

Tabela 10. Protocolo da reação de PCR de colônia (volume da reação 10 µL).

Reagentes	Volume utilizado
H ₂ O	4uL
Taq Buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ .MgCl ₂ (10x)	1uL
dNTPs (10mM)	0,4uL
Primer Fw da ciclina D3 (10uM)- referente aos respectivos vetores	0,4uL
Primer Rv da ciclina D3 (10uM)- referente aos respectivos vetores	0,4uL
Template DNA	3uL
MgCl ₂ (25mM)	0,7uL
Taq Polimerase	0,1uL

Fonte: Autoria própria

O produto da reação de PCR foi analisado posteriormente por eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmação da presença do possível recombinante pET28a::cicD3 e pETSUMO::cicD3.

3.1.6 Sequenciamento

Após confirmação da presença do recombinante pET28a::cicD3 nas colônias de DH5α, e do recombinante pETSUMO::cicD3 nas colônias de One Shot foram realizados o pré-inoculo referente à cada recombinante em 5 mL de meio LB crescido overnight a 37°C. No dia seguinte, cada plasmídeo recombinante foi isolado e purificado das células bacterianas pelo Kit Miniprep (Thermo Scientific).

Amostras referentes à cada plasmídeo recombinante foram submetidas ao sequenciamento utilizando os primers T7 promoter e T7 terminator no sequenciador 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), utilizando o método de Sanger automatizado.

3.2 Ensaio de Expressão e Purificação da Ciclina D3

3.2.1.1 Indução da expressão da proteína recombinante pET28a::cicD3

A expressão da proteína ciclina D3 foi realizada a partir da transformação do recombinante pET28a::cicD3 em células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pG-KJE8 e BL21(DE3). Para a linhagem BL21(DE3)pG-KJE8, as colônias foram selecionadas a partir das placas contendo meio LB na presença de antibiótico canamicina (30 µg/mL) e clorofenicol (34 µg/mL); enquanto para a linhagem BL21(DE3) as colônias foram selecionadas em placas adicionadas contendo meio LB e antibiótico canamicina (30 µg/mL).

Após a seleção de colônias, estas foram transferidas para meio líquido contendo os mesmos antibióticos, e a cultura foi conduzida a 37°C, a 180 rpm, até a densidade óptica a 600 nm atingir a absorvância entre 0,4 a 0,6. Neste ponto, a expressão foi induzida pela adição de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) 0,1 mM, e mantida a diferentes temperaturas (37°C, 20°C e 16°C) a 250 rpms, entre 5 e 72 horas.

3.2.1.2 Indução da expressão da proteína recombinante pETSUMO::cicD3

A expressão da proteína ciclina D3 foi realizada a partir da transformação do recombinante pETSUMO::cicD3 em células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). As colônias foram selecionadas a partir das placas contendo meio LB na presença de antibiótico canamicina (30 µg/mL).

Após a seleção de colônias, estas foram transferidas para meio líquido contendo o mesmo antibiótico, e a cultura foi conduzida a 37°C, a 180 rpm, até a densidade óptica a 600 nm atingir a absorvância entre 0,4 a 0,6. Neste ponto, a expressão foi induzida pela adição de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) 0,1 mM, e mantida a diferentes temperaturas (37°C, 20°C e 12°C) a 250 rpms, entre 5 e 72 horas.

3.2.2.1 Lise das células contendo o recombinante pET28a::cicD3

Após cada período estabelecido de expressão, as células foram centrifugadas e ressuspendidas na proporção de 1 grama de sedimento bacteriano para 5 mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase), as quais foram mantidas em banho de gelo por 30 min e sonicadas (10 pulsos de 20 segundos cada, com amplitude de 20%) no equipamento Branson Sonifier S250A (Soni-Tech Ultrasonic Systems). O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 11.100 rpm a 4°C, obtendo-se frações solúveis e insolúveis (corpos de inclusão) da expressão em sistema bacteriano.

3.2.2.2 Lise das células contendo o recombinante pETSUMO::cicD3

Após cada período estabelecido de expressão, as células foram centrifugadas e ressuspensas na proporção de 1 grama de sedimento bacteriano para 5 mL de tampão de lise. Dois tipos de tampões foram testados, o primeiro, composto: (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase); e o segundo composto: (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase). As soluções foram mantidas em banho de gelo por 30 min e sonicadas (10 pulsos de 20 segundos cada, com amplitude de 20%) no equipamento Branson Sonifier S250A (Soni-Tech Ultrasonic Systems). O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 19.000 rpm a 4°C, obtendo-se frações solúveis e insolúveis (corpos de inclusão) da expressão em sistema bacteriano.

3.2.3 Ensaio de solubilização dos corpos de inclusão a partir de protocolo de reenovelamento

Para a expressão da proteína a partir do recombinante pET28a::cicD3 foi realizada na linhagem BL21(DE3), e ensaios de solubilização dos corpos de inclusão foram realizados a partir do protocolo de reenovelamento de HE e OHNISHI (HE e OHNISHI, 2017).

A fração insolúvel obtida após centrifugação da lise das células foi submetido à processos de lavagens (20mM Tris Base, pH= 7,4) seguidos de centrifugação a 4°C a 11.100rpm por 10 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspensado em tampão (50mM de Tris-HCl, 300mM de NaCl, 5mM de imidazol, 2% de SDS, 10mM de β-mercaptoetanol e pH=7,4) e mantido em agitação overnight. No dia seguinte, a amostra foi sonicada (5 pulsos de 30 segundos com intervalos de 59,9, com amplitude de 20%), armazenada a 4°C por 20 minutos, e centrifugada em seguida por 10 minutos, 11.100rpm e 4°C, obtendo-se a proteína na fração solúvel.

3.2.4.1 Purificação da proteína obtida a partir do recombinante pET28a::cicD3

A purificação da proteína ciclina D3 foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, o *Akta Purifier* (GE).

As proteínas obtidas a partir da expressão na linhagem BL21(DE3)pG-KJE8 foram purificadas utilizando o método da cromatografia de afinidade ao níquel (coluna HisTrapTM FF com Ni²⁺ imobilizado) e de exclusão de tamanho (coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg). Para a coluna de afinidade, foi utilizado o tampão de ligação (20mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 5mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4), e o tampão de eluição, o qual possui a mesma composição do tampão de ligação, com a adição de 300mM de imidazol, ao invés de

5mM. Para a coluna de exclusão de tamanho, o tampão utilizado foi de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl e 10% de glicerol.

Para as proteínas obtidas a partir da expressão na linhagem BL21(DE3), a purificação ocorreu somente pela cromatografia de afinidade, utilizando o tampão de ligação (50mM de Tris-HCl, 300mM de NaCl, 5mM de imidazol, 10% de glicerol, 10mM de β -mercaptoetanol e pH=7,4), enquanto o tampão de eluição possuía a mesma composição do tampão de ligação, com a adição de 500mM de imidazol, ao invés de 5mM. O volume utilizado no gradiente foi de 94 mL e o fluxo utilizado de 1 mL / min. As frações de 1 mL obtidas foram analisadas em gel de poliacrilamida a 15%.

3.2.4.2 Purificação da proteína obtida a partir do recombinante pETSUMO::cicD3

A purificação da proteína ciclina D3 foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, o *Akta Purifier* (GE), como também pelo uso de colunas gravitacional (resina HisPurTM NI-NTA).

As proteínas obtidas a partir da expressão da linhagem BL21(DE3) foram purificadas utilizando o método da cromatografia de afinidade ao níquel (coluna HisTrapTM FF com Ni²⁺ imobilizado), ou coluna gravitacional (resina HisPurTM NI-NTA) seguida da exclusão de tamanho (coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg), como também de duas etapas de purificação sucessivas utilizando somente a cromatografia de afinidade ao níquel.

Para a coluna de afinidade, foram testados duas composições de tampões de ligação e eluição. Na primeira composição, foi utilizado o tampão de ligação (50mM de TrisHCl, 500mM de NaCl, 20mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4), e o tampão de eluição (50mM de TrisHCl, 300mM de NaCl, 300mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4). Na segunda composição, foi utilizado o tampão de ligação (50mM de NaH₂PO₄, 500mM de NaCl, 20mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4), e o tampão de eluição (50mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 300mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4).

Para a coluna de exclusão de tamanho, o tampão utilizado foi de 50mM de NaH₂PO₄, 100mM de NaCl e 10% de glicerol, pH=7,4.

Entre a primeira e a segunda etapa de purificação, independente do tipo, foi realizada a clivagem da proteína SUMO fusionada à proteína Ciclina D3. O eluato da primeira etapa de purificação foi concentrado até aproximadamente 8 mg mL⁻¹ utilizando-se o dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra 30K da MerckTM Millipore®.

Após a etapa de concentração, procedeu-se com a reação de clivagem da proteína para posterior isolamento da proteína Ciclina D3. O protocolo foi determinado com base nos

manuais de uso da Merck™ Sigma-Aldrich® SUMO Protease, da Thermo Fisher Scientific Inc. Invitrogen™ SUMO Protease e da CoolCutter™ SUMO Protease. A reação foi realizada utilizando-se 2,5 U de SUMO protease da Merck™ Sigma-Aldrich® para cada 1 mg de proteína His-SUMO-CicD3 na presença de 10 mmol L⁻¹ de ditioneitol (DTT), a qual foi incubada a 16 °C por 16h. Após o tempo de incubação, o produto da reação foi submetido a segunda etapa de purificação.

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O padrão proteico (frações solúveis e insolúveis) foi avaliado pela análise do gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). O marcador de massa molecular utilizado foi o *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

Em cada amostra foi adicionado tampão de amostra não redutor na proporção de 1:1 (v/v), e aquecidas durante 5 minutos a 95°C, imediatamente antes da aplicação em cada raia do gel. A voltagem utilizada na eletroforese foi de 90V até entrada no gel de empilhamento, e conduzida a 120V após entrada no gel de resolução. Após a eletroforese, os géis foram impregnados com o corante *Coomassie Brilliant Blue R* (BioRad) e em seguida foram descorados para análise das bandas obtidas.

3.2.6 Diálise e determinação da pureza e concentração da proteína

A pureza da proteína foi determinada pelo programa Image J, a partir da imagem obtida pelo gel de SDS-PAGE redutor e também pelo gel nativo, o qual não possui em sua composição, e na do tampão de amostra, SDS (desnaturante) e β-mercaptoetanol (reductor).

As amostras que possuíam pureza acima de 95% foram submetidas à diálise em tampão de 20mM de Tris-HCl, 50mM de NaCl, 5% de glicerol, 10mM de β-mercaptoetanol e pH=7,4.

Após a diálise, a concentração da proteína foi determinada por um espectrofotômetro utilizando absorvância de 280 nm e coeficiente de extinção molar específico, pela substituição na equação de Lambert-Beer. Para a proteína ciclina D3 expressa pelo recombinante pET28a::cicD3 a cauda de histidina se manteve, e os valores substituídos na equação citada foram o da massa molecular de 31,6 kDa e do coeficiente de extinção molar de 28420 M⁻¹ cm⁻¹. Para a proteína ciclina D3 expressa pelo recombinante pETSUMO::cicD3 a cauda de histidina foi removida com a clivagem da proteína SUMO, e os valores substituídos na equação citada foram o da massa molecular de 27,4 kDa e do coeficiente de extinção molar de 28420 M⁻¹ cm⁻¹.

3.3 Ensaios de Caracterização Estrutural da Ciclina D3

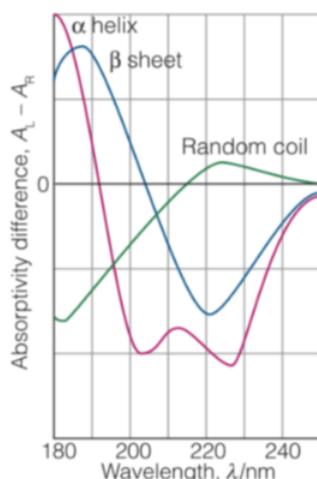
3.3.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia CD é uma ferramenta biofísica bem estabelecida para a caracterização estrutural de biopolímeros, como proteínas e ácidos nucleicos. A base física da técnica é a absorção diferencial de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, e devido ao fato das proteínas serem constituídas de resíduos de aminoácidos que possuem carbonos quirais ($C\alpha$) com essa técnica é possível prever o percentual de estruturas secundárias características de uma determinada proteína (MILES e WALLACE, 2016).

A técnica inclui várias vantagens como a capacidade de explorar uma ampla variedade de condições e temperaturas da solução, a rápida coleta de dados e o consumo de quantidades relativamente pequenas de material da amostra (MILES e WALLACE, 2016), além de poder prever o percentual de estruturas secundárias das proteínas (ATKINS e PAULA, 2011).

Para estimar o conteúdo de frações de estruturas secundárias são utilizados programas computacionais como CDNN Deconvolution®, os quais utilizam dos métodos de desconvolução, permitindo obter as porcentagens de hélice- α e folha- β (ATKINS e PAULA, 2011).

Figura 11. Exemplos de espectros associados à diferentes tipos de estruturas.



Fonte: ATKINS e PAULA, 2011.

Os experimentos do presente estudo foram realizados no espectrômetro Jasco J-815 da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

A amostra foi preparada pela diluição da proteína em tampão 20mM de Tris-HCl, 50mM de NaCl, 5% de glicerol, 10mM de β -mercaptoetanol e pH=7,4 (concentração final em

torno de 4 μM) seguida de centrifugação a 11.100rpm, a 4°C por 10 minutos. Espectros de CD foram obtidos utilizando comprimento de onda UV/visível (260-185 nm), com data pitch de 0,5nm, scanning speed de 100nm/min, D.I.T de 0.5 sec, band with de 1.00nm.

Os espectros respectivos do branco correspondentes a cada medida foram gerados utilizando o mesmo procedimento sem a proteína, os quais foram então subtraídos no tratamento dos dados. Para o branco foram feitas 10 acumulações e para a amostra 20 acumulações.

3.3.1.1. Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3.

Para determinação do percentual de estrutura secundária, o experimento foi conduzido como descrito acima em temperatura de 20 °C. Os dados obtidos foram transformados em elipticidade molar através da equação 1:

$$\theta_m = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot l \cdot n} \quad (1)$$

Em que θ_m representa elipticidade² molar em (grau.cm²)/dmol, θ a elipticidade em graus, MW a massa molecular da proteína em KDa, c a concentração em mg/mL, l o caminho óptico da cubeta em cm, e n o número de resíduos de aminoácidos da proteína analisada, os quais foram posteriormente avaliados utilizando o programa CDNN Deconvolution®.

3.3.1.2. Determinação da influência da concentração no percentual de estrutura secundária da ciclina D3.

A fim de avaliar a influência da concentração da amostra no percentual de estruturas secundárias da proteína, diferentes concentrações (4 μM , 6 μM e 8 μM) foram testadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.3.1.3. Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência do tempo.

A estrutura secundária da ciclina D3 foi avaliada nas mesmas condições propostas acima, verificando a influência do período de armazenamento da proteína a 4°C por períodos de 7, 14 e 21 dias.

3.3.1.4. Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura.

Para determinar a temperatura em que metade da Ciclina D3 perde sua estrutura secundária, foram realizados ensaios variando a temperatura na faixa de 20°C para 90°C, através de incrementos de 1°C, com comprimento fixo a 208 nm. Os dados foram tratados com o Adaptador de Boltzmann usando o programa Origin2019.

Para avaliar a estabilidade térmica da estrutura secundária foram realizados ensaios através de incrementos de 5°C, na faixa de 20°C - 90°C, no intervalo de 195 nm a 208 nm.

3.3.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas na área biomédica para determinar a energia absorvida e emitida por diversas moléculas, sendo considerada uma técnica de alta sensibilidade e rápida análise (BOTTIROLI e CROCE, 2004).

A dissipação do excesso de energia de uma molécula eletronicamente excitada é capaz de promover o decaimento de um elétron para um orbital de menor energia e promover a geração de um fóton, o qual permite a amostra brilhar, caso a radiação emitida esteja no espectro visível (ATKINS e PAULA, 2011).

As características fluorescentes das substâncias dependem da concentração e distribuição dos fluoróforos presente, como também das propriedades ópticas do solvente em que as moléculas estão dissolvidas (BOTTIROLI e CROCE, 2004). Os fluoróforos são representados por moléculas aromáticas, apresentando fluorescência típica (RAMANUJAM, 2000).

Diversas moléculas biológicas apresentam fluoróforos endógenos, sendo essa característica representada pelos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Uma caracterização estrutural da proteína pode ser realizada a partir do monitoramento de alterações da posição do máximo de emissão de fluorescência (λ_{max}) da proteína (LAKOWICZ, 2006).

Os aminoácidos aromáticos são sensíveis ao ambiente externo. As proteínas enoveladas, que apresentam esses aminoácidos interiorizados, apresentam tipicamente λ_{max} em torno de 330nm; enquanto proteínas desenoveladas, apresentam esses aminoácidos expostos ao solvente, com λ_{max} em torno de 350nm. Dessa forma, a variação de λ_{max} , permite utilizar essa técnica para avaliar o desenovelamento de proteínas (LAKOWICZ, 2006).

3.3.2.1. Avaliação da estabilidade química na presença de ureia e guanidina

Os experimentos de estabilidade na presença da ureia foram realizados no espectrofluorímetro Shimadzu (RF-5301) da CAQI-IQSC, utilizando os parâmetros EX wavelength 295nm, EM wavelength range: 305-420nm, Sensivity: High, Scanning speed: medium, Sampling interval: 1.0, slit width (nm) EX:3 EM 5, response time (sec): auto.

Para o estudo da estabilidade química foi utilizado 2 μ M da ciclina D3, preparada em tampão 20mM de Tris-HCl, 50mM de NaCl, 5% de glicerol e pH=7,4 em diferentes concentrações de ureia e guanidina (0 à 8M), as quais foram incubadas por 4 horas e 2 horas, respectivamente. Em seguida as amostras foram submetidas à análise por espectroscopia de emissão de fluorescência.

Os espectros respectivos do branco correspondentes a cada medida foram gerados utilizando o mesmo procedimento sem a proteína, os quais foram então subtraídos no tratamento dos dados.

3.4 Ensaios de Interação CDK11^{p58}- ciclina D3

A literatura têm relatado diversos estudos envolvendo o complexo CDK11^{p58}- ciclina D3. Zhang et al. (ZHANG et. al., 2005) identificaram o complexo CDK11^{p58}- ciclina D3 como o responsável em controlar a progressão do ciclo celular na fase G2/M.

Duan et al. (DUAN et. al., 2010) verificaram que a ciclina D3 interage com a CDK11^{p58} na região nuclear e reprimem a proliferação de células de Schwann, como também são capazes de induzir a apoptose celular. O complexo CDK11^{p58}- ciclina D3 também já foi descrito sendo capaz de inibir a atividade do receptor de andrógeno por meio da fosforilação (ZONG et. al., 2007).

Como visto anteriormente, a proteína ciclina D3 possui estrutura cristalográfica depositada no PDB complexada com a CDK4. Com o intuito de realizar estudos estruturais do complexo CDK11^{p58}- ciclina D3 e ensaios de cristalização desse novo complexo foram realizados alguns ensaios de interação das duas proteínas.

3.4.1 Análises de bioinformática

3.4.1.1 Modelagem de regiões de loop

Apesar da estrutura cristalográfica do complexo CDK4/ciclina D3 estar depositada no banco de dados de proteínas - PDB, (código: 3G33) a estrutura da proteína ciclina D3 possui regiões não determinadas pela difração de raios X, o que dificulta a docagem proteína-proteína. Para obtermos uma estrutura completa da proteína ciclina D3, foi realizada uma

modelagem molecular pelo programa Modeller, versão 9.21. A modelagem foi feita usando a opção modelo simples. A estrutura cristalina utilizada foi a CDK4/ Ciclina D3 (código: 3G33), a qual apresenta 100% de identidade sequencial. Um total de 100 modelos foram construídos, sendo o melhor selecionado de acordo com a pontuação do Modeller Discrete Optimized Protein Energy (DOPE).

O modelo escolhido foi avaliado pelo programa SAVES 5.0, em que inicialmente foi utilizado o software PROCHECK, que verifica a qualidade estereoquímica de uma estrutura proteica, analisando sua geometria geral e resíduo por resíduo com base no gráfico de Ramachandran. Em seguida, os demais programas do SAVES, como VERIFY, ERRAT, PROVE e WHATCHECK foram utilizados para a validação do modelo escolhido.

3.4.1.2 Docagem proteína-proteína

A partir do programa online HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing), o qual permite a modelagem de complexos bimoleculares, incluindo complexos proteína-proteína, ácidos nucléicos-proteínas e complexos proteína-ligante, foi realizada a docagem do complexo CDK11 Δ - ciclina D3.

3.4.2 Ensaio *in vitro*

3.4.2.1 Co-expressão heteróloga das proteínas recombinantes

A co-expressão das proteínas foi realizada com construções contendo o mesmo vetor: pET28a::cicD3 e pET28a::CDK11. Em torno de 100ng/ μ L de cada construção foram transformadas por choque térmico na mesma célula *E. coli* BL21(DE3) seguindo o protocolo de transformação descrito no item 3.1.4 com alteração apenas no tempo mantido em gelo, antes do choque térmico, de 1 hora.

As proteínas foram co-expressas por 5 horas- 37°C, 24 horas- 20°C e 72 horas- 12°C em 250 rpm, após indução de 0,2 μ M de IPTG. As etapas de lise, reenovelamento e análise em gel SDS-PAGE, foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.2.2.1; 3.2.3 e 3.2.5, respectivamente.

3.4.2.2 Teste de Cross-link das proteínas expressas separadamente

A técnica de cross-link representa um método direto de identificação das interações transitórias e estáveis. A técnica envolve a formação de ligações covalentes entre duas proteínas, usando reagentes bifuncionais contendo grupos terminais reativos que reagem com grupos funcionais, como aminas primárias e sulfidrilos, de resíduos de aminoácidos. Se duas

proteínas interagem fisicamente *in vivo*, elas podem interagir covalentemente *in vitro* por cross-link (KAPOOR, 1996).

Diversos agentes de cross-link são utilizados, entre eles: glutaraldeído, formaldeído, adipimidato de dimetil, suberimidato de dimetil, entre outros. Para o presente estudo, foi utilizado o protocolo descrito por Moharana et. al. (MOHARANA et. al., 2014). As condições utilizadas foram de 10 μ M de proteínas obtidas através do protocolo de reenovelamento, as quais foram incubadas por 30 horas a 20°C, seguidas da adição de 1% de formaldeído. Após a adição do formaldeído, foram avaliados períodos diferentes de incubação (5 min, 15 min, 30 min, 1 hora e 3 horas). Todas as amostras foram avaliadas em gel SDS-PAGE como descrito no item 3.2.5.

3.4.2.3 Teste de incubação das proteínas expressas separadamente sem cross-link

Diferentes parâmetros de incubação do complexo CDK11 Δ - ciclina D3 (proteínas obtidas pelo protocolo de reenovelamento) foram testados baseados em diversos artigos literários (JEFFREY et. al., 1995; PEVARELLO et. al., 2004; AYZAZ et. al., 2016; HONDA et. al., 2005; JEFFREY et. al., 2000; DESAI et. al., 1995; WOOD et. al., 2019).

A concentração de 1:5 de CDK11 para ciclina D3 foi estabelecida. A incubação das proteínas ocorreu em diferentes tampões, nos quais foram testado 3 diferentes tipos de temperatura (0°C, 4°C e 30°C). Os tampões utilizados estão descritos abaixo:

1° Tampão: (40mM Hepes; 200mM NaCl; 5mM DTT, pH: 7,0).

2° Tampão: (40mM Hepes; 1M NaCl; 5mM DTT, pH: 7,0).

3° Tampão: (40mM Hepes; 200mM NaCl; 5mM DTT, 1mM EDTA, pH: 7,0).

4° Tampão: (40mM Hepes; 1M NaCl; 5mM DTT, 1mM EDTA, pH: 7,0).

3.4.2.4 Teste de identificação de atividade quinase (CDK11 Δ - ciclina D3)

As proteínas quinases regulam muitos mecanismos biológicos críticos, incluindo metabolismo e crescimento celular, proliferação e diferenciação. Aberrações na atividade das quinases envolvidas na transdução de sinal têm sido associadas a muitas doenças humanas. Como visto anteriormente, as CDKs representam a subunidade catalítica, enquanto as ciclinas são a subunidade reguladora, ou seja, parte indispensável para a atividade das CDKs (MOIOLA et. al., 2010). Para o complexo heterodimérico CDK-ciclina estar totalmente ativo, é necessário além da presença das duas proteínas, a fosforilação da alça T no sitio ativo da proteína CDK.

Os ensaios de quinase Z'-LYTETM são ensaios não radioativos para triagem de

inibidores de muitos membros das famílias de proteína quinase de tirosina e serina/treonina (Z'-LYTE Kinase Assay Kits, Thermo). Esses ensaios robustos, à temperatura ambiente e homogêneos usam transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) entre cumarina e fluoresceína para detecção. O ensaio bioquímico Z'-LYTE™ emprega um formato de enzima acoplada baseado em FRET e é baseado na sensibilidade diferencial de peptídeos fosforilados e não fosforilados à clivagem proteolítica. O ensaio usa um substrato peptídico sintético (o substrato peptídico Z'-LYTE™) que é marcado com um fluoróforo doador (cumarina) e um fluoróforo aceitador (fluoresceína) que formam um par FRET. Na reação primária (a reação da quinase), a quinase transfere o γ -fosfato do ATP para um único resíduo de tirosina, serina ou treonina no substrato, enquanto a presença de um inibidor de quinase na reação primária suprime a fosforilação.

