

ESTUDO ESTRUTURAL DA CDK9 HUMANA E SUA INTERAÇÃO COM LIGANTES POR TÉCNICAS DE BAIXA RESOLUÇÃO

Beatriz Lauriano de Oliveira

Profa. Dra. Fernanda Canduri

Universidade de São Paulo

beatrizlauriano@usp.br

Objetivos

O projeto objetiva aumentar a expressão e melhorar a solubilidade da proteína-cinase dependente de ciclina 9 humana (CDK9) ao fusioná-la com a proteína parceira de fusão SUMO, no sistema de expressão bacteriano (*Escherichia coli*), que será obtida pela técnica do DNA recombinante. Será realizada uma análise comparativa da estrutura da CDK9 nativa com a estrutura obtida por refolding (tese de mestrado da aluna Diandra Alencar) e sua interação com candidatos a inibidores que possam vir a ser aplicados em terapias oncológicas.

Métodos e Procedimentos

Para obtenção do DNA recombinante pET28a-SUMO-CDK9 a princípio foram utilizadas as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*HI seguido da T4 DNA ligase, cujo produto foi transformado na cepa de propagação de *E. coli* One Shot Top10. Devido aos resultados obtidos, foi realizada a troca dos primers, substituindo o sítio de restrição da *Bam*HI pelo sítio da *Eco*RI. Após obtenção do recombinante, a expressão ocorrerá em baixas temperaturas (20°C ou menos) e durante um tempo mais longo (cerca de 72h), a fim de otimizar a solubilidade da proteína. A purificação será feita por cromatografia de afinidade, pois a proteína terá um His-tag N-terminal.

Resultados

Ainda não foi possível obter o recombinante a partir da transformação utilizando os novos

primers. Foi realizado um teste de digestão individual das enzimas de restrição. Na Figura 1 é possível observar que as duas enzimas utilizadas conseguem linearizar o vetor. As bandas do DNA linearizado estão acima da banda de DNA circular (controle). Entretanto, a banda da *Xba*HI está mais destacada do que a da *Eco*RI, mostrando baixa eficiência da enzima *Eco*RI.

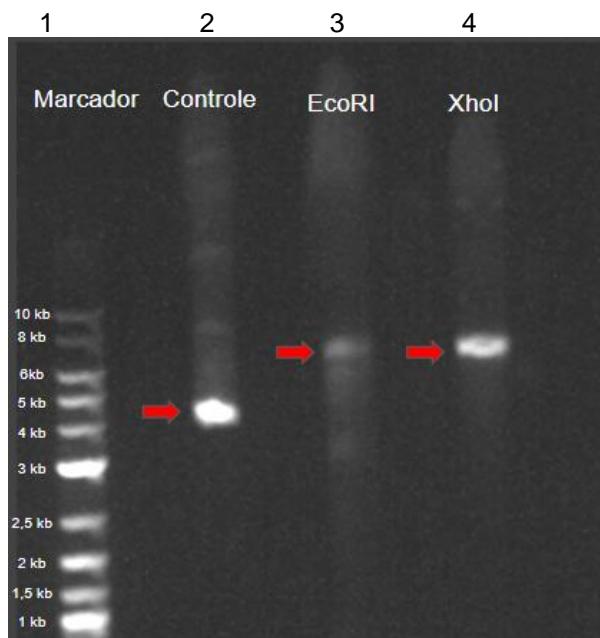


Figura 1: Teste da digestão do DNA circular. 1- marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo); 2- Controle (DNA circular); 3- DNA linearizado com a enzima EcoRI; 4- DNA linearizado com a enzima XbaI.

Conclusões

Após seguidas tentativas de transformação que não resultaram na obtenção do plasmídeo recombinante, foi levantada a hipótese de problemas na digestão dupla do incerto de DNA e do vetor. Foi trocado o sítio de restrição dos primers, pois a enzima *EcoRI* tem 100% de atividade no tampão utilizado, o que não ocorre com a *BamHI*. O teste da digestão individual mostrou uma grande diferença na atividade enzimática, portanto, uma mudança no protocolo da digestão dupla pode ser necessária como adicionar a *Xhol* um tempo após o início da reação com a *EcoRI* ou aumentar a concentração de *EcoRI* na reação. Novos ensaios serão realizados.

Referências Bibliográficas

ALENCAR, Diandra Pinheiro. **Obtenção e caracterização estrutural da proteína humana Quinase Dependente de Ciclina 9 (CDK9) utilizando o sistema bacteriano de *Escherichia coli*.** 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Alsfouk A. **Small molecule inhibitors of cyclin-dependent kinase 9 for cancer therapy.** J Enzyme Inhib Med Chem. 2021 Dec;36(1):693706.doi:10.1080/14756366.2021.1890726. PMID: 33632038; PMCID: PMC7919902.

Sánchez-Martínez C, Lallena MJ, Sanfeliciano SG, de Dios A. **Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015-2019).** Bioorg Med Chem Lett. 2019 Oct 15;29(20):126637. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126637. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31477350.

Wang Z, Li H, Guan W, Ling H, Wang Z, Mu T, Shuler FD, Fang X. **Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility.** Protein Expr Purif. 2010 Oct;73(2):203-8.doi:10.1016/j.pep.2010.05.001. Epub 2010 May 10. PMID: 20457256.