Na reação secundária (a reação de desenvolvimento), uma protease específica do local (o reagente de desenvolvimento) é adicionada em uma concentração otimizada. O tampão de desenvolvimento extingue a Reação da Quinase, enquanto a protease reconhece e cliva o Substrato Peptídico Z'-LYTE™ não fosforilado a uma taxa substancialmente mais alta do que o substrato fosforilado. A clivagem interrompe o FRET entre os fluoróforos doadores e aceitadores no substrato não fosforilado, enquanto o substrato fosforilado não clivado mantém o FRET.

A utilização adaptada deste kit foi realizada para demonstrar a atividade da proteína CDK11 na ausência e presença da proteína ciclina D3. Para isto, diferentes parâmetros de incubação foram testados, como descrito abaixo:

1º Ensaio de atividade CDK11 e ciclina D3 (obtidas pelo processo de renovelamento)

- a. Ausência de ambas proteínas;
- b. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μ M e ausência da proteína ciclina D3;
- c. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μ M e da proteína ciclina D3 na concentração de 7,1 μ M;
- d. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μ M e da proteína ciclina D3 na concentração de 14,21 μ M;
- e. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μ M e da proteína ciclina D3 na concentração de 28,42 μ M;
- f. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μ M e da proteína

ciclina D3 na concentração de 56,84 μM ;

2° Ensaio de atividade CDK11 e ciclina D3 (CDK11 obtida pelo processo de renovelamento e Ciclina D3 de forma nativa- solúvel)

- g. Ausência de ambas proteínas;
- h. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μM e ausência da proteína ciclina D3;
- i. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μM e da proteína ciclina D3 na concentração de 7,1 μM ;
- j. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μM e da proteína ciclina D3 na concentração de 12,21 μM ;
- k. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μM e da proteína ciclina D3 na concentração de 28,42 μM ;
- l. Presença da proteína CDK11 na concentração de 3,6 μM e da proteína ciclina D3 na concentração de 56,84 μM ;

O progresso da reação é quantificado pelo cálculo da taxa de emissão. A leitura das placas foi feita utilizando um leitor de placas de fluorescência (espectrofluorômetro Spectramax Gemini EM (Molecular devices, San Jose, CA, EUA) do Grupo de Cristalografia do IFSC-USP, com $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ e 520 nm (para cumarina e fluoresceína, respectivamente), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a cada 30 segundos por 15 minutos.

Todos os dados foram analisados de acordo com as instruções do fabricante. Os dados de emissão coletados em 445 nm e 520 nm foram usados para calcular a razão de emissão (445/520). Esses dados foram então usados para calcular a porcentagem de fosforilação de acordo com a equação:

$$\% \text{ Fosforilação} = \left(1 - \frac{(ratio \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_0\% - C_{100\%}) + (ratio \times (F_{100\%} - C_0\%))} \right) \times 100 \quad (2)$$

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem do Gene *CCND3*

4.1.1.1 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pET28a

A reação de amplificação do cDNA da ciclina D3 no vetor pET28a foi estabelecida pela condição do PCR 2, da Tabela 2. As condições do termociclador do PCR para amplificação da ciclina D3 foram realizadas de acordo com a Tabela 3, sendo a temperatura de 72°C escolhida para a etapa de anelamento.

O produto de PCR obtido foi purificado a partir do gel de agarose 0,8% por meio do GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) e apresentou uma concentração de 7,95ng/μL.

As etapas de hidrólise, reação de ligação e transformação em cepas de *E. coli* foram realizados conforme descrito nos itens 3.1.3.1 e 3.1.4.

4.1.1.2 Amplificação do cDNA da ciclina D3- Vetor pETSUMO

A reação de amplificação do cDNA da ciclina D3 no vetor pETSUMO foi estabelecida com base nos resultados obtidos para o vetor pET28a. As condições do PCR utilizado estão descritas na Tabela 4, e as condições do termociclador (Tabela 3) foram mantidas as mesmas, utilizando a mesma temperatura de anelamento de 72°C.

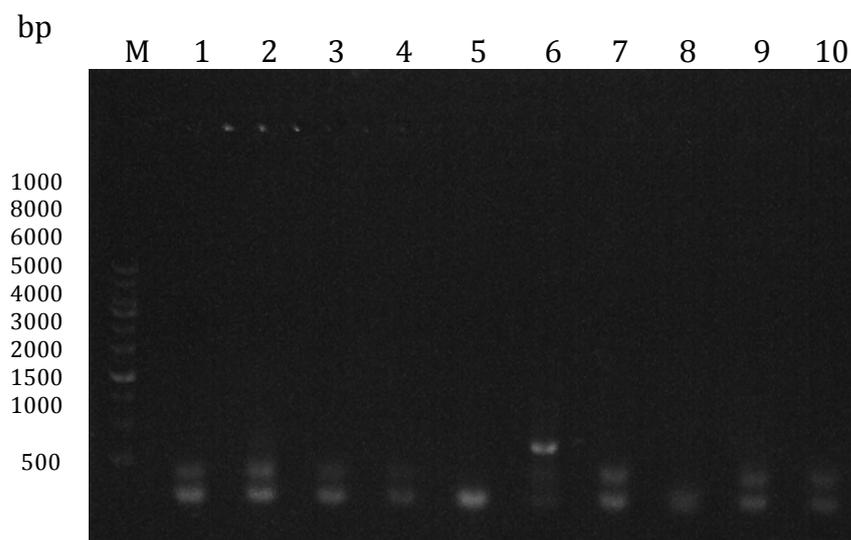
As etapas de hidrólise, reação de ligação e transformação em cepas de *E. coli* foram realizados conforme descrito nos itens 3.1.3.2 e 3.1.4.

4.1.2 PCR de colônia

A transformação do produto de ligação em cepas de *E. coli* DH5α resultou em uma placa com 11 colônias. Cada colônia foi diluída em 15μL de água milliQ autoclavada e incubada por 95°C durante 20 minutos. Em seguida, para o conteúdo de cada colônia obtida foram adicionados os reagentes, conforme indicado na tabela 10.

A figura 12 representa os produtos da amplificação a partir do vetor transformante em gel de agarose 0,8%.

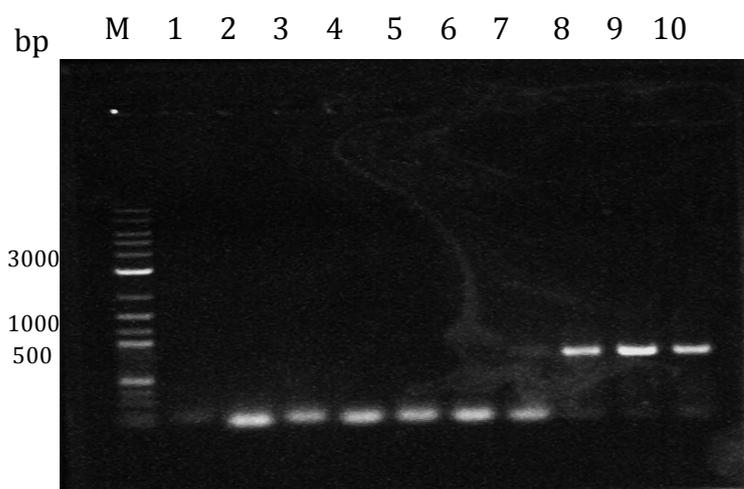
Figura 12. Gel de agarose dos produtos do PCR de colônia realizado a partir de células DH5 α obtidas na propagação do transformante. Na canaleta 6, é possível observar o produto de PCR com 738 pb, referente ao tamanho do DNA codante da ciclina D3.



Fonte: Autoria própria

A transformação do produto de ligação em cepas de *E. coli* One Shot resultou em uma placa com 40 colônias. Para 10 colônias escolhidas, foi realizado o mesmo procedimento e os produtos da amplificação a partir do vetor transformante (Vetor pETSUMO) foram aplicados em gel de agarose 0,8% conforme representado na figura 13.

Figura 13. Gel de agarose dos produtos do PCR de colônia realizado a partir de células One Shot obtidas na propagação do transformante. Na canaleta 8, 9 e 10 é possível observar o produto de PCR com 738 pb, referente ao tamanho do DNA codante da ciclina D3.



Fonte: Autoria própria

4.1.3 Sequenciamento

As amostras foram submetidas ao sequenciamento utilizando os primers T7 promoter e T7 terminator no sequenciador 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) utilizando o método de Sanger automatizado. A Figura 14 mostra o alinhamento de seqüências obtido a partir da análise do produto sequenciado com a seqüência da ciclina D3 (GenBank: BG625131.1) oriunda da amplificação utilizando o vetor pET28a e a Figura 15 mostra o alinhamento de seqüências obtido a partir da análise do produto sequenciado com a seqüência da ciclina D3 (GenBank: BG625131.1) oriunda da amplificação utilizando o vetor pETSUMO.

Figura 14. Análise do sequenciamento pelo programa Multalin Analysis. Em vermelho, de ATG a TGA, os códons de iniciação e terminação do DNA codante da ciclina D3, respectivamente. Na linha “direto” refere-se ao amplificado utilizando o primer T7 promoter, e na linha “reverso” refere-se ao amplificado a partir do primer T7 terminator. Em azul está parte do vetor pET28a, flanqueado pelos primers.

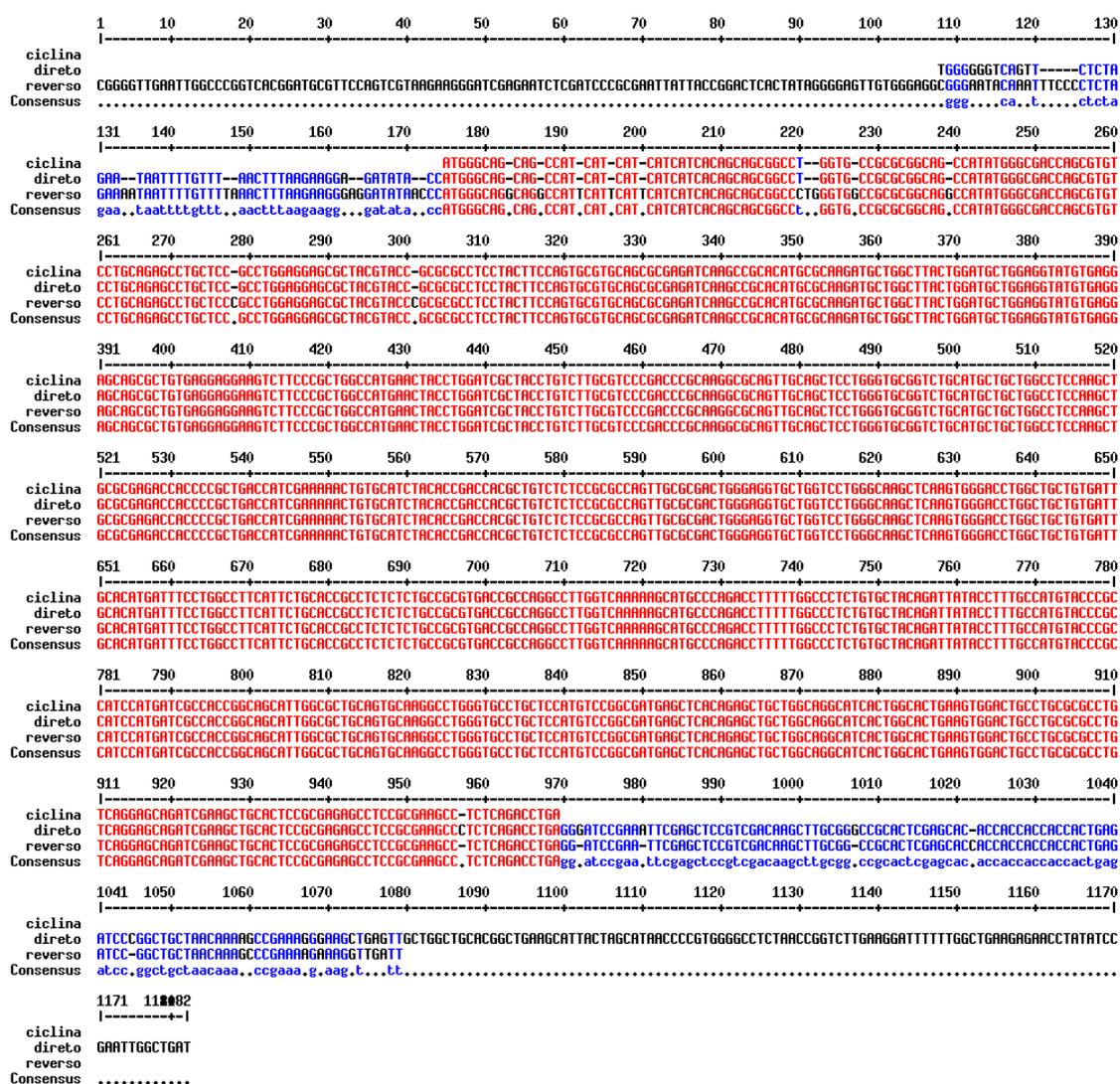
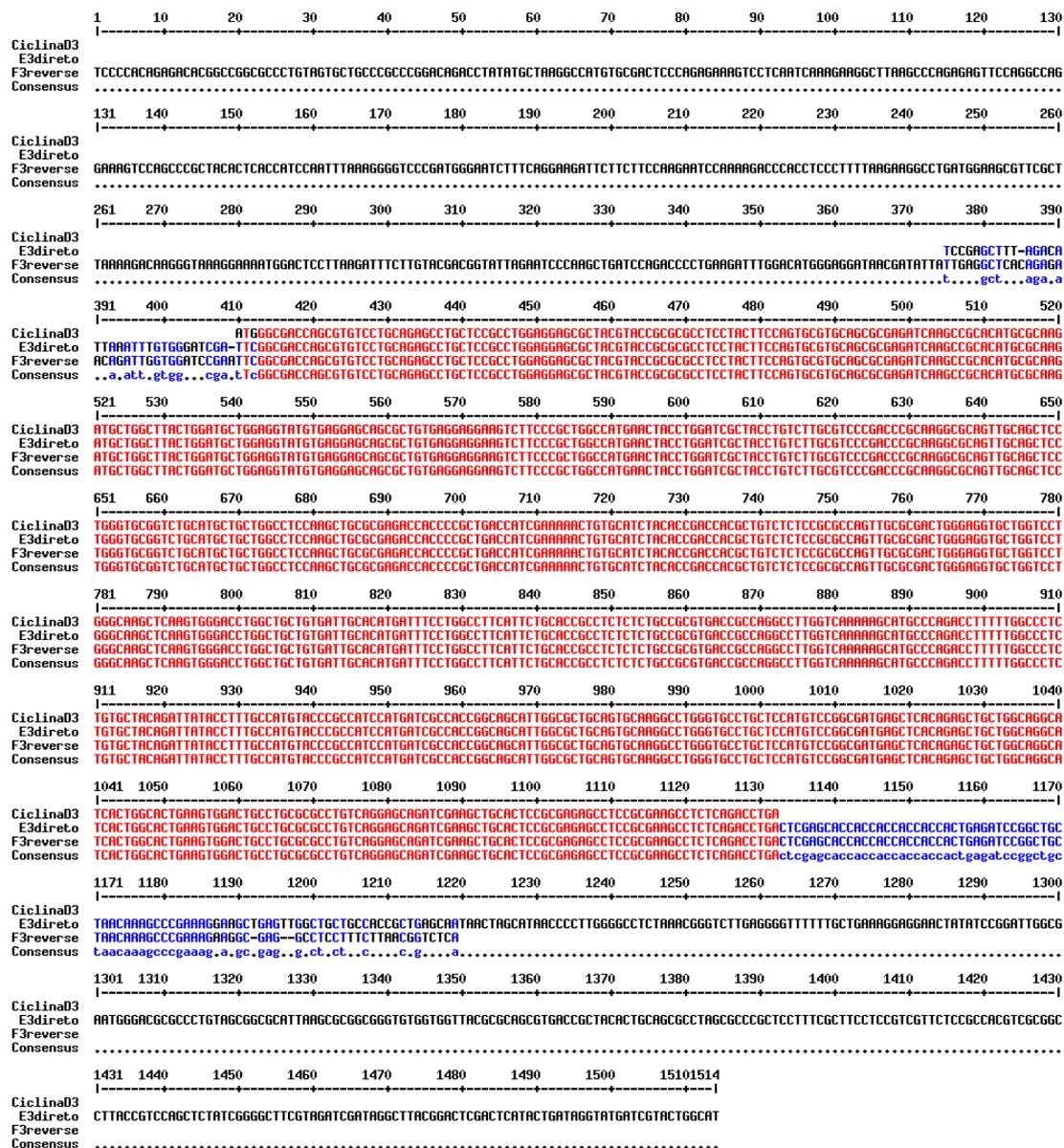


Figura 15. Análise do sequenciamento pelo programa Multalin Analysis. Em vermelho, de ATG a TGA, os códons de iniciação e terminação do DNA codante da ciclina D3, respectivamente. Na linha “direto” refere-se ao amplificado utilizando o primer T7 promoter, e na linha “reverso” refere-se ao amplificado a partir do primer T7 terminator. Em azul está parte do vetor pETSUMO, flanqueado pelos primers.



4.2 Ensaios de Expressão e Purificação da ciclina D3

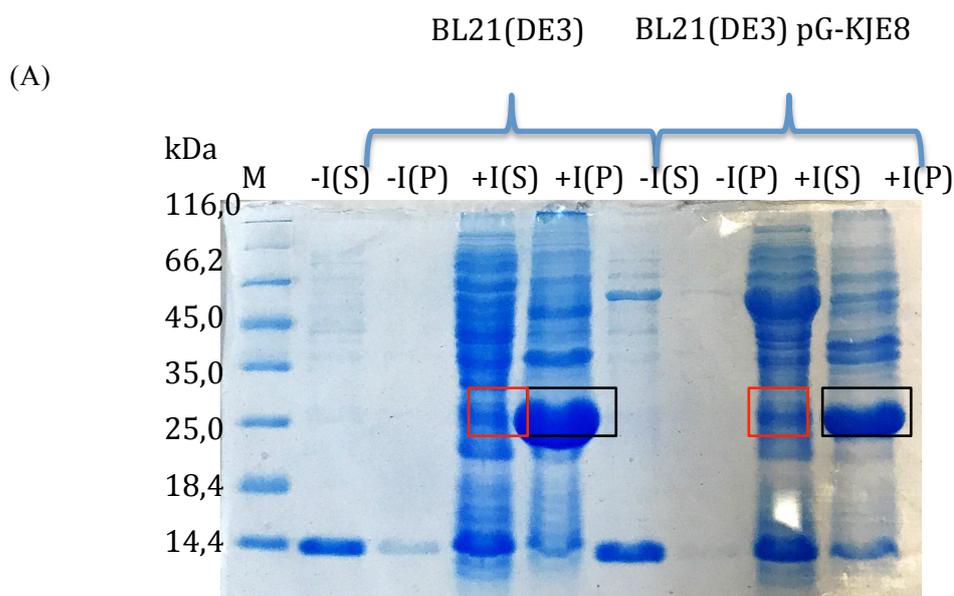
4.2.1.1 Indução da expressão do recombinante pET28a::cicD3

Para expressão da proteína ciclina D3, células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pG-KJE8 e BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET28a::cicD3 e as colônias foram selecionadas a partir das placas contendo meio LB na presença de antibiótico canamicina (30 µg/mL) e clorofenicol (34 µg/mL) e somente canamicina (30 µg/mL),

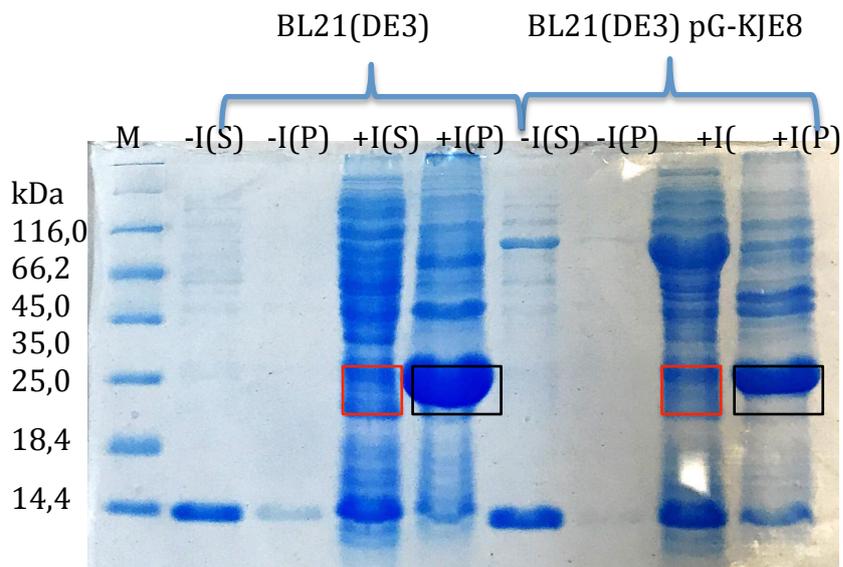
respectivamente.

No meio LB para a linhagem BL21(DE3)pG-KJE8 foi adicionado L-Arabinose (0,5 mg/ml) e tetraciclina (5 ng/ml) para indução das chaperonas presentes no plasmídeo pG-KJE8. Após a seleção de colônias, estas foram transferidas para meio líquido contendo os mesmos antibióticos, e a cultura foi conduzida a 37°C, a 250 rpm, até a densidade óptica a 600 nm atingir a absorvância aproximada de 0,3. Neste ponto, a expressão teve sua temperatura ajustada em diferentes temperaturas testes e após a densidade óptica atingir entre 0,4 - 0,6, ela foi induzida pela adição de IPTG 0,1 mM, e mantida a temperatura constante (37°C, 20°C e 16°C) a 250 rpms, entre 5 e 72 horas (Figura 15). As células foram centrifugadas e ressuspensas na proporção de 1 grama de sedimento bacteriano para 5 mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase), as quais foram mantidas em banho de gelo por 30 min e sonicadas (10 pulsos de 20 segundos cada). O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 11.100 rpm a 4°C. Frações solúveis e insolúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1971).

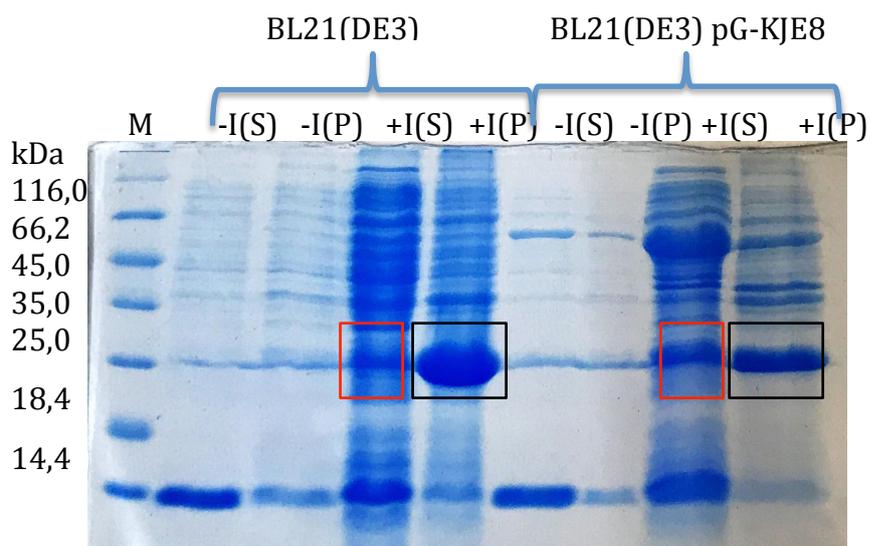
Figura 16. Perfil de co-expressão de ciclina D3 com chaperonas moleculares. (A) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 37°C por 5 horas (B) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 20°C por 24 horas (C) Co-expressão de chaperonas dos plasmídeos pG-KJE8 e em células BL21(DE3) em 16°C por 26 horas. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. -I: extrato celular total antes da indução, +I: extrato celular total após a indução, S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicção e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.



(B)



(C)



Fonte: Autoria própria

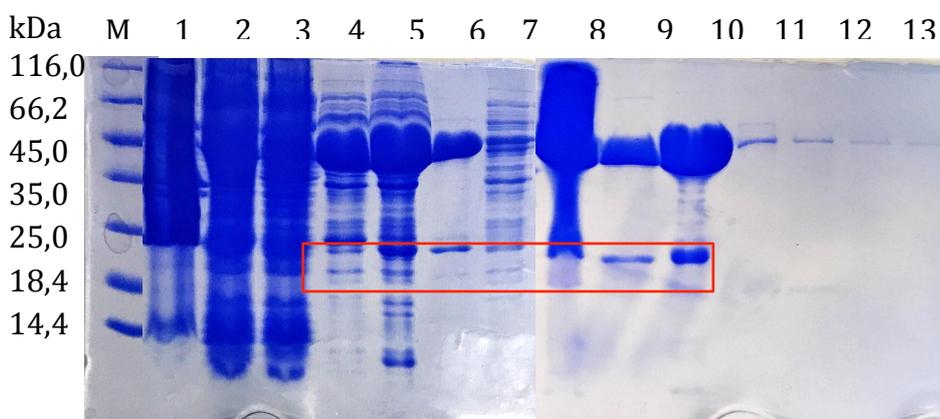
É possível verificar pelos retângulos em vermelho que a expressão a 16°C aumentou a fração solúvel da proteína recombinante. Esse resultado demonstra a eficácia em utilizar a linhagem BL21(DE3)pG-KJE8, a qual compõe o plasmídeo com as chaperonas DnaK, DnaJ, GrpE, GroES e GroEL. Tem sido relatado que a co-expressão de uma proteína alvo com uma dessas equipes acompanhantes aumenta a recuperação de proteínas na fração solúvel, o que foi constatado nestes experimentos.

4.2.1.2 Purificação da ciclina D3 a partir do recombinante pET28a::cicD3

A purificação da fração solúvel da expressão do recombinante pET28a::cicD3 em BL21(DE3)pG-KJE8, por 26h a 16°C ocorreu por duas cromatografia de afinidade em níquel, sendo a segunda pós reação com trombina (16h a 4°C) para clivagem da cauda de histidina.

As frações de eluição foram reunidas, gradualmente removidas pela variação de concentração do imidazol. Devido as proteínas ciclina D3 e chaperona GroEL não terem sido separadas pela cromatografia de afinidade, foi realizada uma terceira purificação por cromatografia de exclusão de tamanho.

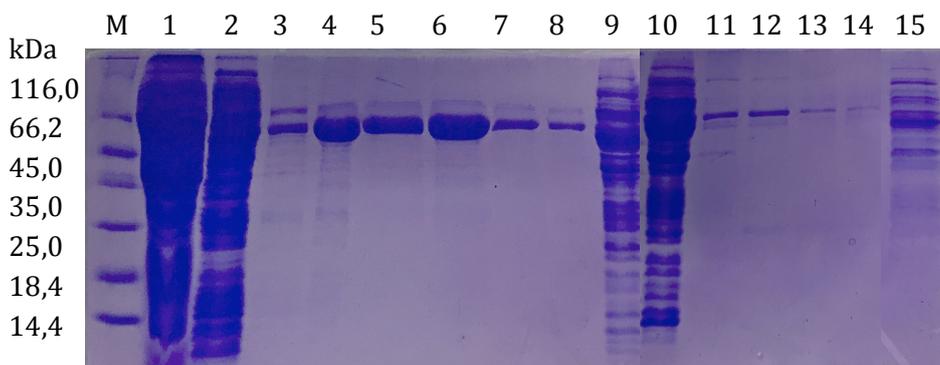
Figura 17. SDS-PAGE 15 % referente as etapas de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pG-KJE8 utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 16°C por 26h. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.). 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3: fração não ligada na coluna de afinidade, 4: fração de lavagem com 300 mM de imidazol, 5: amostra pós reação com trombina, 6: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina, 7: fração de lavagem com 300 mM de imidazol, 8: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina concentrada, 9, 10, 11, 12, 13 e 14: frações de eluição na coluna de exclusão de tamanho. As bandas da proteína de interesse são destacadas com o retângulo.



Fonte: Autoria própria

Após a terceira purificação por exclusão de tamanho foi possível observar que as proteínas ciclina D3 e GroEL não se separaram, apesar de possuírem massas diferentes. Utilizando-se do artigo de Rial e Ceccarelli (RIAL e CECCARELLI, 2002), os quais desenvolveram um protocolo eficiente para remover chaperonas moleculares (DnaK) utilizando três etapas de lavagem com Mg^{2+} -ATP na coluna de afinidade, realizamos testes similares, a fim de obter resultados promissores.

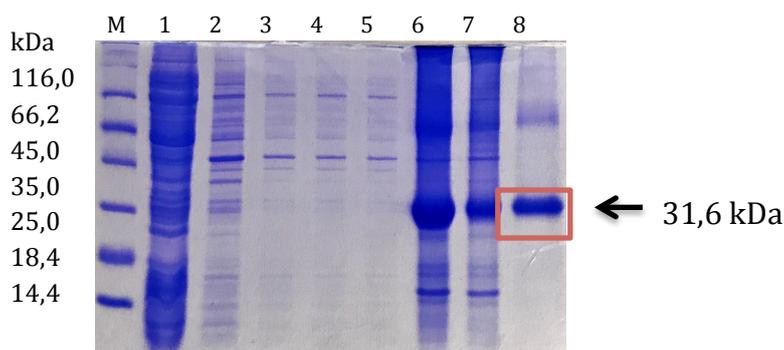
Figura 18. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3)pG-KJE8 utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 16°C por 26h com a utilização de MgATP na coluna de afinidade. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 2: fração não ligada na coluna de afinidade; 3,4,5,6,7 e 8: frações de lavagem com 5mM de Mg²⁺-ATP, 9: fração de lavagem com 300mM de Imidazol, 10: amostra pós reação com trombina, 11, 12, 13 e 14: fração não ligada na coluna de afinidade pós reação com trombina, 15: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.



Fonte: Autoria própria

Apesar da eficiência do protocolo na separação da chaperona DnaK no artigo de Rial e Ceccarelli (RIAL e CECCARELLI, 2002), o mesmo não obteve resultados satisfatórios nesse estudo. Os custos da utilização de Mg²⁺-ATP somado ao de outros reagentes ao longo de todo processo de purificação, fizeram com que tentássemos a purificação da fração solúvel na BL21(DE3) a 37°C com 5h de expressão e concomitantemente, a purificação do precipitado gerado pelos corpos de inclusão utilizando-se do protocolo de reenovelamento baseado no estudo de He e Ohnishi (HE e OHNISHI, 2017) com dodecil sulfato de sódio (SDS).

Figura 19. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da fração insolúvel na coluna de afinidade da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 37°C por 5h. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2, 3, 4 e 5: fração de lavagens do precipitado com Tris-HCl 20mM, 6: sobrenadante pós reação com SDS (reenovelado), 7: fração não ligada na coluna de afinidade, 8: fração de lavagem com 300mM de Imidazol, demonstrando a purificação da proteína de interesse, destacada pelo retângulo em vermelho.



Fonte: Autoria própria

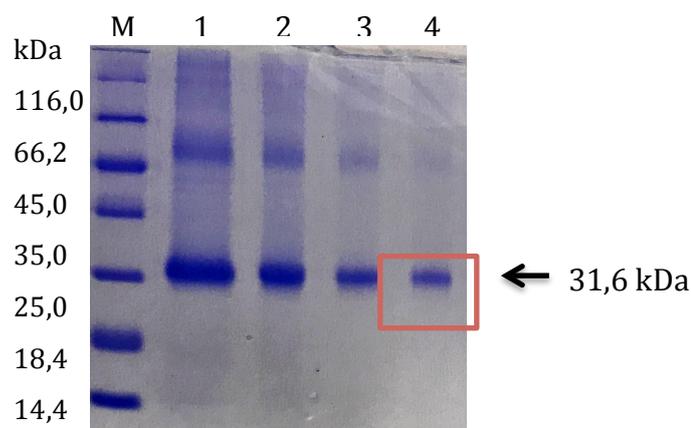
A purificação da fração solúvel não foi satisfatória (dados não mostrados). Estudos demonstraram que as proteínas insolúveis possuem uma porcentagem maior de aminoácidos hidrofóbicos do que proteínas solúveis (Davis et al., 1999) dados que corroboram com a presença de regiões ricas em triptofanos da ciclina D3 expostos ao ambiente externo.

A utilização do protocolo de reenovelamento permitiu obter, através da purificação, uma quantidade muito maior da proteína ciclina D3 (representada pelo quadrado em vermelho), quando comparada a fração solúvel. A canaleta 8 do gel da figura 19, referente a purificação da proteína ciclina D3, demonstrou possuir um elevado grau de pureza, e novas amostras foram produzidas a partir da diluição desta para a quantificação da pureza e determinação da proteína.

4.2.1.3 Diálise e determinação da pureza e concentração da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pET28a::cicD3

As frações referentes a purificação da proteína pela lavagem com 300mM de imidazol foram submetidas a diálise conforme descrito no item 3.2.6. Várias concentrações da proteína foram analisadas novamente em gel SDS-PAGE 15% para quantificar a pureza da proteína pelo programa Image J.

Figura 20. SDS-PAGE 15 % referente a etapa de purificação da fração insolúvel na coluna de afinidade da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pET28a com indução por 0,1 mM de IPTG a 37°C por 5h. Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1: proteína na concentração de 1,7 mg/ml, 2: proteína na concentração de 0,85 mg/ml, 3: proteína na concentração de 0,425 mg/ml, 4: proteína na concentração de 0,212 mg/ml.



Fonte: Autoria própria

A imagem referente a figura 20 foi submetida ao programa ImageJ, e a canaleta 4 foi analisada em relação a quantidade de pixels apresentados pela área gráfica. De acordo com

essa imagem, a pureza da proteína foi de 95,8%.

A proteína His(6x)-ciclina D3 contém 280 resíduos, massa molecular de 31,6 kDa e o coeficiente e extinção molar de $28420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinados com o uso do software ProtParam (GASTEIGER, 2005) a partir da sua estrutura primária.

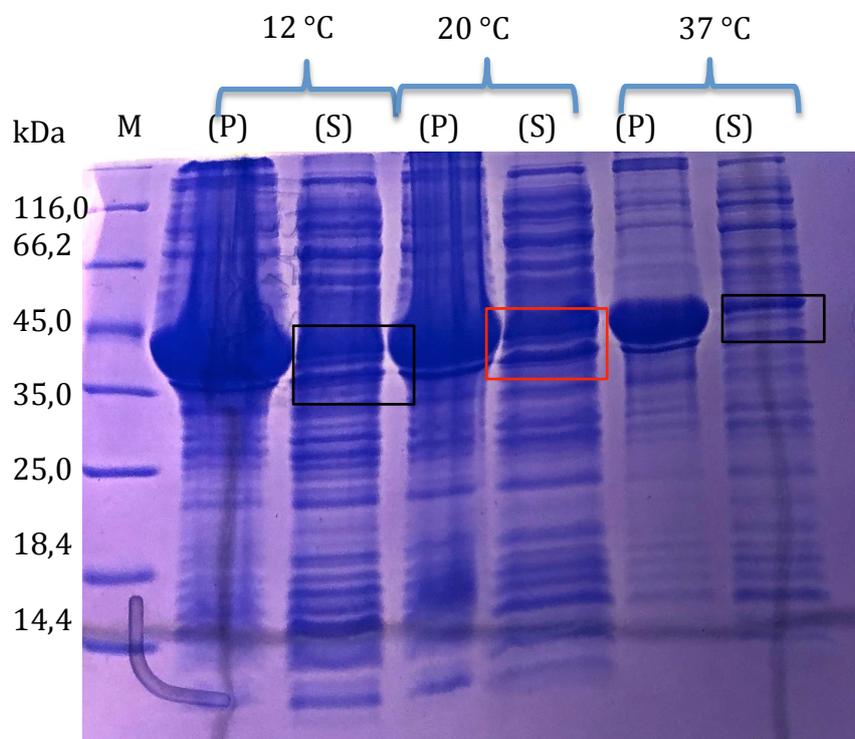
A determinação da proteína foi realizada por um espectrofotômetro utilizando absorbância em 280 nm e coeficiente de extinção molar específico, pela substituição na equação de Lambert-Beer. Foi determinada uma concentração de 0,7 mg/ml distribuídos em 15ml de volume total. Logo, a expressão do recombinante pET28a::cicD3 em BL21(DE3), a 37°C por 5h, foi de 10,5 mg de proteína ciclina D3 por litro de meio de cultura, utilizando o protocolo de reenovelamento.

4.2.2.1 Indução da expressão do recombinante pETSUMO::cicD3

Para expressão da proteína ciclina D3, células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante pETSUMO::cicD3 e as colônias foram selecionadas a partir das placas contendo meio LB na presença de antibiótico canamicina (30 $\mu\text{g/mL}$).

Após a seleção de colônias, estas foram transferidas para meio líquido contendo o mesmo antibiótico, e a cultura foi conduzida a 37°C, a 250 rpm, até a densidade óptica a 600 nm atingir a absorbância aproximada de 0,3. Neste ponto, a expressão foi ajustada em diferentes temperaturas testes e após a densidade óptica atingir entre 0,4 - 0,6, ela foi induzida pela adição de IPTG 0,1 mM, e mantida a temperatura constante (37°C, 20°C e 12°C) a 250 rpms, entre 5 e 72 horas (Figura 21). As células foram centrifugadas e ressuspensas na proporção de 1 grama de sedimento bacteriano para 5 mL de tampão de lise. Dois tipos de tampões foram testados, o primeiro, comendo: (50 mM Tris. HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase); e o segundo comendo: (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, e 1 mM PMSF, 1mg/ml lisozima, 0,5u DNase), as quais foram mantidas em banho de gelo por 30 min e sonicadas (10 pulsos de 20 segundos cada, com amplitude de 20%). O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 19.000 rpm a 4°C. Frações solúveis e insolúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1971).

Figura 21. Perfil de expressão de ciclina D3 em células BL21(DE3) em 37°C por 5 horas; em 20°C por 24 horas; e em 12°C por 72 horas, após a indução. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.



Fonte: Autoria própria

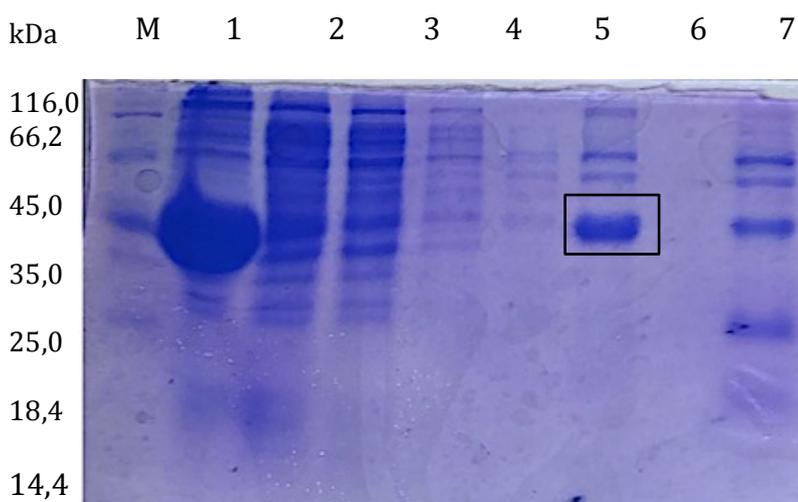
É possível verificar pelo retângulo em vermelho que a expressão a 20°C aumentou a fração solúvel da proteína recombinante, em comparação às outras frações solúveis destacadas pelos retângulos em preto. Esse resultado demonstra a eficácia em utilizar o vetor pETSUMO, o qual compõe da proteína SUMO fusionada à proteína de interesse. Tem sido relatado que a expressão de uma proteína alvo utilizando este vetor, aumenta a expressão da proteína recombinante e aprimora a solubilidade proteica.

4.2.2.2 Purificação da ciclina D3 a partir do recombinante pETSUMO::cicD3

A primeira tentativa de purificação da fração solúvel da expressão da ciclina D3 em BL21(DE3) a 20°C por 24h ocorreu a partir de duas etapas de purificação em colunas por gravidade (resina HisPurTM NI-NTA) de afinidade em níquel, sendo a segunda pós troca de tampão para remoção da alta concentração de imidazol, e pós reação com 2,5U SUMO protease (16h a 16°C) para clivagem e remoção da proteína SUMO. O tampão utilizado foi o tampão de ligação (50mM de TrisHCl, 500mM de NaCl, 20mM de imidazol, 10% de glicerol

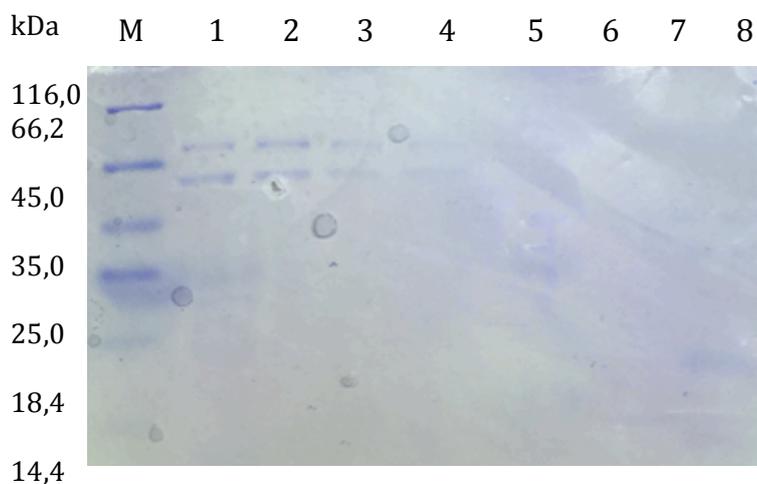
e pH=7,4), e o tampão de eluição (50mM de TrisHCl, 300mM de NaCl, 300mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4).

Figura 22. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol e concentrada, 7: fração pós troca de tampão, 8: fração pós reação com sumo protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com o retângulo.



Fonte: Autoria própria

Figura 23. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20°C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1, 2, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6, 7 e 8: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.

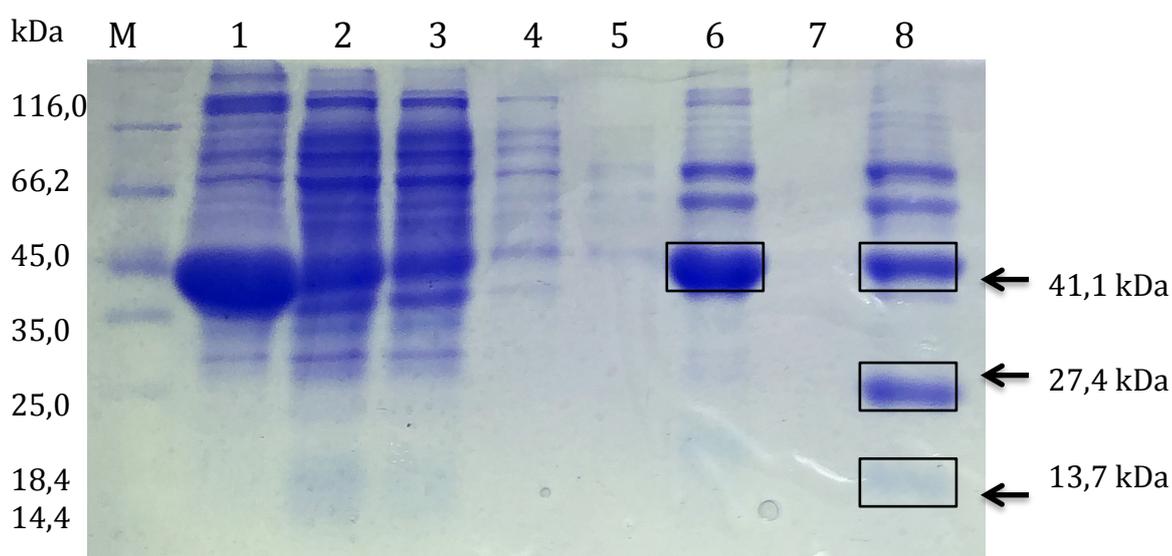


Fonte: Autoria própria

Apesar da eficiência da primeira etapa de purificação e da reação com a SUMO protease, a segunda purificação utilizando a afinidade em níquel, não foi satisfatória. Uma nova estratégia foi realizada tentando separar as proteínas previamente purificadas por afinidade em níquel, em uma segunda purificação por exclusão de tamanho (coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg). Na primeira purificação, foi mantido o tampão de ligação (50mM de TrisHCl, 500mM de NaCl, 20mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4), e o tampão de eluição (50mM de TrisHCl, 300mM de NaCl, 300mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4). Para a coluna de exclusão de tamanho, o tampão utilizado foi de 50mM de NaH₂PO₄, 100mM de NaCl e 10% de glicerol.

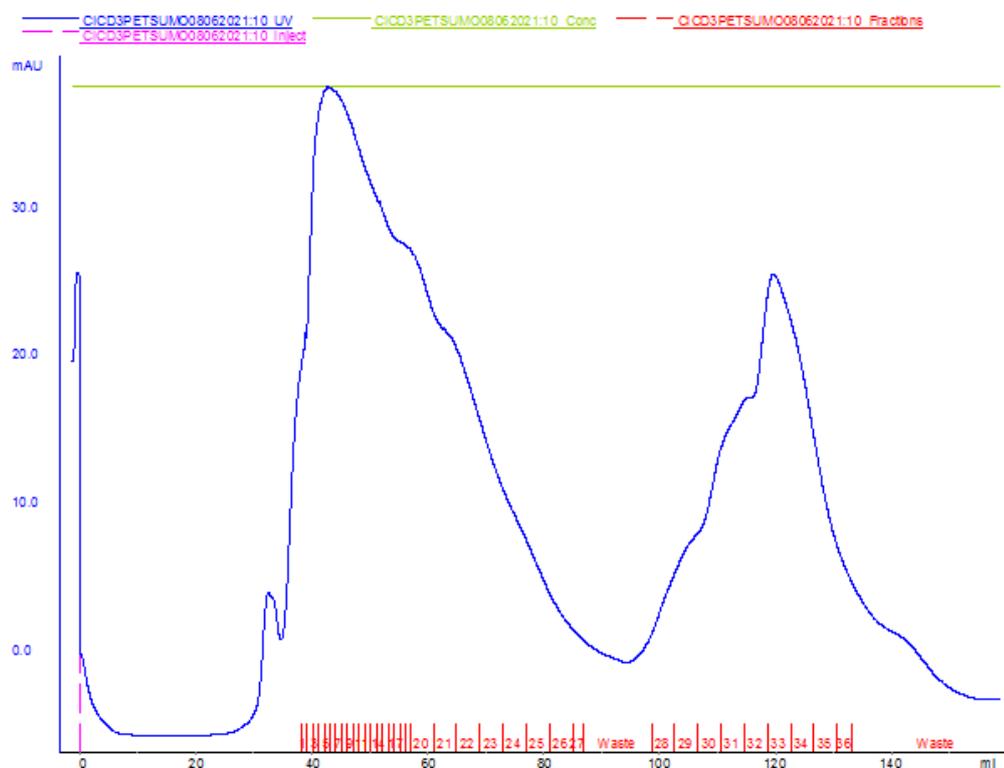
Novamente, antes da segunda purificação, ocorreu a reação com a SUMO protease (16h a 16°C). A fim de otimizar a reação, houve um aumento na concentração para 5U de SUMO protease da Merck™ Sigma-Aldrich® para cada 1 mg de proteína His(6x)-SUMO-CicD3 na presença de 10 mmol L⁻¹ de ditioneitol (DTT).

Figura 24. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pETSUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada à coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol – (amostra concentrada) , 7: fração do filtrado da concentração da amostra 6; 8: fração pós reação com SUMO protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.



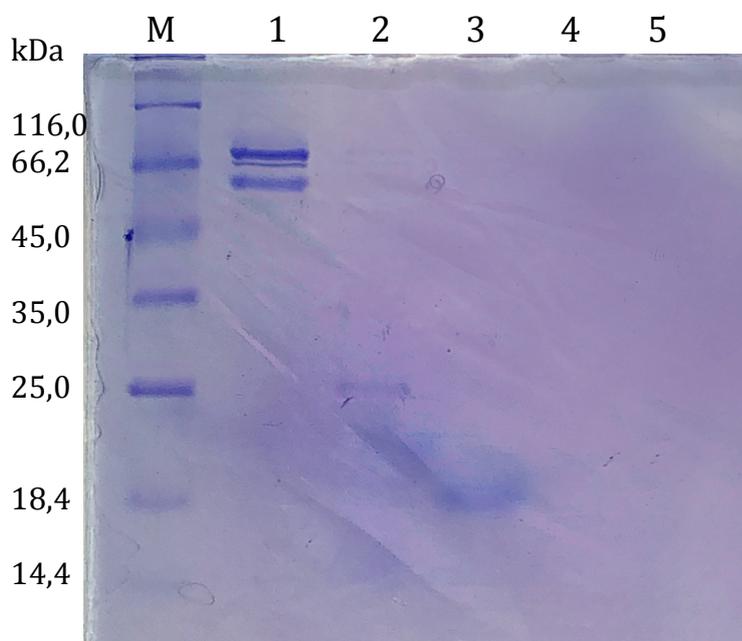
Fonte: Autoria própria

Figura 25. Cromatograma da exclusão molecular referente à segunda etapa de purificação da Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO. Tampão empregado: 50mM de NaH_2PO_4 , 100mM de NaCl e 10% de glicerol, pH 7,4. Fluxo do tampão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna: HiLoad 16/600 Superdex 75 pg.



Apesar de identificarmos novamente a eficiência na primeira etapa de purificação em coluna de afinidade, não houve a separação das proteínas na etapa de purificação por exclusão de tamanho, o que pode ser evidenciado por meio do SDS-PAGE apresentado na figura 26.

Figura 26. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24 h, purificada previamente por cromatografia de afinidade e clivada pela proteína SUMO protease. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1, 2, 3, 4 e 5: Frações 8, 20, 21, 32 e 33 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente.

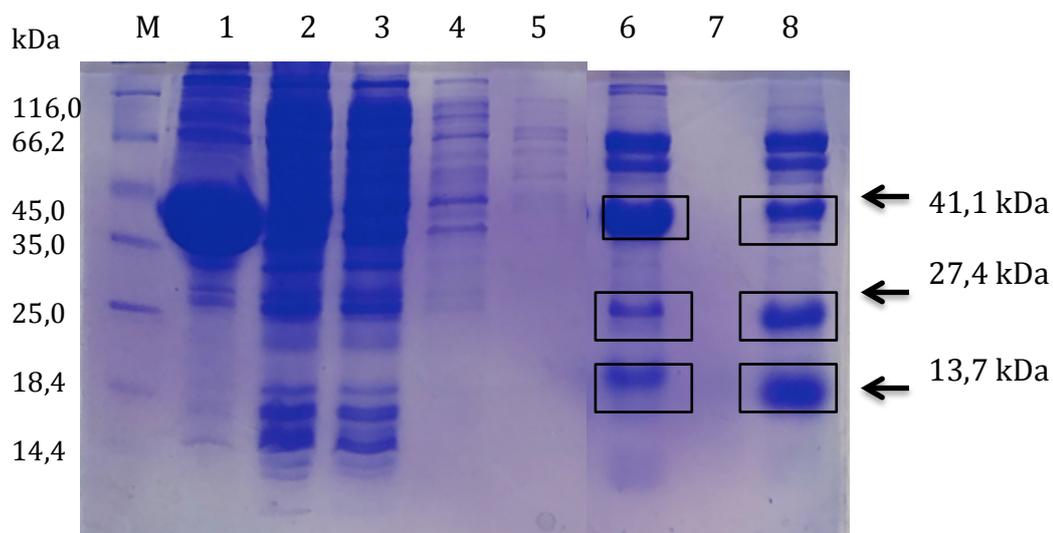


Fonte: Autoria própria

Novamente, a segunda purificação não obteve sucesso na separação da proteína de interesse. A dificuldade em obter uma concentração significativa utilizando a coluna de exclusão de tamanho, fez com quem tentássemos novamente a segunda purificação em coluna de afinidade. Novos testes utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência, o *Akta Purifier* (GE) e duas purificações por cromatografia de afinidade em níquel (coluna HisTrapTM FF com Ni²⁺ imobilizado) foram realizados. O perfil do SDS-PAGE 15% das amostras foi muito diferente do que havia sido identificado utilizando as colunas por gravidade (resina HisPurTM NI-NTA).

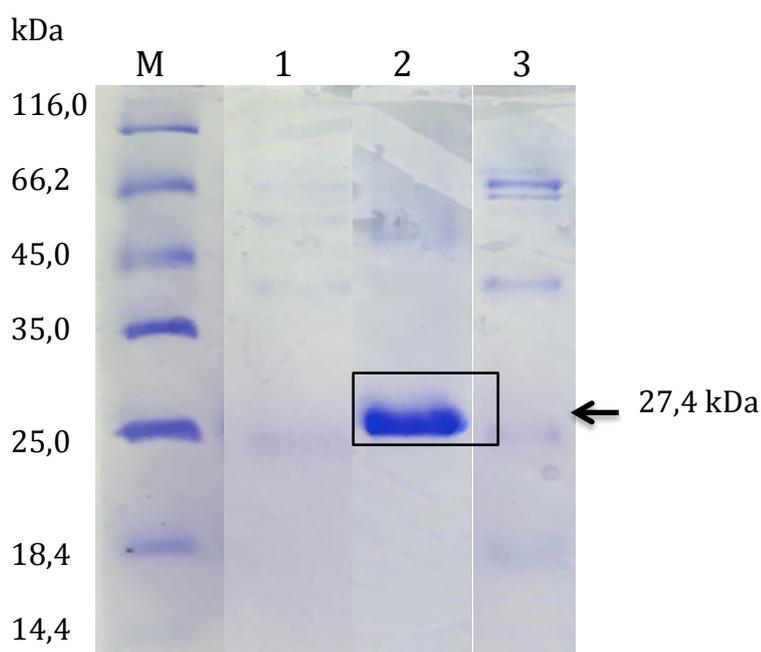
Uma nova tentativa utilizando as colunas por gravidade (resina HisPurTM Ni-NTA), porém com outros tipos de tampões foi empregada. Nesta segunda composição, foi utilizado o tampão de ligação (50mM de NaH₂PO₄, 500mM de NaCl, 20mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4), e o tampão de eluição (50mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 300mM de imidazol, 10% de glicerol e pH=7,4).

Figura 27. SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: corpos de inclusão ressuspenso precipitado, 2: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, 3 e 4: fração não ligada na coluna de afinidade, 5: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 6: fração de lavagem com 300 mM de imidazol (amostra concentrada), 7: fração do filtrado da concentração do amostra 6; 8: fração pós reação com sumo protease. As bandas da proteína de interesse são destacadas com os retângulos.



Fonte: Autoria própria

Figura 28. SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína Ciclina D3 expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mM de IPTG a 20 °C por 24. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1: fração não ligada na coluna de afinidade, 2: fração de lavagem com 92,9% de tampão de ligação e 7,1% de tampão de eluição, 3: fração de lavagem com 300 mM de imidazol.



Fonte: Autoria própria

4.2.2.3 Determinação da pureza e da concentração da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pETSUMO::cicD3

A fração referente a proteína ciclina D3 foi eluída em tampão com baixa concentração de imidazol. Para determinação da pureza foi mantida a mesma concentração (0,212 mg/ml) estabelecida da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pET28a::cicD3

A canaleta 2 da figura 28 foi submetida ao programa ImageJ, e analisada em relação a quantidade de pixels apresentados pela área gráfica. De acordo com essa imagem, o nível de pureza da proteína foi de 95,3%.

A proteína ciclina D3 contém 243 resíduos, massa molecular de 27,4 kDa e o coeficiente de extinção molar de $28420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinados com o uso do software ProtParam (GASTEIGER, 2005) a partir da sua estrutura primária.

A determinação da proteína foi realizada por um espectrofotômetro utilizando a absorbância em 280 nm e coeficiente de extinção molar específico, pela substituição na equação de Lambert-Beer. Foi determinada uma concentração de 0,45 mg/ml distribuídos em 30 ml de volume total. Logo, a expressão do recombinante pETSUMO::cicD3 em BL21(DE3), a 20°C por 24h, foi de 13,5 mg de proteína ciclina D3 por litro de meio de cultura.

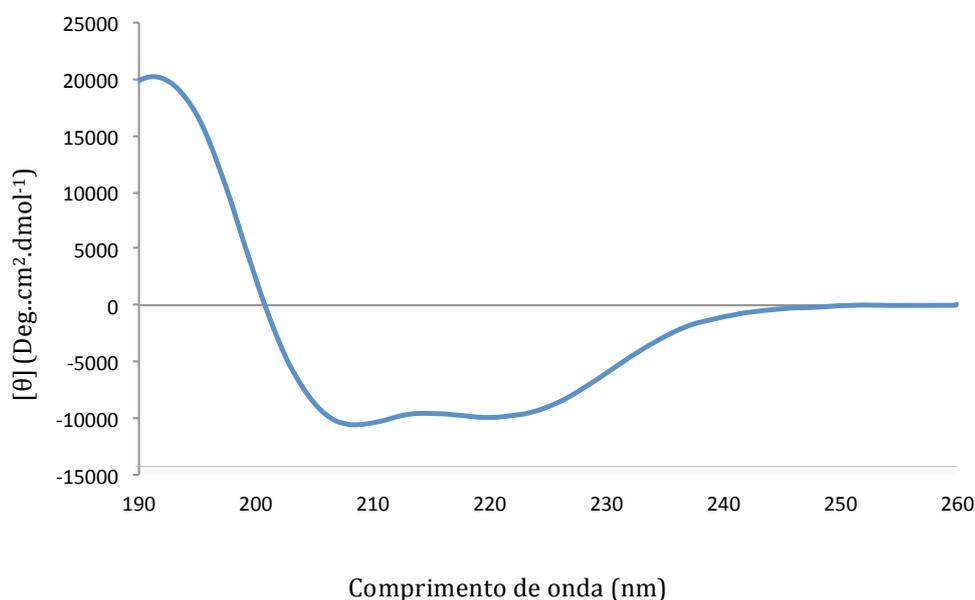
4.3 Ensaios de Caracterização Estrutural da ciclina D3

4.3.1.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para a ciclina D3 expressa a partir do recombinante pET28a::cicD3

4.3.1.1.1 Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3

Os dados obtidos pela análise no espectrofotômetro foram tratados no programa CDNN Deconvolution®. A partir desse resultado, foi possível encontrar as porcentagens de estruturas secundárias dos espectros de CD.

Figura 29. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. A concentração final da proteína ciclina D3 é de 4 μ M.



Fonte: A autoria própria

Após tratamento dos dados utilizando a opção 13basespectra de 205nm a 260nm, foi possível observar que a proteína obtida apresenta em média cerca de 39% de hélices α e 15% de fitas β . Nessa opção, o erro do programa é referido como sendo de 4,84% (CDNN USER MANUAL).

Comparando os resultados de CD com o obtido por difração de raios X para uma ciclina D3 associada à uma CDK4, expressa em *Spodoptera frugiperda* (código PDB 3G33), podemos verificar uma porcentagem abaixo do esperado de hélices α e um valor acima de fitas β .

Apesar da diferença no resultado, podemos considerá-lo válido, uma vez que resultados de CD de estruturas obtidas por difração de raios X de ciclinas isoladas apresentaram resultados diferentes de estruturas resolvidas em complexo com a CDK parceira. A proteína ciclina B1 (código 2B9R) apresenta 51% de hélices α , enquanto a proteína CDK2-ciclina B1 (código 2JGZ) apresenta 63% de hélices α , sendo que ambas foram expressas em *E. coli*. Se considerarmos uma redução de 10% do valor de hélices α , para quando as proteínas estão no complexo, somado a tendência de superestimar fitas β em dados menores que 208 nm (GREENFIELD e FASMAN, 1969), os resultados estão dentro da faixa esperada.

Tabela 11. Comparação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3

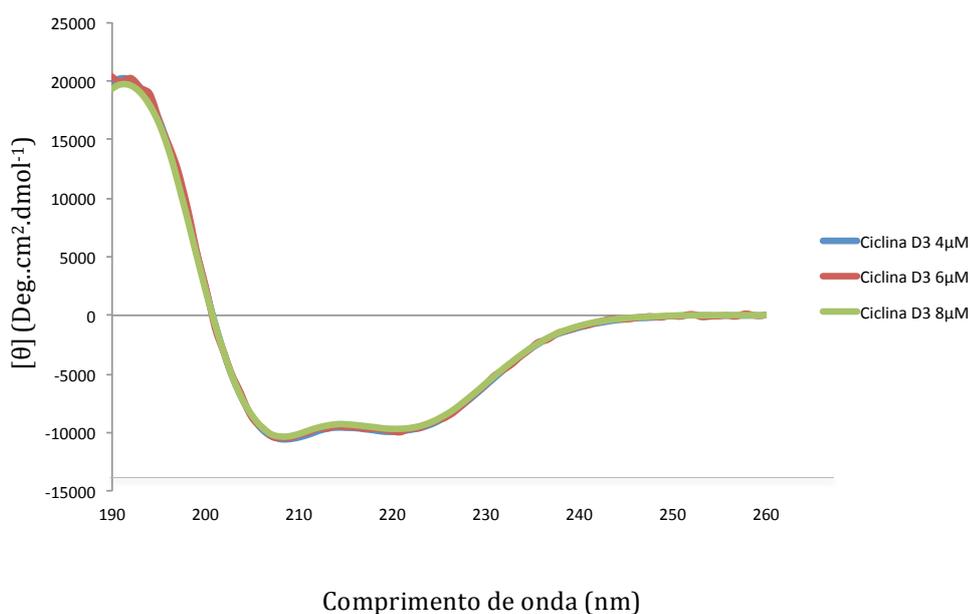
Estrutura secundária	PDB(3G33)	Dicroísmo Circular
Hélices α	51%	39%
Folha β	----	15%

Fonte: Autoria própria

4.3.1.1.2 Determinação da influência da concentração no percentual de estrutura secundária da ciclina D3.

Análises em diferentes concentrações foram realizadas a fim de verificar a influência desta na porcentagem de estruturas secundárias.

Figura 30. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. As concentrações verificadas da proteína ciclina D3 foram de 4 μ M, 6 μ M e 8 μ M.



Fonte: Autoria própria

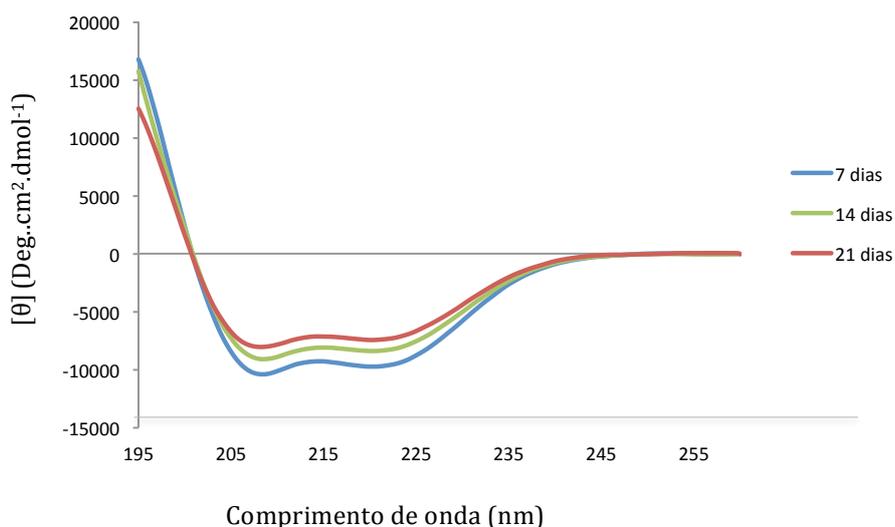
Conforme verificado na figura 30, não houve influência da concentração da proteína na porcentagem de estruturas secundárias.

4.3.1.1.3 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 após armazenamento a 4 °C

A avaliação da estabilidade de armazenamento a 4 °C por 21 dias da ciclina D3 foi

observada por dicroísmo circular (Figura 31). A proteína foi armazenada em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, glicerol a 5% (v/v), 10 mM β -mercaptoetanol, pH 7,4.

Figura 31. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi armazenada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20°C e na concentração de 8 μ M. Os períodos avaliados foram de 7, 14 e 21 dias após armazenamento.



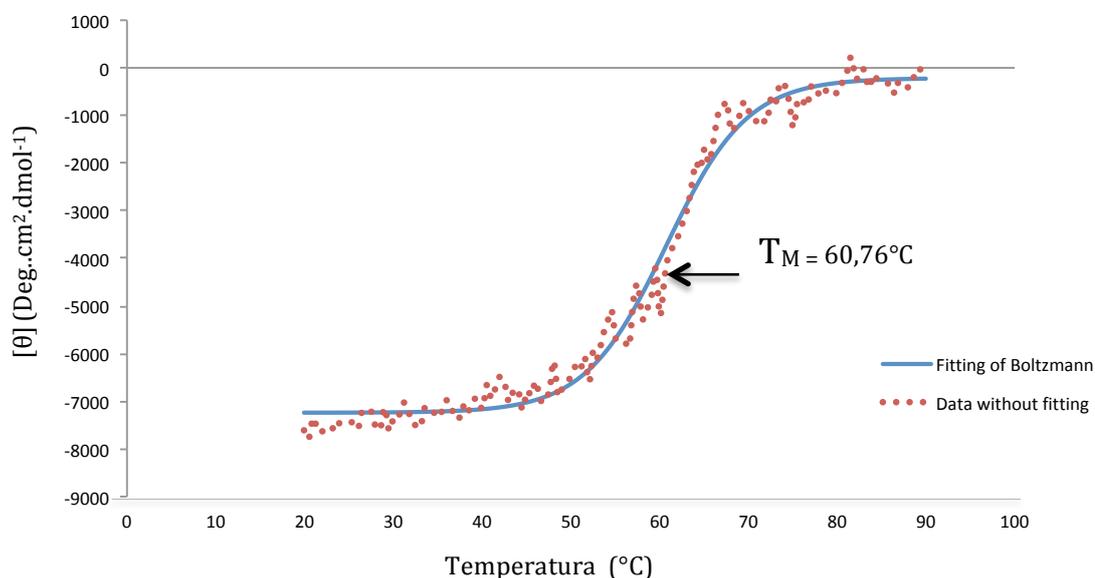
Fonte: Autoria própria

De acordo com o resultado da figura 31, podemos perceber que a proteína não foi estável em períodos superiores a 7 dias. Essa instabilidade pode ser relacionada ao fato da proteína obtida ser oriunda de um processo de reenovelamento, como também pelo fato das ciclinas serem proteínas altamente lábeis (YOSHIDA et. al., 2020). Esse resultado fez com que todas as análises referentes a caracterização da proteína fossem realizadas logo após a diálise, garantindo dessa forma um resultado mais confiável.

4.3.1.1.4 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura.

A análise da estabilidade térmica da proteína foi realizada no espectropolarímetro Jasco J-815. A variação da elipticidade molar da proteína foi monitorada a 208 nm, aumentando a temperatura de 20°C para 90°C, através de incrementos de 1°C. Os dados foram tratados com o Adaptador de Boltzmann usando o programa Origin2019 (Fig. 32).

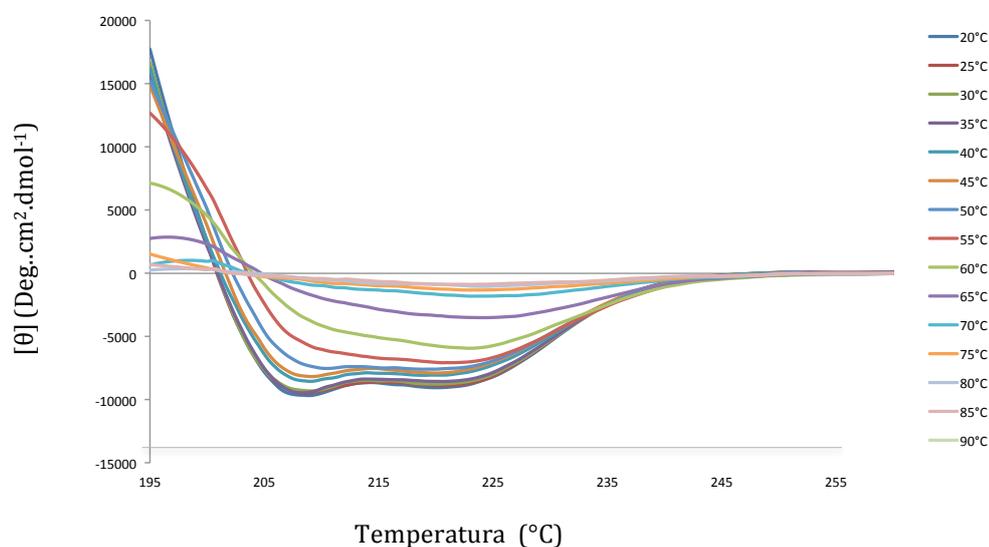
Figura 32. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3. A concentração da proteína estava em 4 μM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A T_M foi de 60,76°C, obtida através da regressão sigmoidal.



Fonte: Autoria própria

Outra análise da estabilidade térmica da proteína foi realizada. A variação da elipticidade molar da proteína foi monitorada no intervalo de 195 nm a 208 nm. A temperatura foi avaliada de 20°C para 90°C, através de incrementos de 5°C. Através do gráfico da figura 33, podemos visualizar a perda gradual da estrutura da proteína com o aumento da temperatura.

Figura 33. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3. A concentração da proteína estava em 4 μM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados entre 195 a 208 nm.



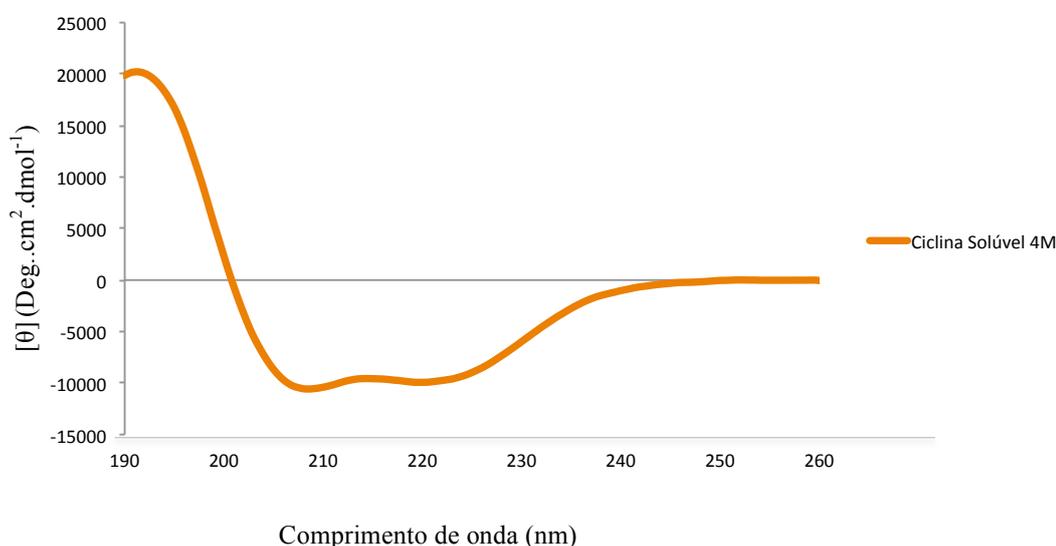
Fonte: Autoria própria

4.3.1.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) da ciclina D3 expressa a partir do recombinante pETSUMO::cicD3

4.3.1.2.1 Determinação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3

Os dados obtidos pela análise no espectrofotômetro foram tratados no programa CDNN Deconvolution®. A partir desse resultado, foi possível encontrar as frações de estruturas secundárias dos espectros de CD.

Figura 34. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20°C. A concentração final da proteína ciclina D3 é de 4 μ M.



Fonte: Autoria própria

Após tratamento dos dados utilizando a opção 13basespectra de 205nm a 260nm, foi possível observar que a proteína obtida apresenta em média cerca de 41% de hélices α e 13% de fitas β . Nessa opção, o erro do programa é referido como sendo de 4,84% (CDNN USER MANUAL).

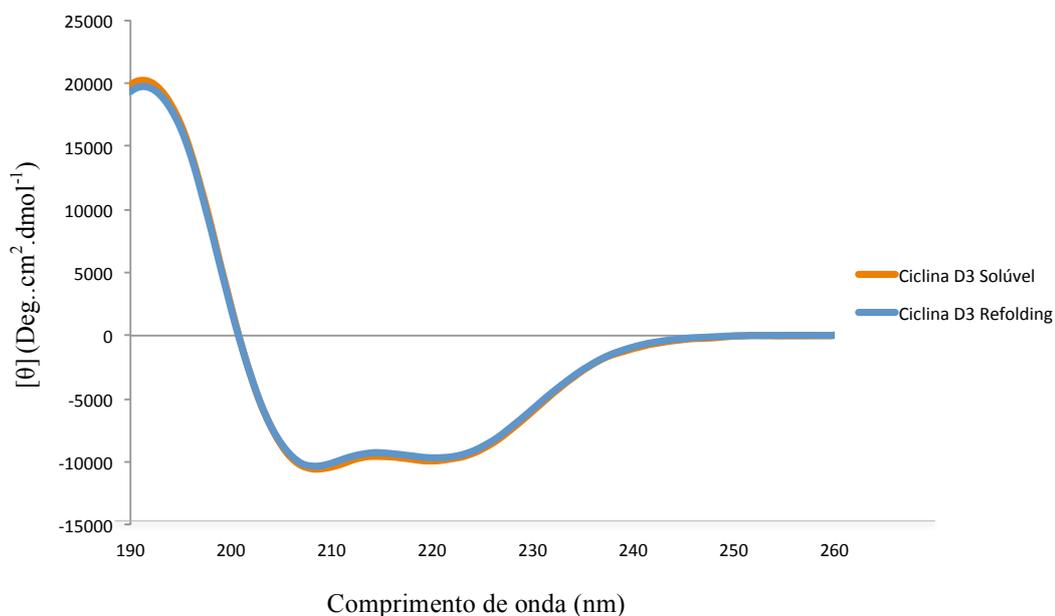
Comparando novamente os resultados de CD com os valores obtidos para a proteína oriunda de reenovelamento, podemos verificar um resultado com porcentagem de hélices α um pouco acima e um valor de fitas β um pouco abaixo do que os resultados anteriores. Apesar da mínima diferença no resultado, podemos verificar que o espectro de CD da proteína ciclina D3 se manteve, quando utilizados os diferentes protocolos, tanto pelo processo de reenovelamento, quanto pela proteína expressa na fração solúvel.

Tabela 12. Comparação do percentual de estrutura secundária da ciclina D3, a partir dos dois protocolos utilizados, reenovelamento e proteína solúvel.

Estrutura secundária	PDB(3G33)	Dicroísmo Circular (Reenovelamento)	Dicroísmo Circular (Fração Solúvel)
Hélices α	51%	39%	41%
Folha β	---	15%	13%

Fonte: Autoria própria

Figura 35. Espectro de CD para a ciclina D3 reenovelamento (azul) e para a ciclina D3 obtida da fração solúvel (laranja). As proteínas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20 °C. A concentração final de ambas as proteínas ciclina D3 foram de 4 μ M.

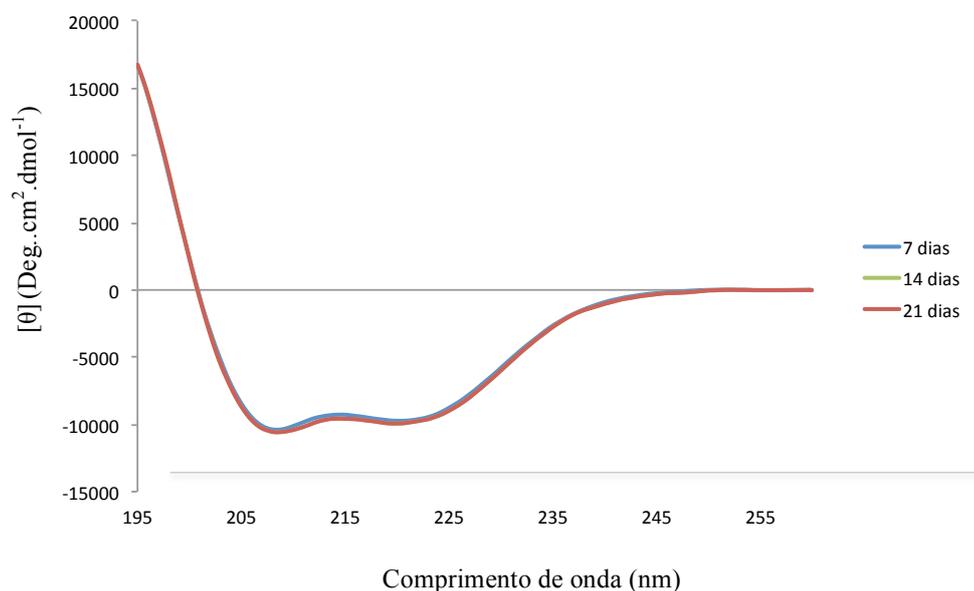


Fonte: Autoria própria

4.3.1.2.2 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência do tempo

A influência do período de armazenamento da proteína na porcentagem de estruturas secundárias foi verificada após diálise desta em uma concentração fixa de 8 μ M.

Figura 36. Espectro de CD para a ciclina D3. A ciclina D3 foi incubada em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. As medidas de CD foram realizadas a 20°C e na concentração de 8 μ M. Os períodos avaliados foram de 7, 14 e 21 dias após armazenamento.



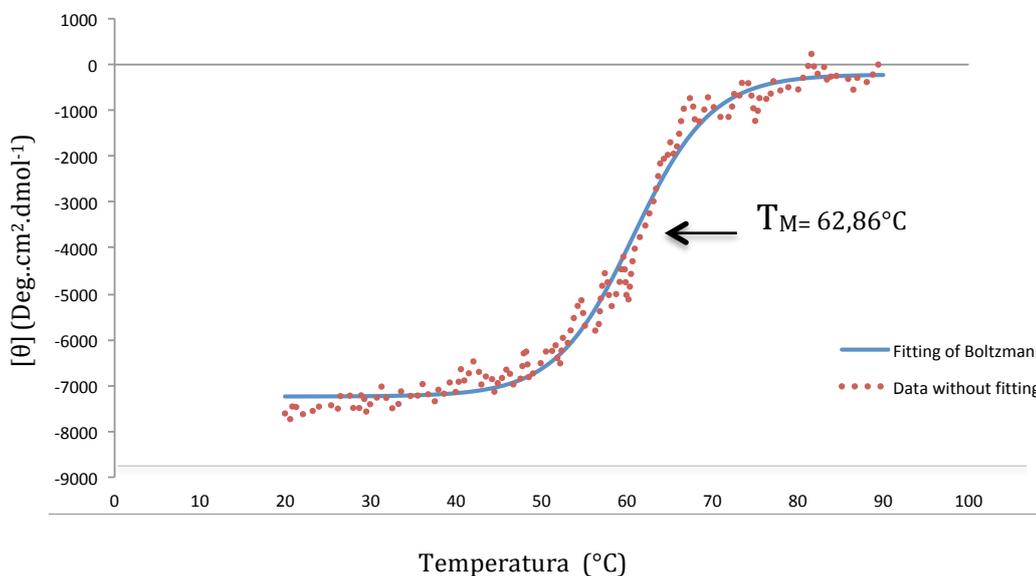
Fonte: Autoria própria

De acordo com o resultado da figura 36, podemos perceber que a proteína obtida pela fração solúvel apresenta uma estabilidade maior da estrutura secundária em decorrência do tempo quando comparada com a proteína obtida pelo processo de reenovelamento.

4.3.1.2.3 Determinação da estabilidade da estrutura secundária da ciclina D3 em decorrência da variação de temperatura

A análise da estabilidade térmica da proteína foi realizada no espectropolarímetro Jasco J-815. A variação da elipticidade molar da proteína foi monitorada a 208 nm, aumentando a temperatura de 20°C para 90°C, através de incrementos de 1°C. Os dados foram tratados com o Adaptador de Boltzmann usando o programa Origin2019 (Fig. 37).

Figura 37. Transição da desnaturação térmica da Ciclina D3 obtida de forma solúvel. A concentração da proteína estava em 4 μM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A T_M foi de 62,86°C, obtida através da regressão sigmoidal.



Fonte: Autoria própria

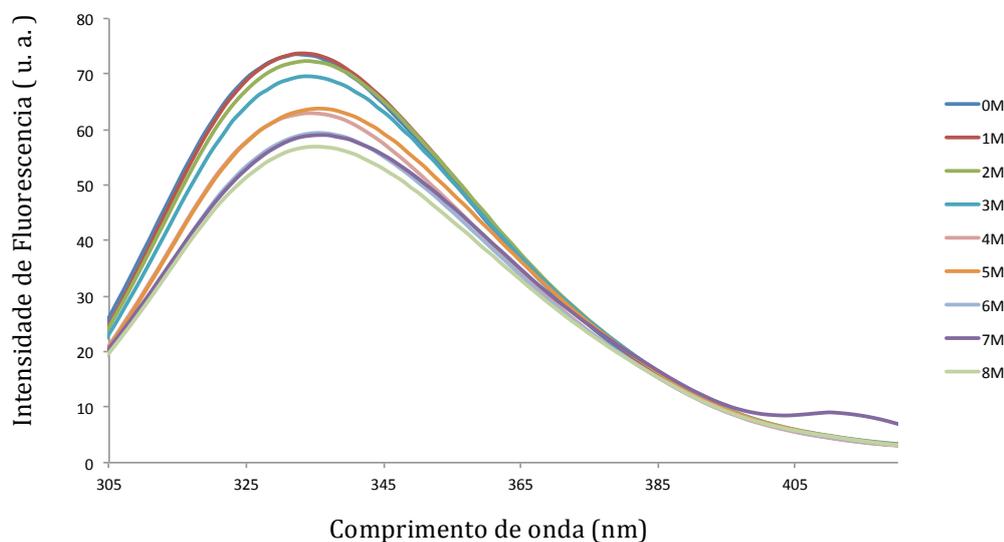
Os dados obtidos por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) revelaram que a estrutura secundária da ciclina D3 foi praticamente idêntica nos dois modos de obtenção (proteína solúvel e proteína reenovelada). Além disso, os resultados demonstraram que a proteína obtida de forma solúvel apresenta uma estrutura secundária muito mais estável em decorrência do tempo, e levemente mais estável em função da temperatura ($T_M = 62,86^{\circ}\text{C}$) que a proteína obtida pelo processo de reenovelamento.

4.3.2 Espectroscopia de emissão de Fluorescência

4.3.2.1- Espectroscopia de emissão de Fluorescência da ciclina D3 obtida a partir do recombinante pET28a::cicD3

A estabilidade química da ciclina D3 foi avaliada, primeiramente, empregando ureia como desnaturante pela espectroscopia de emissão de fluorescência intrínseca a 25°C . A figura 38 mostra o espectro de emissão de fluorescência da ciclina D3 em diferentes concentrações de ureia.

Figura 38. Perfil da desnaturação da ciclina D3 induzida pela ureia. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ureia variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 310 a 420 nm, com excitação em 295 nm a 25°C.



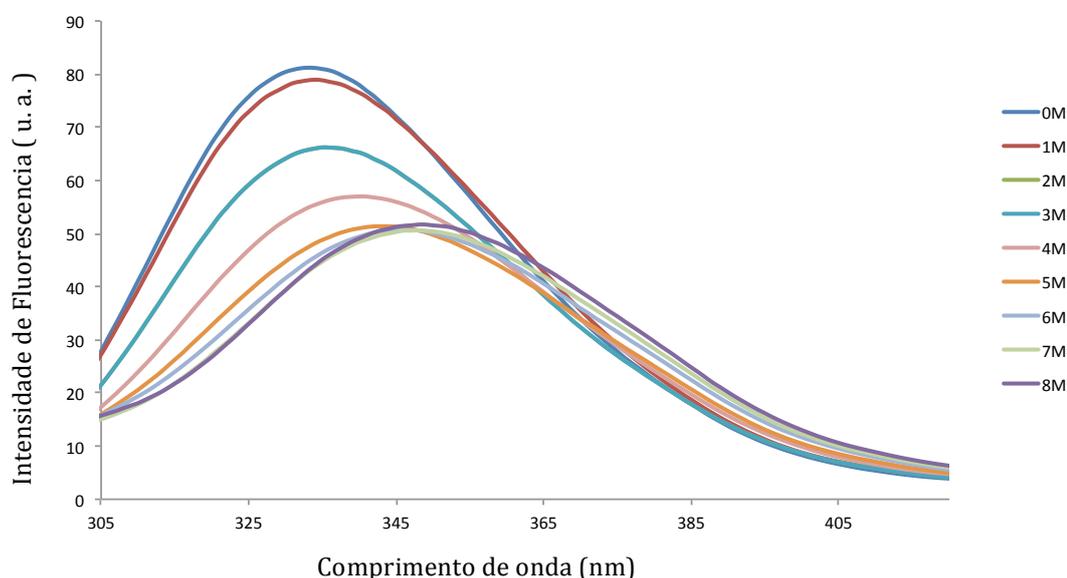
Fonte: A autoria própria

Avaliando a figura 38, podemos perceber que a ciclina D3 em 0M de ureia apresentou o máximo de emissão em torno de 330 nm, típico de triptofano internalizado na proteína. Apesar da intensidade da fluorescência ter seu pico suprimido, não houve um deslocamento significativo do máximo de emissão de fluorescência com o aumento das concentrações de ureia. Isto permitiu que deduzíssemos, que a proteína ciclina D3 não sofria desnaturação na presença de ureia, dessa forma, outro agente desnaturante foi empregado.

Além disso, análises de bioinformática, revelaram que a estrutura nativa de menor energia da proteína ciclina D3, não possui muitos triptofanos internalizados. Dessa forma, outros ensaios de estabilidade química foram realizados na presença de guanidina, porém com excitação em 280 nm, e com medidas monitoradas de 295 nm a 420 nm. A excitação em 280 nm permite que o aminoácido tirosina além do triptofano, possam ser avaliados e dessa forma, contribuir mais significativamente para a verificação da estabilidade da proteína.

A figura 39 demonstra a estabilidade química da ciclina D3 na presença da guanidina.

Figura 39. Perfil da desnaturação da ciclina D3 induzida pela guanidina. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de guanidina variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.



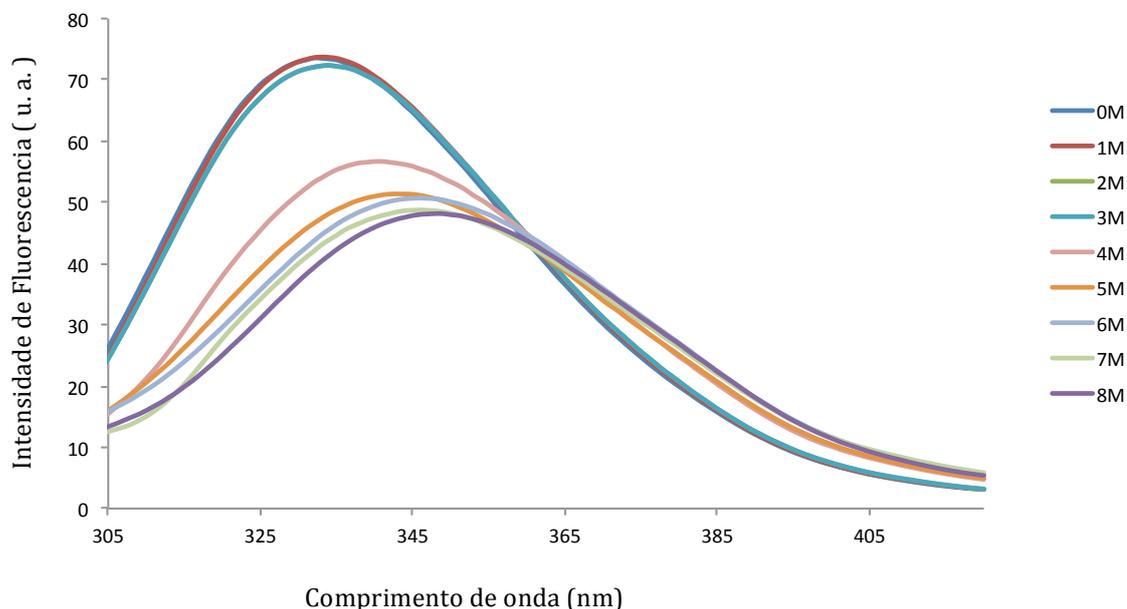
Fonte: Autoria própria

Através da figura 39 visualizamos um deslocamento do perfil de emissão da fluorescência de 330 nm, para 350 nm, característico de triptofanos/tirosinas expostos ao solvente (proteína desenovelada) (LAKOWUCZ, 2006), concluindo dessa forma que a proteína é desnaturada na presença desse agente.

4.3.2.2- Espectroscopia de emissão de Fluorescência da ciclina D3 obtida a partir do recombinante pETSUMO::cicD3

A estabilidade química da ciclina D3 (solúvel) foi avaliada empregando a guanidina como desnaturante pela espectroscopia de emissão de fluorescência intrínseca a 25°C. Novamente, a excitação ocorreu em 280 nm, permitindo que tanto o aminoácido tirosina como o triptofano, pudessem ser avaliados, e as medidas foram monitoradas de 295 nm a 420 nm.

Figura 40. Perfil da desnaturação da ciclina D3 (solúvel) induzida pela guanidina. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de guanidina variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.



Fonte: Autoria própria

A figura 40 demonstrou novamente o deslocamento do perfil de emissão da fluorescência de 330 nm, para 350 nm, a partir de 4M de guanidina, revelando uma proteína um pouco mais estável quimicamente quando comparada à proteína obtida pelo protocolo de reenovelamento.

4.4 Ensaios de Interação CDK11 p58- ciclina D3

4.4.1 Análises de bioinformática

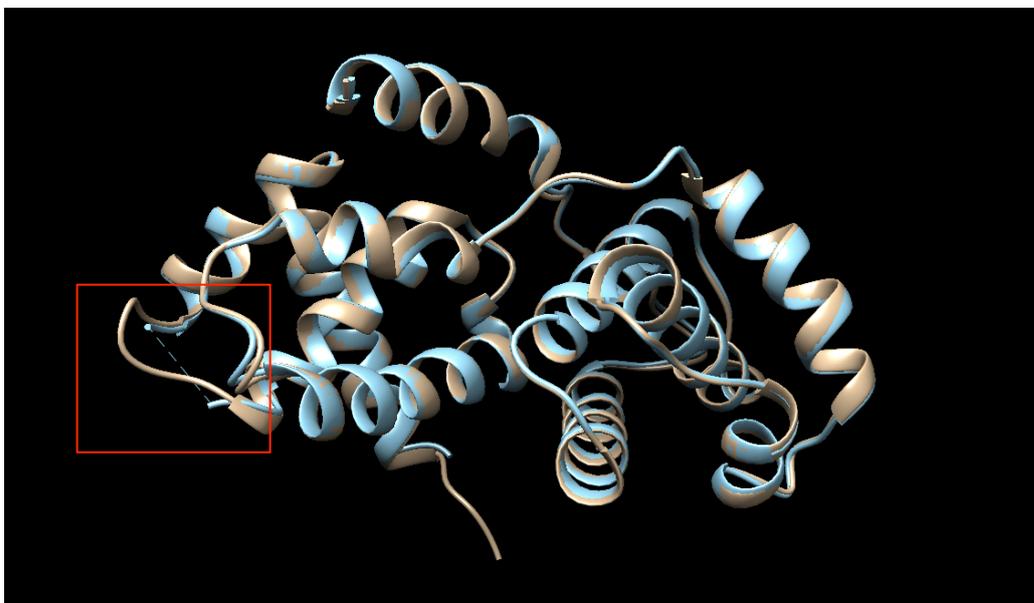
4.4.1.1 Modelagem de região de loop

O programa Modeller, versão 9.21, para o sistema Windows permitiu obter uma estrutura completa da ciclina D3. A partir da estrutura cristalográfica depositada no PDB (código: 3G33), foi realizado uma modelagem baseada em um template único. O programa realizou a modelagem da região de loop e 100 modelos foram criados.

Através do método DOPE (Discrete Optimized Protein Energy), os perfis de energia foram gerados, e os 10 melhores foram selecionados. Os 10 modelos de menor energia selecionados foram validados pelo programa SAVES 5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>), inicialmente pela avaliação no PROCHECK, seguido dos demais programas do SAVES: VERIFY, ERRAT, PROVE e WHATCHECK.

O modelo escolhido, validado pelos programas, foi utilizado como parâmetro para futuras análises.

Figura 41. Modelagem molecular comparativa da ciclina D3 (bege) a partir da estrutura 3G33 (azul). Região modelada destacada em vermelho.



Fonte: Autoria própria

4.4.1.2 Docagem Proteína-Proteína

A proteína CDK11 não possui estrutura cristalográfica depositada no PDB. A criação do seu modelo ocorreu pelo uso do programa Modeller, em que sua sequência Fasta foi alinhada com o PDB de várias estruturas de CDKs associadas à ciclinas. O programa criou 100 modelos, os quais foram avaliados e o de menor energia escolhido. Pela análise do gráfico de Ramachandran, o modelo escolhido apresentava alguns aminoácidos em regiões não permitidas, sendo assim, esse modelo foi submetido à um refinamento pelo programa Chimera. Novos modelos de refinamento foram criados e novamente o de menor energia foi escolhido.

A partir dos dois modelos construídos, tanto da CDK11, como o da ciclina D3, estes foram submetidos ao programa HADDOCK. Para a construção do complexo CDK11Δ-ciclina D3, o programa solicita além da inserção da estrutura de cada molécula, os resíduos pertencentes à interface de interação.

Diversas estruturas de CDKs-ciclinas foram estudadas e a interface de interação entre elas avaliada. Entretanto, optamos pela escolha da estrutura CDK2-ciclina A (código PDB: 1VYW), a qual a proteína CDK2 apresenta 40% de identidade sequencial com a CDK11.

Dessa forma, foi avaliado a posição dos resíduos de aminoácidos que interagem nesse complexo. Em seguida, a sequência da proteína CDK2 foi alinhada com a sequência da proteína CDK11 no programa Multalin Analysis, e analisado qual novo aminoácido ocupava a posição anteriormente vista na CDK2. O mesmo foi feito para a ciclina D3, a qual foi alinhada com a ciclina A, e assim identificado os novos resíduos de aminoácidos que ocupavam a posição de interação. Os novos resíduos de aminoácidos pertencentes à interface de interação CDK11- ciclina D3 foram confirmados e suas novas posições foram analisadas pelo Chimera. A tabela 13 mostra os resíduos de aminoácidos correspondentes em cada complexo referente à interface de interação.

Tabela 13. Comparação entre os resíduos ativos envolvidos diretamente na interação entre os complexos. (A) Comparação entre CDK2 e CDK11 (B) Comparação entre ciclina A e ciclina D3.

(A)

CDK2	CDK11
Treonina 41	Lisina 46
Glutamato 42	Glutamato 47
Valina 44	Fenilalanina 49
Arginina 50	Arginina 55
Lisina 56	Leucina 61
Glutamato 57	Lisina 62
Glutamato 73	Serina 78
Arginina 122	Triptofano 128
Arginina 150	Arginina 156
Arginina 157	Lisina 163
Glicina 153	Glicina 159
Serina 276	Serina 284
Alanina 277	Alanina 285
Lisina 278	Glutamato 286

(B)

ciclina A	ciclina D3
Aspartato 177	Aspartato 18
Tirosina 178	Prolina 19
Aspartato 181	Arginina 26
Tirosina 185	Serina 30
Glutamina 228	Glutamato 74
Lisina 266	Lisina 112
Fenilalanina 267	Leucina 113
Glutamato 268	Arginina 114
Glutamato 269	Glutamato 115
Valina 275	Isoleucina 121
Lisina 288	Arginina 135
Arginina 293	Aspartato 139
Glutamato 295	Glutamato 141
Treonina 303	Lisina 149
Aspartato 305	Aspartato 151
Alanina 307	Alanina 153
Glutamina 317	Alanina 163

Após a inserção dos dados e arquivos no HADDOCK, o complexo CDK11Δ- ciclina D3 foi criado (Figura 42). A inserção do ATP, Mg²⁺, e moléculas de água foi realizado pelo Modeller após a criação do complexo.

Figura 42. Docagem molecular do complexo CDK11Δ- ciclina D3.



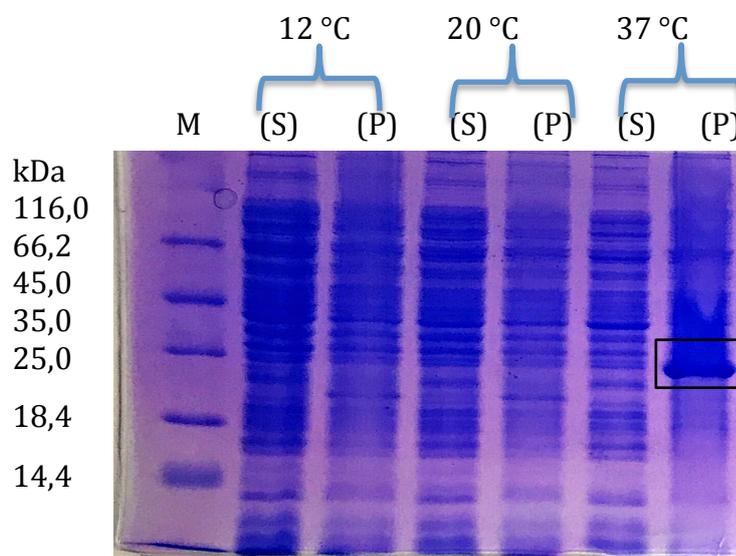
Fonte: Autoria própria

4.4.2 Ensaio *in vitro*

4.4.2.1 Co-expressão heteróloga das proteínas recombinantes CDK11 e ciclina D3

Apesar da realização da co-expressão das proteínas em diferentes condições de temperatura e tempo, não foi possível a formação e visualização do complexo CDK11Δ-ciclina D3 no gel de SDS conforme representado na figura 43.

Figura 43. Perfil de co-expressão do pET28a::CDK11 com o pET28a::cicD3 em células BL21(DE3). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e coradas com azul de Coomassie. S: fração solúvel das células lisadas após tratamento com lisozima, sonicação e centrifugação para separar os materiais insolúveis, P: corpos de inclusão ressuspensos.



Fonte: Autoria própria

Conforme verificado nos testes anteriores, a super-expressão da proteína ciclina D3 em pET28a ocorreu predominantemente na fração insolúvel das células lisadas as quais foram expressas na temperatura de 37 °C por 5 horas. Resultados semelhantes foram verificados para a proteína CDK11 (dados não mostrados).

A proteína CDK11 apresenta massa molecular em torno de 36 kDa, que é muito próximo a da ciclina D3 (32 kDa), sendo assim, difícil distinguir pelo gel de SDS a banda referente a cada proteína, sabendo ainda que elas poderiam estar sobrepostas. Além disso, resultados satisfatórios da co-expressão heteróloga das proteínas recombinantes CDK11 e ciclina D3 é limitada pelo fato de ambas as proteínas possuírem o mesmo marcador de resistência à canamicina.

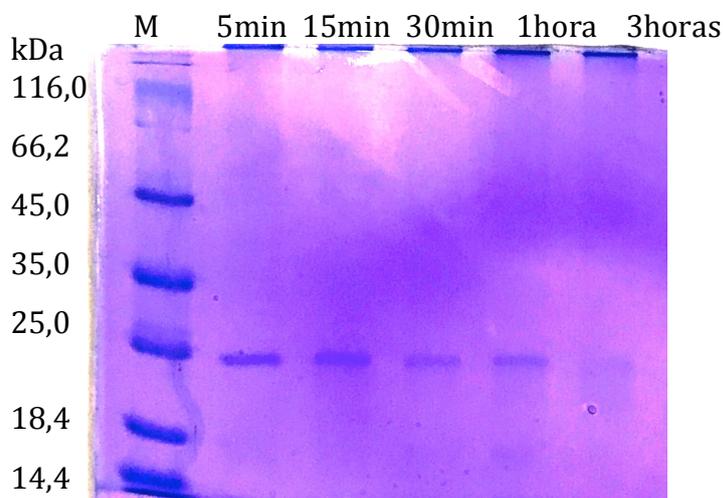
4.4.2.2 Testes de Cross-link das proteínas expressas separadamente

O insucesso da obtenção do complexo através da co-expressão, levou-nos a realizar testes de incubação das proteínas expressas separadamente (proteínas obtidas por reenovelamento).

Ensaio foram realizados através da técnica de cross-link, em que o reagente formaldeído foi utilizado como reagente bifuncional. As condições utilizadas foram baseadas no protocolo descrito por Moharana et al., (MOHARANA et. al., 2014) e os resultados

podem ser visualizados no gel nativo da figura 44.

Figura 44. Teste de Cross-link com adição de 1% de formaldeído nas amostras contendo 10 μ M de cada proteína. As amostras foram submetidas ao gel nativo e coradas com azul de Coomassie. Após a adição do formaldeído, foram avaliados períodos diferentes de incubação (5 min, 15 min, 30 min, 1 hora e 3 horas).



Fonte: Autoria própria

Conforme verificado na figura 44, novamente vimos apenas uma banda no gel SDS-PAGE, a qual poderia ser atribuída tanto para CDK11 como para ciclina D3. Esse resultado, fez com que tentássemos outros protocolos para promover a formação do complexo CDK11 Δ - ciclina D3.

4.4.2.3 Testes de incubação das proteínas expressas separadamente sem cross-link

Após uma vasta busca na literatura, diversos artigos serviram de base para os ensaios seguintes. A partir da estrutura cristalográfica de vários complexos CDKs-ciclinas depositados no PDB, foi avaliado a maneira pela qual os autores conseguiram a formação destes. A tabela 14 traz resumidamente os pontos principais de cada artigo avaliado.

Tabela 14. Condições experimentais para formação de complexos CDKs-ciclinas, os quais possuem estruturas cristalográficas depositadas no PDB.

CÓDIGO PDB	COMPLEXO	CONDIÇÃO	REFERÊNCIA
1FIN	CDK2-CICLINA A	* Proteínas na mesma razão molar; * [] 25 mg/ml ¹ * Tampão: 40 mM Hepes; 0,2 M NaCl; 5mM DTT, pH=7,0.	Jeffrey et al., 1995. Nature.
		* Proteínas na mesma razão molar;	

1VYW	CDK2-CICLINA A	* Incubadas 1 hora a 4°C. * Tampão: 40 mM Hepes; 0,2 mM NaCl; 5mM DTT, pH=7,0.	Pevarello et al., 2004. J.Med. Chem.
5IF1	CDK2-CICLINA A	* Razão molar das proteínas: 1 CDK: 5 CICLINA; * Incubadas em gelo por 15 min. * Tampão: 20 mM Hepes; 100 mM NaCl; 1mM EDTA, 0,01% MTG pH=7,0.	Ayaz et al., 2016. Acs Chem. Biol.
1W98	CDK2- CICLINA E	* Proteínas na mesma razão molar; * Complexo eluido com 20 mM Glutathiona * Tampão: 20 mM Hepes; 0,2 M NaCl; 0,01% MTG, pH=7,0.	Honda et al., 2005. Embo J
1G3N	CDK6- CICLINA K- P18	* Proteínas na mesma razão molar; * Incubadas 1 hora a 4°C. * Tampão: 25 mM Tris-HCL; 200 mM NaCl; 5mM DTT, pH=7,0.	Jeffrey et al., 2000. Genes Dev.
5HQ0	CDK1-CICLINA B- CKS2	* Razão molar das proteínas: 2 CDK: 1 CICLINA; * Incubadas por 20 min a 24°C. * Tampão: 25mM Hepes, 250 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH=7,0.	Brown et al., 2015. Nat Commun
6GUB	CDK2- CICLINA A- Flavopiridol	* Razão molar das proteínas: 1 CDK: 1,5 CICLINA * Tampão: 50mM Tris- HCl; 1M NaCl; 1 mM DTT, pH=7,0.	Wood et al., 2019. Cell Chem Biol.

Conforme mencionado no item 3.4.2.3, os ensaios de formação do complexo CDK11Δ- ciclina D3 foram baseados nos artigos citados na Tabela 14. Os parâmetros foram avaliados quanto a diferença da composição do tampão, da temperatura e do tempo de incubação.

A concentração de 1:5 de CDK11 para ciclina D3 foi estabelecida em todas as condições (proteínas obtidas por reenovelamento). A tabela 14 traz os parâmetros avaliados em cada condição. Os tampões utilizados estão descritos abaixo novamente:

1° Tampão: (40mM Hepes; 200mM NaCl; 5mM DTT, pH: 7,0).

2° Tampão: (40mM Hepes; 1M NaCl; 5mM DTT, pH: 7,0).

3° Tampão: (40mM Hepes; 200mM NaCl; 5mM DTT, 1mM EDTA, pH: 7,0).

4° Tampão: (40mM Hepes; 1M NaCl; 5mM DTT, 1mM EDTA, pH: 7,0).

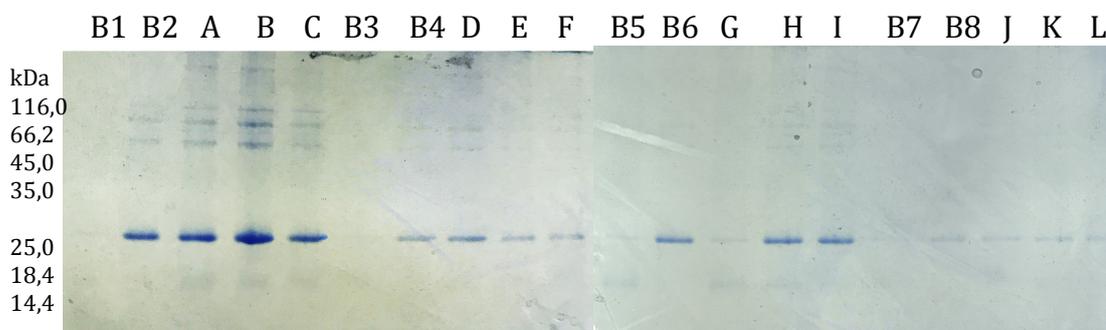
Tabela 15. Condições testadas nos ensaios para promover a formação do complexo CDK11Δ- ciclina D3.

ENSAIO	TAMPÃO	TEMPO	TEMPERATURA
A	1	15min	Gelo
B	1	1 hora	4°C
C	1	2 horas	30°C
D	2	15min	Gelo
E	2	1 hora	4°C
F	2	2 horas	30°C
G	3	15min	Gelo
H	3	1 hora	4°C
I	3	2 horas	30°C
J	4	15min	Gelo
K	4	1 hora	4°C
L	4	2 horas	30°C

Fonte: Autoria própria

O resultado de cada ensaio foi avaliado em gel nativo, permitindo ver a conformação nativa para cada proteína. Além dos complexos testados, foi realizado um controle, preparado nas mesmas condições, tanto para a proteína CDK11, quanto para a proteína ciclina D3. Os resultados podem ser avaliados pela análise dos géis da figura 45.

Figura 45. Ensaios de incubação das proteínas CDK11-ciclina D3. As amostras foram submetidas ao gel nativo e coradas com azul de Coomassie. As letras de A-L são descritas na tabela 9. B1- Ciclina D3 em tampão 1. B2- CDK11 em tampão 1. B3- Ciclina D3 em tampão 2. B4- CDK11 em tampão 2. B5- Ciclina D3 em tampão 3. B6- CDK11 em tampão 3. B7- Ciclina D3 em tampão 4. B8- CDK11 em tampão 4.



Fonte: Autoria própria

O resultado da figura 45 demonstra que apesar do surgimento de bandas acima do peso molecular de cada proteína (em torno de 35 kDa), o padrão do controle da CDK11 restringe essas bandas à esta proteína, pois esta é capaz de formar dímeros com ela mesma (CHI et al., 2011) ou seja, a massa molecular desse dímero é em torno de 70 kDa.

Outros ensaios foram realizados a fim de evitar a formação desses dímeros, como a adição de glicerol nos tampões, porém não obtemos resultados satisfatórios (dados não mostrados).

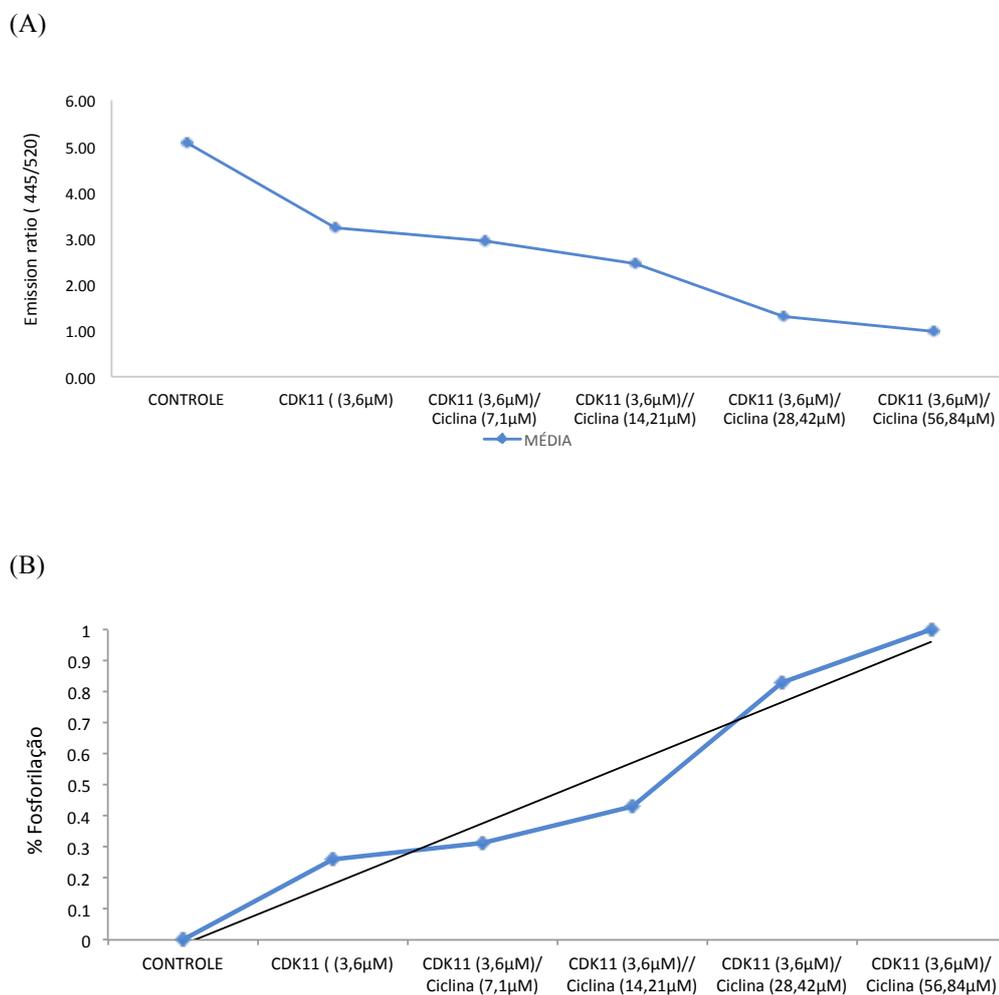
4.4.2.4 Teste de identificação de atividade quinase (CDK11Δ- ciclina D3)

A identificação da interação proteína-proteína utilizando eletroforese em gel nativo com as proteínas purificadas demonstrou ser ineficaz. Diversas causas podem ser atribuídas a este fato, como: a relação da diferença de pI das proteínas com o pH do gel; e a captura da formação transitória deste complexo.

Uma nova alternativa foi investigada para identificar a formação desta interação e sua atividade. Para verificar a atividade deste complexo, foi utilizado o kit Z'-LYTE™ (Invitrogen) o qual é baseado em Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). A leitura foi feita em um leitor de placas de fluorescência (espectrofluorômetro Spectramax Gemini EM (Molecular devices, San Jose, CA, EUA), com $\lambda_{ex} = 400$ nm e $\lambda_{em} = 445$ nm e 520 nm (para cumarina e fluoresceína, respectivamente), a 37 °C a cada 30 segundos por 15 minutos, e os parâmetros de incubação ocorreram conforme descrito no item 3.4.2.4.

Para a proteína ciclina D3 obtida pelo processo de reenovelamento, os resultados da razão de emissão e de % de fosforilação são demonstrados na figura 46 (A e B), respectivamente.

Figura 46. Dados representativos gerados para o complexo CDK11 Δ - ciclina D3 (proteínas obtidas por reenovelamento) com o substrato peptídico do kit Z'-LYTE™ (Ser/Thr 12). O ensaio foi realizado em uma placa de ensaio de 384 poços seguindo o procedimento de otimização do ensaio em 1X Kinase Buffer suplementado com 100 μ M ATP. O gráfico (A) representa os valores da razão de emissão em função da concentração de quinase-ciclina D3 e o gráfico (B) representa a porcentagem de fosforilação calculada em função da concentração de quinase-ciclina D3.

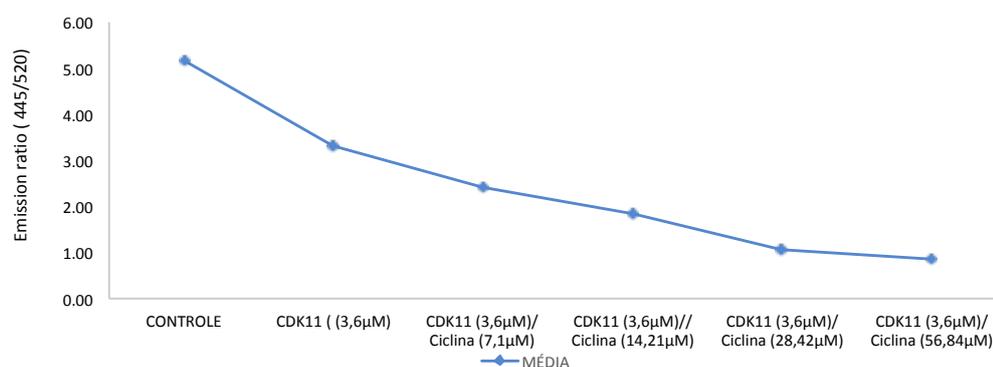


Fonte: Autoria própria

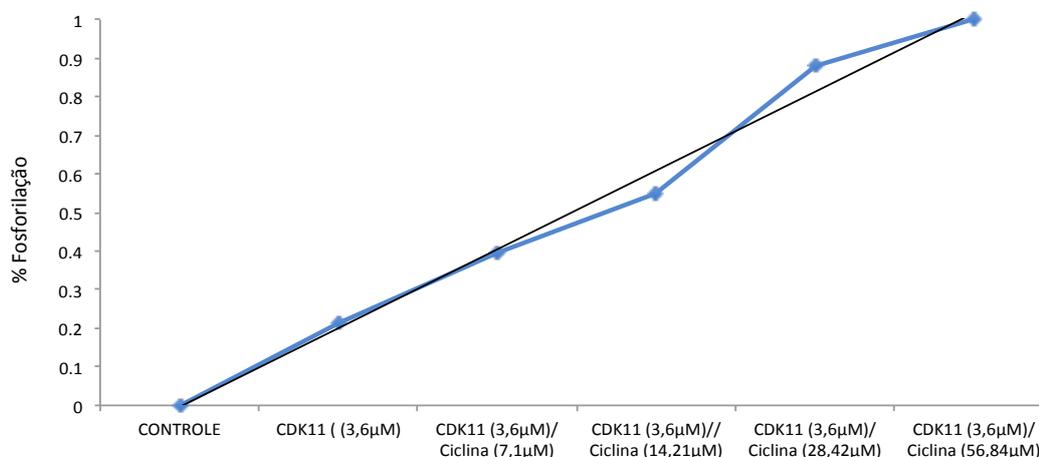
Para a proteína ciclina D3 obtida na fração solúvel, os resultados da razão de emissão e de % de fosforilação são demonstrados na figura 47 (A e B), respectivamente.

Figura 47. Dados representativos gerados para o complexo CDK11 Δ - ciclina D3 (CDK11 obtidas por reenovelamento) com o substrato peptídico Z'-LYTE™ (Ser/Thr 12). O ensaio foi realizado em uma placa de ensaio de 384 poços seguindo o procedimento de otimização do ensaio em 1X Kinase Buffer suplementado com 100 μ M ATP. O gráfico (A) representa os valores da razão de emissão em função da concentração de quinase-ciclina D3 e o gráfico (B) representa a porcentagem de fosforilação calculada em função da concentração de quinase- ciclina D3.

(A)



(B)



Fonte: Autoria própria

De acordo com o resultado apresentado nos gráficos acima, podemos evidenciar que a razão de emissão permanecerá baixa se o substrato for fosforilado e será alta se o substrato não for fosforilado. Para o grupo controle, consideramos a porcentagem de 0% do substrato peptídico Z'-LYTE™ (Ser/Thr 12). Para o grupo CDK11 (3,6 μ M) e Ciclina D3 (56,84 μ M) consideramos a porcentagem de 100% do substrato peptídico Z'-LYTE™ (Ser/Thr 12).

5 DISCUSSÃO

A produção da proteína recombinante ciclina D3 em boas quantidades, com alto nível de pureza e enovelada corretamente, é necessária para entender seu mecanismo e para estudos envolvendo possíveis inibidores. Entretanto, obter proteínas de fontes naturais em larga escala e isoladas, na maioria das vezes, ainda tem sido um obstáculo para as indústrias de biotecnologia (GEISSE e FUX, 2009).

Este estudo propôs validar um protocolo de reenovelamento para obtenção de proteínas de alto interesse científico a partir de um sistema de expressão heterólogo (*E. coli*).

O protocolo de reenovelamento proposto por He e Ohnishi (HE e OHNISHI, 2017) visa purificar a proteína expressa nos corpos de inclusão em três etapas: extração, solubilização e reenovelamento (SINGH e PANDA, 2005). Os corpos de inclusão são isolados por centrifugação devido possuírem uma densidade mais alta; então, eles são solubilizados por uma alta concentração de reagentes caotrópicos; seguidos do reenovelamento pela remoção gradual desses reagentes (HE e OHNISHI, 2017).

Neste protocolo, os autores (HE e OHNISHI, 2017) utilizam um detergente aniônico forte (SDS) para solubilizar as proteínas do corpo de inclusão, removendo-o em seguida, em temperaturas mais baixas com a adição de KCl. Neste estudo, o mesmo detergente foi utilizado, mas sem a adição do KCl, pois o mesmo causou a precipitação da proteína de interesse. O SDS do presente estudo foi removido apenas com baixa temperatura, seguida de centrifugação.

Apesar da alta concentração da proteína obtida pelo protocolo de reenovelamento e com alto grau de pureza, a análise das estruturas secundárias por CD revelou um padrão diferente do encontrado na literatura. Comparando os resultados do CD com o obtido por difração de raios X para a ciclina D3 da estrutura 3G33 (51% hélices, fitas --- β), podemos verificar uma porcentagem de hélices α abaixo do esperado e um valor acima das fitas β .

Possíveis explicações foram atribuídas a esse fenômeno, como a consideração do erro do programa de deconvolução da CDNN de 4,84%, que tende a superestimar as fitas β em dados menores que 208 nm (GREENFIELD e FASMAN, 1969), como também a diferença no valor de estruturas secundárias de ciclinas individuais, daquelas obtidas no complexo CDK-ciclina.

A produção da proteína ciclina D3 na forma nativa (solúvel) apresentou um padrão muito parecido de estruturas secundárias por CD, quando comparado ao resultado da proteína reenovelada. Esse resultado elimina possíveis questionamentos de um reenovelamento

incorreto.

Outros estudos usaram o mesmo protocolo para a produção de outras proteínas. A proteína rOv-M60-like-1 foi expressa como corpos de inclusão no sistema de expressão de *E. coli*. O protocolo de reenovelamento de SDS-KCl foi capaz de produzir uma proteína reenovelada solúvel. O rOv-M60-like-1 demonstrou estar em sua conformação correta devido ao fato de a proteína possuir atividade de metalopeptidase. Os resultados mostraram que a proteína foi capaz de digerir uma mucina submaxilar bovina (BSM) a temperaturas entre 25 e 37°C e pH 2-8. Além disso, a atividade da mucinase foi completamente inibida pela adição do agente quelante iônico EDTA (TA et al., 2020).

A forma ativa da Preniltransferase NovQ (NovQ renovada) foi obtida através da desnaturação e reenovelamento a partir dos corpos de inclusão da NovQ. A proteína recombinante (NovQ) exibe atividade catalítica comparável a outras preniltransferases; esses dados foram verificados pela capacidade da proteína de oxidar menadiona hidroquinol em menadiona após exposição ao ar por 1 h (NI et al., 2020). A atividade desta enzima confirma seu reenovelamento correto, e valida o protocolo de reenovelamento utilizado.

As proteínas HBc-MAGE3 II foram expressas a partir de corpos de inclusão em *E. coli*. Diferentes agentes solubilizantes (ureia, GuHCl e SDS) foram adotados para solubilizar os corpos de inclusão. Os corpos de inclusão de HBc-MAGE3 II não puderam ser dissolvidos efetivamente pela ureia 8M, em contraste, poderiam ser completamente dissolvidos no tampão de GuHCl 6M e SDS a 1%. A estrutura secundária de HBc-MAGE3 II dissolvida em diferentes agentes desnaturantes foi investigada por espectroscopia de CD. As VLPs de HBc exibem espectros típicos da estrutura hélice α com mínimos a 220 e 209 nm. Em contraste, as proteínas desnaturadas por GuHCl não apresentaram uma estrutura secundária discernível. Para HBc-MAGE3 II desnaturada por SDS, foi observado um sinal mais intenso a 209 nm, que pode ser um aumento no conteúdo de hélice α , como frequentemente observado em peptídeos e proteínas desnaturadas por SDS (ZHANG et al., 2020).

Os autores da pesquisa do grupo de Zhang (ZHANG et al., 2020) confirmaram que o uso de SDS para solubilizar corpos de inclusão é capaz de manter a estrutura nativa de muitas proteínas, como visto no estudo para HBc-MAGE3 II. A ligação ao SDS não impede absolutamente a proteína de reenovelar, algumas proteínas como lisozima, albumina sérica bovina (BSA) e ubiquitina podem ser biologicamente ativas na presença de SDS (ZHANG et al., 2020).

Além disso, o fato do SDS residual estar localizado na superfície da proteína nativa de peptídeo único, não afeta a conformação e a bioatividade correta das proteínas. Porém, o SDS

residual pode afetar as interações entre as subunidades das proteínas; logo, se o SDS for adotado, ele deve ser removido o mais completamente possível (ZHANG et al., 2020).

A conformação correta das proteínas obtidas por este protocolo foram também confirmadas através de ensaios de atividade quinase do complexo CDK11 Δ - ciclinaD3. Como verificado, a atividade quinase das CDKs, ocorre quando o complexo heterodimérico CDK-ciclina está formado e com a alça T fosforilada.

O ensaio utilizado neste estudo (quinase Z'-LYTETM) utiliza a transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) entre cumarina e fluoresceína para detecção. Os resultados obtidos da razão de emissão e porcentagem de fosforilação demonstraram resultados semelhantes para as duas ciclinas (nativa e reenovelada).

O substrato de peptídeo Z'-LYTETM Ser/Thr 12 permaneceu totalmente desfosforilado na ausência de ambas as proteínas, o que refletiu numa alta razão de emissão (445/520). Na presença de ambas proteínas, e com o aumento gradativo na concentração da proteína ciclina D3, foi verificado que a razão de emissão (445/520) diminuía e proporcionalmente aumentava a porcentagem de fosforilação.

Em um estudo envolvendo a quinase ativada por AMP (AMPK), em que foi determinada a atividade desta proteína utilizando o kit de ensaio Z'-LYTETM Kinase da Invitrogen (Ser/Thr 23 Peptide), foram investigadas as mudanças na atividade enzimática de AMPK α 2 β 1 γ 1 na presença de uma chaperona molecular. Os autores propuseram um protocolo que obteve resultados semelhantes ao do presente estudo (WILSON et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que, apesar das alterações na porcentagem de estruturas secundárias da proteína ciclina D3 (recombinante e nativa) com relação aos dados cristalográficos, ainda podemos considerá-lo válido. Os dados literários relatados sobre a eficácia do uso do SDS na solubilização de corpos de inclusão e o reenovelamento correto verificados pela atividade do complexo CDK11 Δ - ciclinaD3 validam o protocolo He e Ohnishi (HE e OHNISHI, 2017).

O ensaio de atividade do complexo CDK11 Δ - ciclinaD3 comprova a atividade regulatória das ciclinas. O aumento gradual na concentração da ciclina D3 resultou em uma porcentagem maior da fosforilação do substrato, demonstrando a importância da presença da ciclina na atividade do complexo.

Esses resultados servirão de base para estudos envolvendo a produção de proteínas

recombinantes e para futuros estudos envolvendo possíveis inibidores para este complexo.

7 PARTICIPAÇÃO EM OUTROS PROJETOS

7.1 Purificação e Caracterização Biofísica da CDK8

As proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) são umas das principais linhas de pesquisa do grupo BioQEst. A proteína CDK8 foi alvo da tese de doutorado da aluna Buana Carvalho de Almeida. Infelizmente, a aluna conseguiu obter a proteína a partir do protocolo de reenovelamento, descrito anteriormente, no último semestre do curso. A caracterização biofísica da proteína ocorreu somente através de uma replicata de CD, e para dar continuidade a esse trabalho, os ensaios referentes à essa proteína foram planejados e conduzidos pelas alunas de doutorado Fernanda Coelho e Rebeka de Oliveira Pepino.

7.1.1 CDK8

As CDKs têm sido estudadas como alvo proteico, principalmente devido ao seu papel no controle da progressão do ciclo celular (MURRAY, 1994; MORGAN, 1995). Essas proteínas desempenham o papel de reguladores no processo de transcrição, um processo complexo devido à necessidade de vários fatores de transcrição, incluindo ativadores ou repressores e co-ativadores ou co-repressores da atividade da RNAP II (GALBRAITH et al., 2013).

As quinases dependentes de ciclina, CDK7, CDK8 e CDK9 têm um papel direto na regulação da transcrição, sendo a CDK8 mais complexa, pois está associada a efeitos positivos e negativos na transcrição (NEMET et al., 2014). A RNAP II demonstrou a existência de um submódulo composto pela proteína CDK8, ciclina C e complexos mediadores que possuem ligação fraca e, portanto, podem se ligar de forma reversível (DONNER et al., 2007; GUGLIELMI et al., 2004).

CDK8 tem uma relação consideravelmente importante com as vias de sinalização celular durante o ciclo celular controlado e a progressão do câncer (SZILAGYI e GUSTAFSSON, 2013). Essa quinase regula, por exemplo, o gene p21, que também é regulado pela p53 durante o estresse genotóxico, o que leva à parada do ciclo celular e apoptose (REINHARDT e SCHUMACHER, 2012). A inibição de CDK8 diminui a transcrição de p21, enquanto a superexpressão de CDK8 estimula a transcrição de p21, sugerindo assim que CDK8 estimula a via de p53-p21 e inibe o ponto de restrição celular.

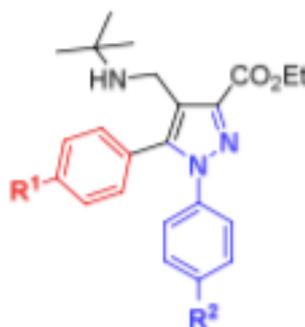
7.1.2 Materiais e Métodos

Os ensaios de expressão, reenovelamento e purificação ocorreram de modo semelhante ao descrito para a proteína ciclina D3. A linhagem utilizada para a expressão do domínio quinase da CDK8 foi a *E. coli* BL21(DE3), e diferiu apenas da composição do meio utilizado, o qual se deu pelo LB otimizado (20g/L de triptona, 10g/L de extrato de levedura, 5g/L NaCl, 4 g/L KCL, 3g/L MgCl₂ e 1% de glicerol) por 5h a 37°C.

Os ensaios de caracterização utilizaram da mesma metodologia descrita anteriormente (determinação do percentual de estrutura secundária, determinação da estabilidade térmica e da estabilidade química). Para a proteína CDK8 foi realizado o ensaio de interação com a molécula de ATP, o qual ocorreu utilizando espectrofotometria de fluorescência. Para este ensaio, as amostras foram excitadas a 280 nm e os dados do espectro de emissão foram coletados de 295 a 420 nm. Os 10 espectros de fluorescência foram adquiridos usando a mesma concentração de proteína e na presença de concentrações crescentes de ATP e MgCl₂ (0 - 800 µM).

Adicionalmente aos ensaios de caracterização biofísica, foi realizada uma parceria com a professora Dr. Fernanda Andreia Rosa, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em que dois potenciais compostos inibidores de CDKs foram avaliados quanto à interação com a proteína CDK8 utilizando o espectrofotômetro de fluorescência. Os 10 espectros de fluorescência foram adquiridos usando a mesma concentração de proteína e na presença de concentrações crescentes dos inibidores 3a e 3f (0 - 200 µM). A estrutura dos compostos é demonstrada na figura abaixo (Figura 48).

Figura 48. 4-aminometil-N-arilpirazóis em forma livre. Composto 3a: R¹: F, R²: H. Composto 3f: R¹: OMe, R²: H.



Fonte: Autoria própria

Além disso, ensaios utilizando linhagens celulares foram realizados para a verificação da eficácia desses compostos. As linhagens utilizadas foram de fibroblastos Balb/C3T3 para controle, e as MDA-MB-231 e MCF-7 as quais são linhagens de câncer de mama, em que ocorre a superexpressão da proteína CDK8.

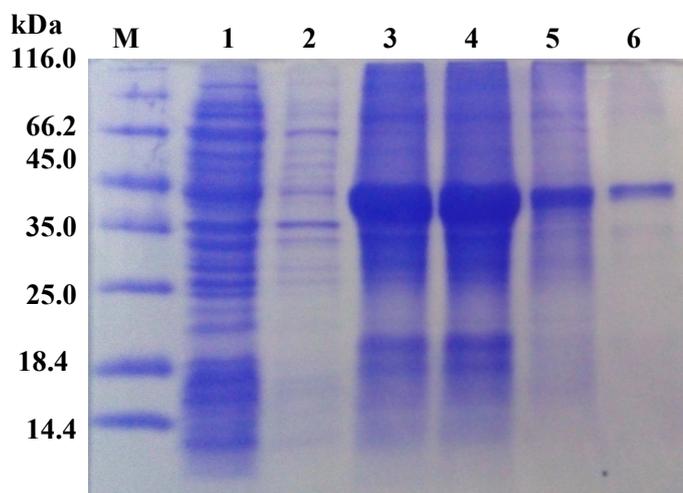
O ensaio realizado foi o de viabilidade celular - MTT, em que as células eucarióticas foram semeadas em placas de 96 poços juntamente com os compostos (10 μ M, 50 μ M e 100 μ M) em solução de DMSO a 0,5% (v/v) (controle negativo), e doxorrubicina (controle positivo). Os ensaios de viabilidade foram realizados após 72 h de incubação pelo método MTT (Amresco LLC). A solução de MTT foi preparada usando 1mg.mL⁻¹ em meio de cultura. A viabilidade celular foi acessada com 100 μ L da solução de MTT pipetada em cada poço, após incubação por 3 h. Em seguida, 100 μ L da solução solubilizante composta por SDS (Synth) a 70% (v/v), DMSO a 29% (v/v) e ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) a 1% (v/v) foram adicionados em cada poço e incubado por 60 minutos. A absorbância foi lida a 570 nm utilizando o leitor de placas Biotek Synergy HT.

7.1.3 Resultados e Discussão

7.1.3.1 Expressão, reenovelamento e purificação da CDK8

A expressão do pET28a-CDK8 recombinante foi obtida em células BL21(DE3) e a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade metálica Ni-NTA. Observaram-se bandas únicas de cerca de 45 kDa após superexpressão e purificação, a partir do SDS-PAGE 15% (Figura 49), o que estava próximo da massa molecular prevista na construção do recombinante da CDK8. O rendimento máximo para 1 litro de meio de cultura de *E. coli* foi de 45 mg de proteína recombinante ou 45 μ g mL⁻¹ de CDK8.

Figura 49. SDS-PAGE 15% da expressão e purificação de CDK8 usando afinidade de metal Ni-NTA. M: marcador de proteína (Protein Unstained Marker (Thermo Scientific)); 1: lisado após centrifugação de células sonicadas (fração solúvel); 2: lavagem por precipitado (corpos de inclusão) com Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); 3: precipitado antes da adição de solução de SDS a 1%; 4: precipitado após solubilização com solução de SDS a 1% e choque térmico a 4°C (amostra aplicada à coluna); 5: fração não ligada à coluna de afinidade; 6: fração eluída com imidazol 300 mM.



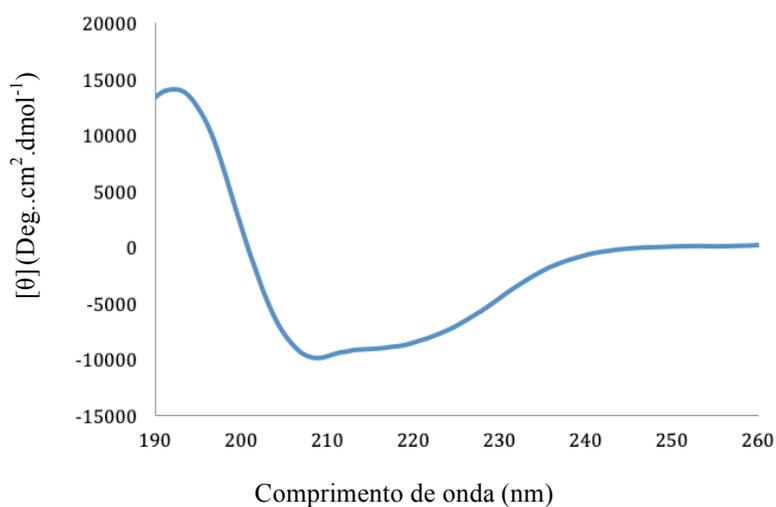
Fonte: Autoria própria

7.1.3.2 Ensaios de Caracterização Estrutural da CDK8

7.1.3.2.1 Determinação do percentual de estrutura secundária da proteína CDK8

O espectro de dicroísmo circular da CDK8 mostrou bandas características de proteínas contendo principalmente hélices α : dois picos pronunciados próximos a 222 nm e 208 nm e um máximo pronunciado próximo a 193 nm (GREENFIED, 2006) (Figura 50).

Figura 50. Elipticidade média de resíduos $[\theta]$ de CDK8. O espectro de CD representa uma proteína característica de hélices α e folhas β .



Fonte: Autoria própria

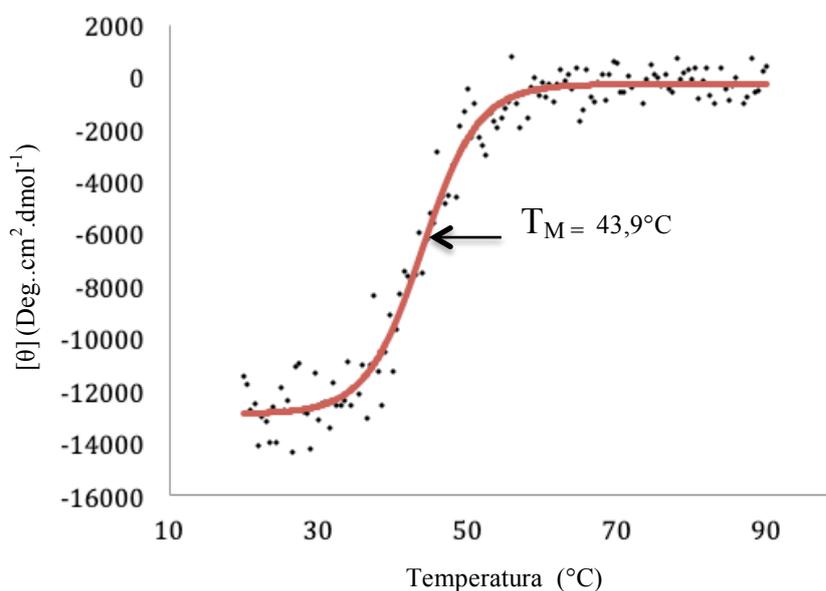
Após o tratamento dos dados utilizando 13 espectros de base de 205 nm a 260 nm, foi possível observar que a proteína apresenta cerca de 30% de hélices α e 19% de folhas β . Nesta opção, o erro do programa é relatado em 4,84% (CDNN MANUAL DO USUÁRIO).

Comparando os resultados do CD com o obtido por difração de raios X para CDK8, onde a proteína apresenta 33 % de hélices α e de 9% de folhas β (código PDB - 5hvy) é possível confirmar que o resultado obtido está próximo do esperado, considerando que alguns conjuntos tendem a superestimar folhas β se houver dados menores que 208 nm (GREENFIELD e FASMAN, 1969).

7.1.3.2.2 Determinação da estabilidade térmica da proteína CDK8

A variação da elipticidade molar da proteína foi monitorada a 208 nm, aumentando a temperatura de 20°C para 90°C, a partir de incrementos de 1°C. Os dados foram tratados com o Adaptador de Boltzmann usando o programa Origin2019 (Figura 51).

Figura 51. Transição da desnaturação térmica da CDK8. A concentração da proteína estava em 4 μ M em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β -mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados a 208 nm. A temperatura de transição - T_m , foi de 43,9°C, obtida a partir da regressão sigmoidal.



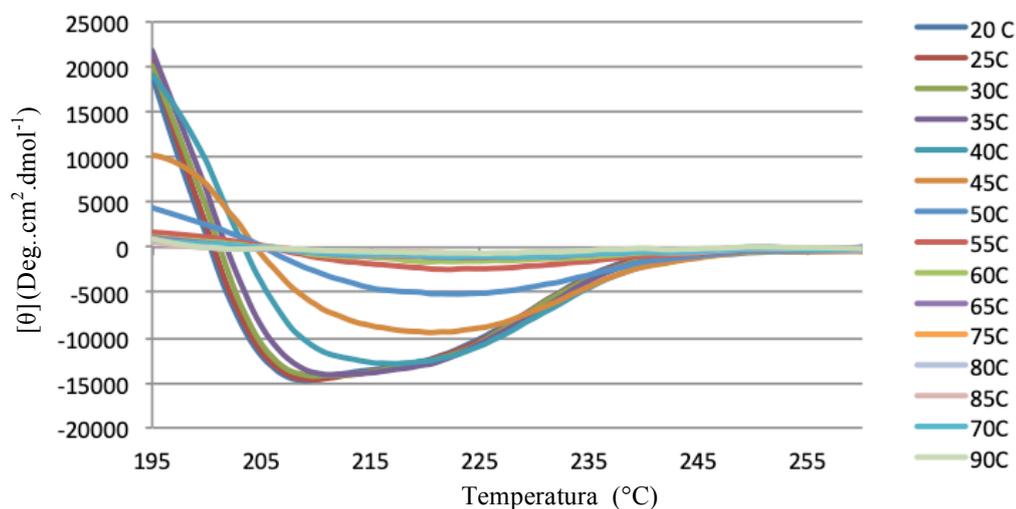
Fonte: Autoria própria

Após o tratamento dos dados, foi possível verificar que a proteína perde metade da sua estrutura a partir de 43,9°C. Esses dados concordam com Brown et al., (BROWN et al., 2015) que registram valores entre 40 - 50°C para outras CDKs.

Uma nova análise foi realizada em diferentes comprimentos de onda, e temperatura

variando de 20 a 90°C, com incrementos de 5°C (Figura 52).

Figura 52. Transição da desnaturação térmica da CDK8. A concentração da proteína estava em 4 µM em tampão Tris-HCl 20mM, NaCl 50mM, glicerol 5% e β-mercaptoetanol 10mM, pH=7,4. A curva de desnaturação foi construída a partir de espectros de CD monitorados entre 195 a 208 nm.

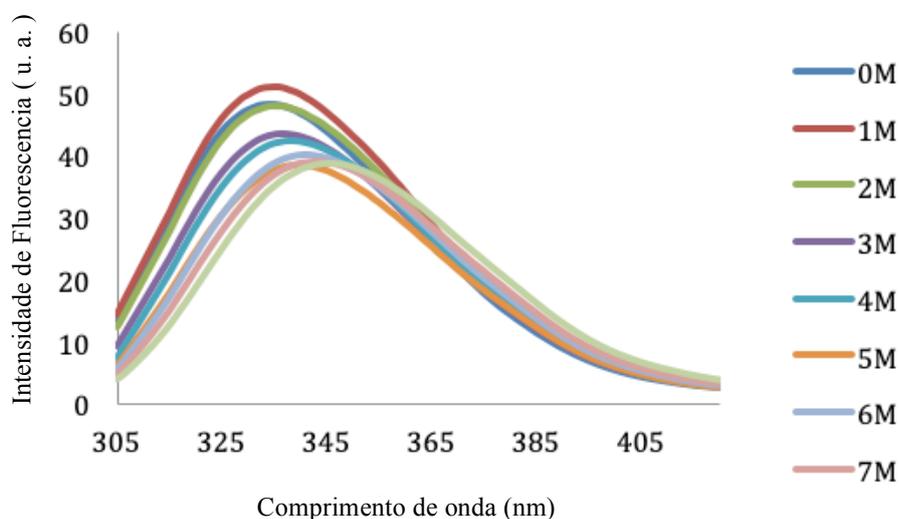


Fonte: Autoria própria

7.1.3.2.3 Determinação da estabilidade química da proteína CDK8

A desnaturação da proteína CDK8 foi verificada com o aumento da concentração de ureia de 0M para 8M. A perda da estrutura terciária é mais pronunciada a partir de 3M de ureia, observada pelo deslocamento da emissão máxima de 334 nm para 345 nm (Figura 53).

Figura 53. Perfil da desnaturação da CDK8 induzida pela ureia. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ureia variando de 0 a 8M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 310 a 420 nm, com excitação em 295 nm a 25°C.



Fonte: Autoria própria

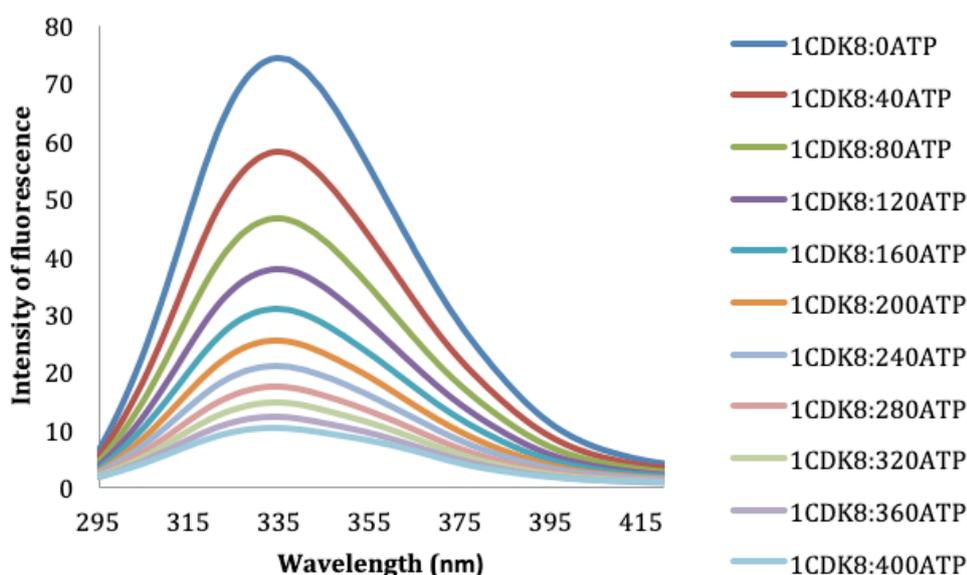
7.1.3.2.4 Ensaios de interação com ATP e inibidores 3a e 3f usando espectroscopia de emissão de fluorescência

As CDKs são proteínas capazes de transferir um grupo fosforila ($-\text{PO}_3^{2-}$) do fosfato γ do ATP para hidroxilas nas cadeias laterais dos resíduos de Ser, Thr ou Tyr de seus substratos peptídicos (ALBERTS et al., 2010), para que ocorra esse mecanismo, as CDKs precisam estar associadas à suas parceiras ciclinas.

Contudo, a interação das CDKs com a molécula de ATP é possível de acontecer, mesmo sem a presença da ciclina, o que permite averiguar a conformação da proteína.

Lakowicz (LAKOWICZ, 2006) afirma que é possível verificar a interação de uma proteína com seu ligante pela diminuição da fluorescência. O presente estudo investigou a interação da proteína CDK8 com a molécula ATP e constatou que em altas concentrações do ligante houve supressão da fluorescência observada no espectro de emissão de fluorescência CDK8 (Figura 54).

Figura 54. Perfil de interação da CDK8 na presença de ATP. As amostras foram expostas a diferentes concentrações de ATP variando de 0 a 800 μM . As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm a 25°C.



Fonte: Autoria própria

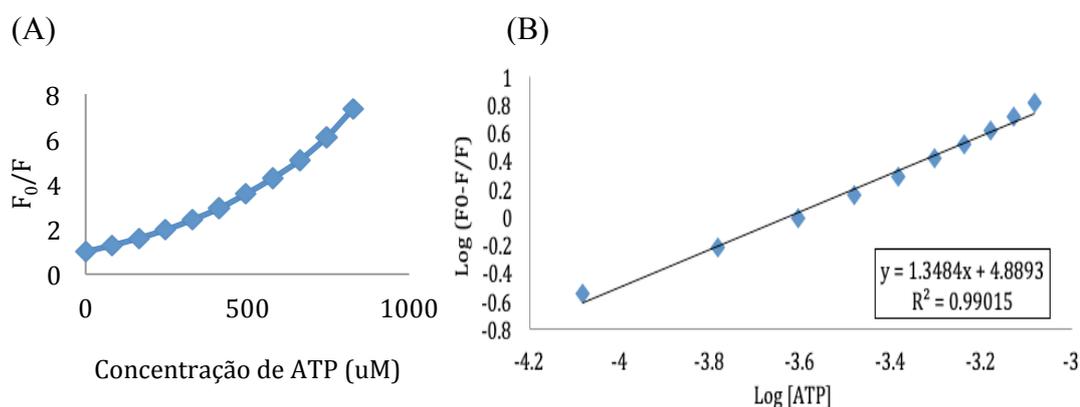
No entanto, a supressão da fluorescência pode ocorrer pelo efeito colisional (ou dinâmico), que ocorre quando o supressor entra em contato com o fluoróforo e retorna ao seu estado fundamental sem emitir um fóton, ou por supressão estática quando um complexo não

fluorescente no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor (LAKOWICZ, 2006).

Tais exclusões podem ser únicas ou combinadas. Quando combinado, um gráfico $[Q]$ versus F_0 / F (onde $[Q]$ = concentração supressora, F_0 = intensidade máxima fluorescente inicial e F = intensidade máxima fluorescente após supressão na concentração supressora) diverge da linearidade, e é o caso do CDK8 (Figura 55A) (MOREIRA et al., 2015). Além disso, usando a equação 3, um gráfico de $\log (F_0 - F / F)$ versus $\log [Q]$ (Fig. 55B) fornece em seu coeficiente angular (n) o número de locais de ligação e seu coeficiente linear ($\log K_a$), a constante de associação da proteína com o ligante (MOREIRA et al., 2015; PRADO, 2017)

$$\log \left\{ \frac{F_0 - F}{F} \right\} = \log K_a + n \log [Q] \quad (3)$$

Figura 55. Perfil de interação da CDK8 na presença de ATP. (A) F_0 / F versus $[Q]$ para CDK8 em função da concentração de ATP. (B) Ajuste linear do $\log (F_0 - F / F)$ versus $\log [ATP]$ para CDK8.

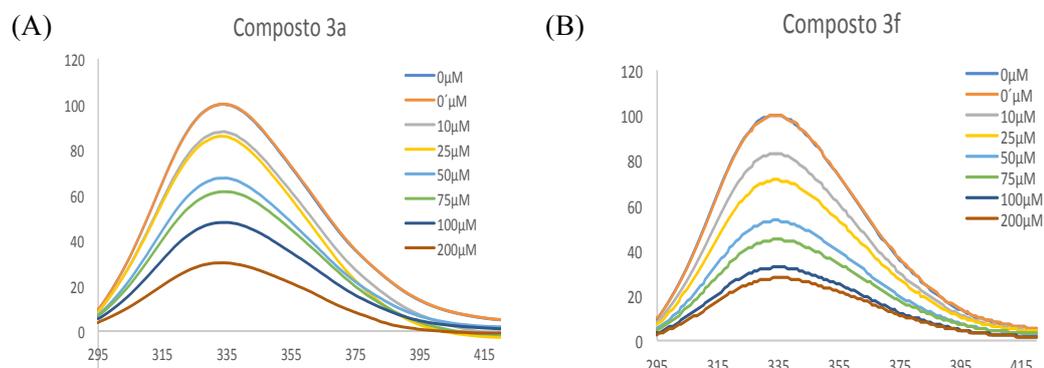


Fonte: Autoria própria

Considerando $n = 1,35$ e $K_a = 7,75.104 \text{ M}^{-1}$, podemos dizer que ocorre um tipo de interação moderada, uma vez que as constantes de associação apresentam valores inferiores a 10^4 , os quais estão associados a interações fracas com o ATP (LAWS e CONTINO, 1992). Inversamente, a constante de dissociação (K_d) para CDK8 em relação ao ATP, é de $12,9 \mu\text{M}$.

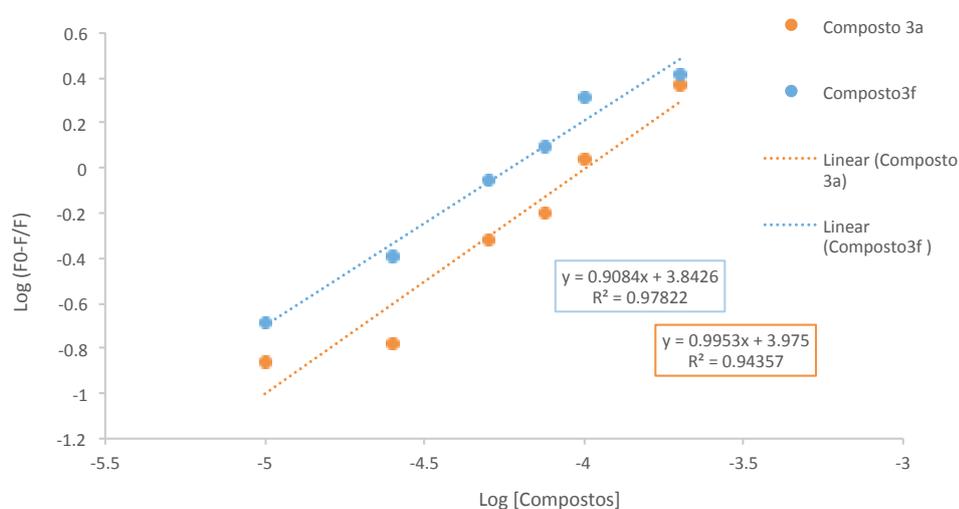
Ensaio semelhante a este foram realizados para os dois compostos anteriormente citados. Devido aos compostos pertencerem à outro grupo de pesquisa, não iremos citar as condições de síntese. Entretanto sabemos que são compostos análogos ao ATP, e que se a interação com a proteína CDK8 ocorrer de modo semelhante aos resultados obtidos para a molécula de ATP, teremos resultados satisfatórios.

Figura 56. Perfil de interação da CDK8 na presença dos possíveis inibidores. As amostras foram expostas a diferentes concentrações dos compostos 3a e 3f, variando de 0 a 200 μ M. As medidas de fluorescência foram monitoradas de 295 a 420 nm, com excitação em 280 nm, a 25°C. (A) Composto 3a (B) Composto 3f.



Fonte: Autoria própria

Figura 57. Perfil de interação da CDK8 na presença dos compostos 3a e 3f. F_0 / F versus $[Q]$ para CDK8 em função da concentração dos compostos, e Ajuste linear do $\log (F_0 - F / F)$ versus $\log [Compostos]$ para CDK8.



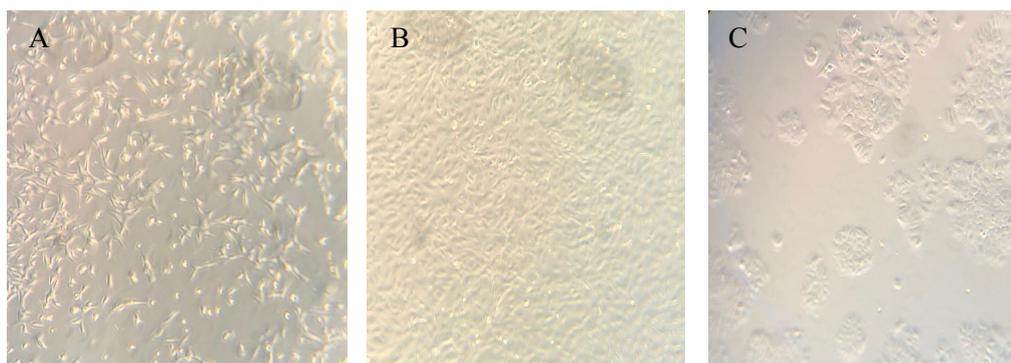
Fonte: Autoria própria

Considerando $n = 0,91$ e $K_a = 9,44 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para o composto 3a e $n = 0,98$ e $K_a = 6,96 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o composto 3f, podemos dizer que ocorre em ambos os compostos um tipo de interação fraca. Inversamente, a constante de dissociação (K_d) para CDK8 em relação ao composto 3a é de 106 μ M e do composto 3f é de 143 μ M, contra um K_d de 12,9 μ M na presença do ATP.

7.1.3.3 Ensaios de Viabilidade Celular

Conforme citado anteriormente, os compostos 3a e 3 foram testados em 3 diferentes tipos de linhagens: Balb/C3T3, células de fibroblasto para controle, e as MDA-MB-231 e MCF-7, as quais são linhagens de câncer de mama. As imagens referentes à cada uma delas estão ilustradas abaixo (Figura 58).

Figura 58. Linhagens celulares mantidas em cultivo. (A) Balb/C3T3; (B) MDA-MB-231, (C) MCF-7.



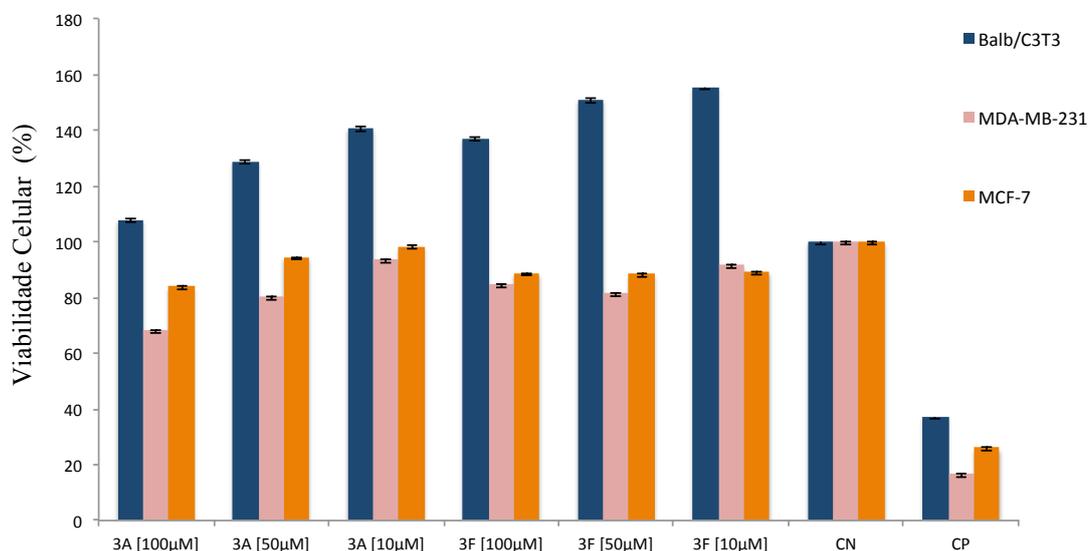
Fonte: Autoria própria

A absorbância foi quantificada em um leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 570 nm, e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas pela equação 4:

$$\frac{(A\tau - AB)}{(AU - AB)} \times 100 \quad (4)$$

Os resultados estão demonstrados na figura abaixo (Figura 59).

Figura 59. Experimentos de viabilidade celular. Viabilidade de células Balb/C3T3, MDA-MB-231 e MCF-7 na presença de cada composto (10 μ M, 50 μ M e 100 μ M) após 72 h de incubação, avaliada por métodos colorimétricos MTT. CP – controle positivo e CN – controle negativo.



Fonte: Autoria própria

O ensaio de MTT demonstrou que os compostos 3a e 3f não foram capazes de diminuir a viabilidade celular dessas linhagens, caracterizando-os como ineficazes candidatos para a terapia do câncer de mama.

Esses resultados concordam com os obtidos por espectroscopia de emissão de fluorescência, em que os compostos apresentaram um tipo de interação fraca com a proteína CDK8, sendo essa uma possível razão para a ineficácia destes compostos no crescimento das culturas celulares.

7.1.4 Conclusão

Nesta pesquisa, o DNA que codifica o domínio quinase da proteína CDK8 foi clonado e a proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21(DE3). Após re-enovelamento, a proteína recombinante foi purificada utilizando colunas de cromatografia de afinidade ao níquel e foram realizados estudos de caracterização biofísica. A análise estrutural por dicroísmo circular indicou que a proteína exibe cerca de 30% de hélices α e 19% de folhas β , e uma temperatura crítica de desnaturação de 43,9°C. A desnaturação química utilizando espectrofotometria de emissão de fluorescência revelou a perda da estrutura terciária a partir de 3M de ureia. Além disso, foi demonstrada uma afinidade de ligação moderada da proteína com seu ligante ATP, e fraca com os compostos avaliados. Esses resultados estão de acordo

com os testes em linhagens de células, que demonstraram não serem capazes de diminuir a viabilidade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; KAMRAN, M.; SU, W.; HAIQI, W.; ALI, S.; BILEGJARGAL, B.; AHMAD, S.; LIU, T.; CAI, T.; HAN, Q. Application of uniconazole improves photosynthetic efficiency of maize by enhancing the antioxidant defense mechanism and delaying leaf senescence in semiarid regions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 38, p. 855-69, 2019.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464p.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical chemistry for the life sciences**. 2. ed. New York: W. H. Freeman and Company: Artmed, 2011. 618 p.

AYAZ, P.; ANDRES, D.; KWIATKOWSKI, D.A.; KOLBE, C.; LIENAU, P.; SIEMEISTER, G.; LÜCKING, U.; STEGMANN, C.M. Conformational Adaption May Explain the Slow Dissociation Kinetics of Roniciclib (BAY 1000394), a Type I CDK Inhibitor with Kinetic Selectivity for CDK2 and CDK9. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 11, p. 1710-9, 2016.

BAESHEN, N.A.; BAESHEN, M.N.; SHEIKH, A.; BORA, R.S.; AHMED, M.M.M.; RAMADAN, H.A.I.; SAINI, K.S.; REDWAN, E.M. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, London, p.13- 141, 2014.

BARBASH, O.; EGAN, E.; PONTANO, L.L.; KOSAK, J.; DIEHL, J.A. Lysine 269 is essential for cyclin D1 ubiquitylation by the SCFFbx4/ α B-crystallin ligase and subsequent proteasome-dependent degradation. **Oncogene**, London, v. 28, p. 4317-25, 2009.

BENZENO, S.; LU, F.; GUO, M.; BARBASH, O.; ZHANG, F.; HERMAN, J.G.; KLEIN, P.S.; RUSTGI, A.; DIEHL, J.A. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. **Oncogene**, London, v. 25, p. 6291–303, 2006.

BOTTIROLI, G.; CROCE, A.C. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 3, p. 189-210, 2004.

BROWN, N. R.; KOROLCHUK, S.; MARTIN, M. P.; STANLEY, W. A.; MOUKHAMETZIANOV, R.; NOBLE, M. E. M.; ENDICOTT, J. A. CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. **Nature Communications**, London, v. 6, n. 1, p. 6769, 2015.

BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2005.

CAO L.; CHEN F.; YANG X.; XU W.; XIE J.; YU L. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, p. 10, 2014.

CHEN, B.B.; GLASSER, J.R.; COON, T.A.; ZOU, C.; MILLER, H.L.; FENTON, M.; MCDYER, J.F.; BOYIADZIS, M.; MALLAMPALLI, R.K. F-box protein FBXL2 targets cyclin D2 for ubiquitination and degradation to inhibit leukemic cell proliferation. **Blood**, Washington, v. 119, p. 3132-41, 2012.

CHI, Y.; ZHANG, C.; ZONG, H.; HONG, Y.; KONG, X.; LIU, H.; ZOU, W.; WANG, Y.; YUN, X.; GU, J. Thr-370 is responsible for CDK11p58 autophosphorylation, dimerization, and kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 286, n. 3, p. 1748-1757, 2011.

CHI, Y.; HUANG, S.; LIU, M.; GUO, L.; SHEN, X.; WU, J. Cyclin D3 predicts disease-free survival in breast cancer. **Cancer Cell International**, London, p. 15:89, 2015.

CHOHAN, T. A.; QAYYUM, A.; REHMAN, K.; TARIQ, M.; AKASH, M. S. H. An insight into the emerging role of cyclin-dependent kinase inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of advanced cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Issy les Moulineaux Cedex v. 107, p. 1326-1341, 2018.

CHOI, Y.L.; ANDERS, L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. **Oncogene**, London, v.33, n.15, p. 1890-903, 2014.

CUOMO, M.E.; PLATT, G.M.; PEARL, L.H.; MITTNACHT S. Cyclin-cyclin-dependent kinase regulatory response is linked to substrate recognition. **Journal of Biological Chemistry**, Amsterdam v. 286, n. 11, p. 9713-25, 2011.

DAVIS, G.D.; ELISEE, C.; MEWHAM, D.M.; HARRISON, R.G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli. **Biotechnology and Bioengineering**. New York, v. 65, n. 4, p. 382-388. 1999.

DESAI, D.; WESSLING, H.C.; FISHER, R.P.; MORGAN, D.O. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 15, n.1, p. 345-50, 1995.

DIEHL, J.A.; ZINDY, F.; SHERR, C.J. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v.11, n. 8, p. 957-72, 1997.

DING, Z.Y.; LI, R.; ZHANG, Q.J.; WANG, Y.; JIANG, Y.; MENG, Q.Y.; XI, Q.L.; WU, G.H. Prognostic role of cyclin D2/D3 in multiple human malignant neoplasms: a systematic review and meta-analysis, **Cancer Medicine**, Hoboken, v. 8, n.6, p. 2717-29, 2019.

DIPIPPO, A.J.; PATEL, N.K.; BARNETT, C.M. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer: Past, Present, and Future. **Pharmacotherapy**, Hoboken, v. 36, N.6, p. 652-67, 2016.

DONNER, A.J.; SZOSTEK, S.; HOOVER, J.M.; ESPINOSA, J.M. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 27, n. 1, p. 121-33, 2007.

DUAN, Y.; HE, X.; YANG, H.; JI, Y.; TAO, T.; CHEN, J.; HU, L.; ZHANG, F.; LI, X.; WANG, H.; SHEN, A.; LU, X. Cyclin D3/CDK11p58 Complex Involved in Schwann Cells Proliferation Repression Caused by Lipopolysaccharide. **Inflammation**, New York, v.33, n.3, p. 189-199, 2010.

ELLEDGE, S.J.; HARPER, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 6, n.6, p. 847-52, 1994.

FOSSUM, S.; CROOKE, E.; SKARSTAD, K. Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in Escherichia coli. **Embo Journal**, Hoboken, v. 26, n.21, p. 4514-22, 2007.

FUSTÉ, N.P.; FERREZUELO, F.; GARÍ, E. Cyclin D1 promotes tumor cell invasion and metastasis by cytoplasmic mechanisms. **Molecular & Cellular Oncology**, Philadelphia, v. 3, n. 5, p. e1203471, 2016.

GALBRAITH, M. D.; ALLEN, M. A.; BENSARD, C. I.; WANG, X.; SCHWINN, M. K.; QIN, B.; LONG, H. W.; DANIELS, D. L.; HAHN, W. C.; DOWELL, R. D.; ESPINOSA, J. M. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. **Cell**, Cambridge, v. 153, n. 6, p. 1327-1339, 2013.

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

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, H.; DUVAUD, S'E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: WALKER, J. M. (ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, p. 571-607, 2005.

GEISSE, S.; FUX, C. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. **Methods in Enzymology**. London, v. 463, p. 223-38, 2009.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, Washington, v.8, n.10, p. 4108-4116, 1969.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 6., p. 2876-890, 2006.

GUGLIELMI, B.; BERKUM, N.L.V.; KLAPHOLZ, B.; BIJMA, T.; BOUBE, M.; BOSCHIERO, C.; BOURBON, H.M.; HOLSTEGE, F.C.; WERNER M. A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n.18, p. 5379-91, 2004.

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.

HYDBREND, P.; MALUMBRES, M.; SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 17, n.5, p. 280–292, 2016.

HONDA, R.; LOWE, E.D.; DUBININA, E.; SKAMNAKI, V.; COOK, A.; BROWN, N.R.; JOHNSON, L.N. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. **Embo Journal**. Hoboken, v. 24, n. 3, p. 452-63, 2005.

HUANG W.; WANG, H. Potential biomarkers of resistance to CDK4/6 inhibitors: a narrative review of preclinical and clinical studies. **Translation Breast Cancer Research**, Hong Kong, v.2, 2020.

HUNT, T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. **Seminars in Cell Biology**, London, v. 2, n.4, p. 213–222, 1991.

JEFFREY, P.D.; RUSSO, A.A.; POLYAK, K.; GIBBS, E.; HURWITZ, J.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N.P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. **Nature**, Berlin, v. 376, n. 6538, p. 313-320, 1995.

JEFFREY, P.D.; TONG, L.; PAVLETICH, N. Structural basis of inhibition of CDK–cyclin complexes by INK4 inhibitors. **Genes & Development**. Cold Spring Harbor, v. 14, n.24, p. 3115-3125, 2000.

KAPOOR, M. (1996). How to cross-link proteins. **Cellular, Molecular and Microbial Biology Division**, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4.

KI, M.R.; PACK, S.P. Fusion tags to enhance heterologous protein expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 104, n.6, p.2411-25, 2020.

KREK, W.; NIGG, E.A. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. **Embo Journal**, Hoboken, v. 10,v.2, p. 305-16, 1991.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006. 953 p.

LIN, D.I.; BARBASH, O.; KUMAR, K.G.; WEBER, J.D.; HARPER, W. KLEIN-SZANTO, A.J.; RUSTGI, A.; FUCHS, S.Y.; DIEHL, J.A. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. **Mol. Cell** v. 24, n.3, p.355–366, 2006.

LIU, M.; LIU, H.; CHEN, J. Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review). **Oncology Reports**, Athens v. 39, n. 3, p. 901-911, 2018.

LIU, J.; PENG, Y.; WEI, W. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. **Trends in Cell Biology**, London, v.32, n.1, p 30-44, 2022.

LOYER, P.; TREMBLEY, J. H.; GRENET, J. A.; BUSSON, A.; CORLU, A.; ZHAO, W.; KOCAK, M.; KIDD, V. J.; LAHTI, J. M. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and

splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. **Journal of Biological Chemistry**, New York v. 283, n. 12, p. 7721-7732, 2008.

LUNDSTROM, K. Structural genomics and drug discovery. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Hoboken, v.11, n. 2 p. 224-238, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, Berlin, v.9, n. 3, p, 153-66, 2009.

MALUMBRES, M.; HARLOW, E.; HUNT, T.; HUNTER, T.; LAHTI, J.M.; MANNING, G.; MORGAN, D.O.; TSAI L.H.; WOLGEMUTH, D.J. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature Cell Biology**, Berlin, v. 11, n.11, p. 1275-6, 2014.

MATTHEWS, H.K.; BERTOLI, C.; BRUIN, R.A.M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 23, p. 74-88, 2022.

MILES, A. J.; WALLACE B.A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 45, n. 18, p. 4859-72, 2016.

MOHARANA K.; ZABEAU, L.; PEELMAN, F.; RINGLER, P.; STAHLBERG, H.; TAVERNIER, J.; SAVVIDES, S.N. Structural and mechanistic paradigm of leptin receptor activation revealed by complexes with wild-type and antagonist leptins. **Structure**, Cambridge, v.6, p.866-77, 2014.

MOIOLA C.; LUCA P.; GARDNER K.; VAZQUEZ E.; SIERVI A. Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 9, n. 15, p. 3119-3126, 2010.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**, São Paulo v. 38, n. 2, p. 227-32, 2015.

MORENO-BUENO, G.; RODRIGUEZ-PERALES, S.; SANCHEZ-ESTEVEZ, C.; HARDISSON, D.; SARRIO, D.; PRAT, J.; CIGUDOSA, J.C.; MATIAS-GUIU, X.; PALACIOS, J. Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer, **Oncogene**, London, v. 22, p. 6115-6118, 2003.

MURRAY, A.W. Cyclin-dependent kinases: regulators of the cell cycle and more. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 1, p. 191-5, 1994.

MUSGROVE, E.A.; CALDON, C.E.; BARRACLOUGH, J.; STONE, A.; SUTHERLAND, R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nature Reviews Cancer**, Berlin, v. 7, n.8, p. 558-72, 2011.

MYERS, L.C.; KORNBERG, R.D. Mediator of transcriptional regulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 729-49, 2000.

NEMET, J.; JELICIC, B.; RUBELJ, I.; SOPTA, M. The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription. **Biochimie**, Issy-Les-Moulineaux, v. 97, p. 22-7, 2014.

NI, W.; ZHENG, Z.; LIU, H.; WANG, P.; WANG, H.; SUN, X.; YANG, Q.; FANG, Z.; TANG, H.; ZHAO, G. Combining mutagenesis on Glu281 of prenyltransferase NovQ and metabolic engineering strategies for the increased prenylated activity towards menadione. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 104, n.10, p. 4371-82, 2020.

OLIVEIRA, C.; DOINGUES L. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v 102, p. 81–92, 2018.

OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceutical. **Biomed Research International**, London, p. 4216060, 2019.

PAWLONKA, J.; RAK, B.; AMBROZIAK, U. The regulation of cyclin D promoters – review. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 27, p. 100338, 2021.

PEVARELLO, P.; BRASCA, M.G.; AMICI, R.; ORSINI, P.; TRAQUANDI, G.; CORTI, L.; PIUTTI, C.; SANSONNA, P.; VILLA, M.; PIERCE, B.S.; et. al. 3-Aminopyrazole inhibitors of CDK2/cyclin A as antitumor agents. 1. Lead finding. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 47, n. 13, p. 2267-80, 2004.

PEYRESSATRE, M.; PRÉVEL, C.; PELLERANO, M.; MORRIS, M. C. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. **Cancers**, Basel, v. 7, n. 1, p. 179-237, 2015.

PRADO, A. K. M. **Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a proteína transaldolase isolada de corynebacterium pseudotuberculosis**. Orientadora: Fátima Pereira de Souza. 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.

QIE, S.; DIEHL, J.A. Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, London, v 67, p. 159-170, 2020.

RAMANUJAM N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In: Ltda CJWS. **Encyclopedia of analytical chemistry**, p. 20-56, 2000.

REINHARDT, H.C.; SCHUMACHER, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, London, v. 28, n.3, p. 128-36, 2012.

RIAL, D.V.; CECCARELLI, E.A. Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 25, n.3, p. 503-7, 2002.

RUDGE S.T.; LADISCH M.R. Industrial Challenges of Recombinant Proteins. **Advances in Biochemical Engineering- Biotechnology**, Cham CH-6330, v. 171, p. 1-22. 2020.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; LALLENA, M. J.; SANFELICIANO, S. G.; DE DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: recent advances (2015-2019). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 29, n. 20, p. 126637, 2019

SIMMONS L.A. K.; MAYHEW M.B.; ORLANDO D.A.; JIN Y.; LI Q.; HUANG C.; REED S.I.; MUKHERJEE S.; HAASE S.B. Cyclin-dependent kinases are regulators and effectors of oscillations driven by a transcription factor network. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 45, p. 669-79, 2012.

SINGH S.; PANDA A.K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**. Osaka, v. 99, n.4, p. 303-10, 2005.

SOLOMON M.J.; FIRPO E. J.; KOFF A.; ROBERTS J.M. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 14, p. 4889-4901, 1994.

SZILAGYI, Z.; GUSTAFSSON, C. M. Emerging roles of Cdk8 in cell cycle control. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1829, n. 9, p. 916-20, 2013.

TA, B. T. T.; NGUYEN, D. L.; JALA, I.; DONTUMPRAI, R.; PLUMWORASAWAT, S.; AIGHEWI, O.; ONG, E.; SHAWLEY, A.; POTRIQUET, J.; SAICHUA, P.; VAN, D. A.; SRIPA, B.; HOKKE, C. H; SUTTIPRAPA, S. Identification, recombinant protein production, and functional analysis of a T M60-like metallopeptidase, secreted by the liver fluke opisthorchis viverrini. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 75, p. 1-8, 2020.

TRIPATHI, N.K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne CH-1015 v. 7, p.420, 2019.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 15, p. 773-80, 2010.

WHITTAKER, S. R.; MALLINGER, A.; WORKMAN, P.; CLARKE, P. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. **Pharmacology and Therapeutics**, Philadelphia, v. 173, p. 83-105, 2017.

WILSON, E.B.; RUBEL, C.R.; SCHISLER, J.C. Non-radiometric Cell-free Assay to Measure the Effect of Molecular Chaperones on AMP-activated Kinase Activity. **Bio-Protocol**, Sunnyvale, v.9, n.8, p. e3218, 2019.

WOLBERGER, C. How structural biology transformed studies of transcription regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.296, p. 100741, 2021.

WOOD, D.J.; ENDICOTT, J.A. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin Family. **Open Biology**, London, v. 8, n. 9, p. 180112, 2018.

WOOD, D.J.; KOROLCHUK, S.; TATUM, N.; WANG, L.Z.; ENDICOTT, J.A.; NOBLE, M.E.M.; MARTIN, M.P. Differences in the Conformational Energy Landscape of CDK1 and CDK2

Suggest a Mechanism for Achieving Selective CDK Inhibition. **Cell Chemical Biology**, Cambridge, v. 26, n.1, p. 121-130, 2019.

YOSHIDA, A.; CHOI, J.; JIN, H. r.; LI, Y.; BAJPAI, S.; QIE, S.; DIEH, L. J.A., Fbxl8 suppresses lymphoma growth and hematopoietic transformation through degradation of cyclin D3. **Oncogene**, London, v 40, p. 292-306, 2020.

YU, J.; LEUNG, W.K.; EBERT, M.P.A.; LEONG R.W.L.; TSE, P.C.H.; CHAN, M.W.Y.; BAI, A.H.C.; TO, K.F.; MALFERTHEINER, P.; SUNG, J.J.Y Absence of cyclin D2 expression is associated with promoter hypermethylation in gastric cancer, **British Journal of Cancer**, London, v. 88, n.10, p.1560–1565, 2003.

ZHANG, Z.; YAO, R.; LI, J.; WANG, Y.; BOONE, C.W.; LUBET, R.A.; YOU M. Induction of invasive mouse skin carcinomas in transgenic mice with mutations in both H-ras and p53. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 3, n.10, p. 563–74, 2005.

ZHANG, J.; SU, G.; LIN, Y.; MENG, W, LAI, J.K.L.; QIAO, L.; LI, X.; XIE X. Targeting cyclin-dependent kinases in gastrointestinal cancer therapy. **Discovery Medicine**, Timonium, v.27, n.146, p. 27–36, 2019.

ZHANG, Y., YIN, S., ZHANG, B., BI, J., KIU, Y., SU, Z. HBc-based virus-like particle assembly from inclusion bodies using 2- methyl-2, 4-pentanediol. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 89, p. 233-37, 2020.

ZHANG, J.; GAN, Y.; LI, H.; YIN, J.; HE, X.; LIN, L.; XU, S.; FANG, Z.; KIM, B.; GAO L.; DING, L.; ZHANG, E.; MA, X.; LI, J.; LI, L.; XU, Y.; HORNE D.; XU, R.; YU, H.; GU, Y.; HUANG, W. Inhibition of the CDK2 and Cyclin A complex leads to autophagic degradation of CDK2 in cancer cells. *Nature Communications*, Berlin, v. 13, p. 13- 2835, 2022.

ZONG, H.; CHI, Y.; WANG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, L.; CHEN, H.; JIANG, J.; LI, Z.; HONG, Y.; WANG, H.; YUN, X.; GU, J. Cyclin D3/CDK11p58 complex is involved in the repression of androgen receptor. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 27, n. 20, p. 7125-7142, 2007.