

Entendimento dos níveis da proteína e das condições de cristalografia para a kinase PRPF4, envolvida em regulação de splicing

Gabriela Figueiredo Ramos*, Gabriela Gomes, Gabriela Minervino, Katlin Brauer Massirer

Resumo

Uma das kinases associadas à regulação de proteínas de splicing, a Pre-mRNA processing factor 4B kinase (PRPF4), foi também relacionada à progressão do câncer de mama. Tal proteína tem função e mecanismo ainda desconhecidos. Esse projeto visa a contribuir para o entendimento da estrutura do domínio de kinase e dos níveis endógenos da proteína PRPF4 em células de câncer de mama. Por isso, propusemos expressar e purificar o domínio de kinase da proteína PRPF4B utilizando sistema de células de inseto. Em seguida estamos avaliando condições de cristalografia.

Palavras-chave:

PRPF4, splicing alternativo, kinase.

Introdução

As proteínas *kinases* são responsáveis pela fosforilação de substratos e muitas vezes atuam com outras proteínas que participam de cadeias de fosforilação. Tais cadeias são de extrema importância para a transdução de sinais e, conseqüentemente, para realização de diversos processos celulares. Entretanto, os estudos acerca das *kinases* são, em sua maioria, focados em um pequena porcentagem do total conhecido, o que leva a uma necessidade de se pesquisar aquelas com poucas informações.¹

Dentre as possíveis funções de uma *kinase* está a atuação indireta no processo de *splicing* alternativo. Para que ocorra o *splicing* alternativo, são acionadas maquinarias celulares das quais faz parte a *kinase* PRPF4. Sabe-se que tal proteína tem relação com o receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), cuja expressão é aumentada em casos de câncer de mama.² Por isso, é interessante investigar como se dá essa relação bem como procurar entender melhor a estrutura da PRPF4 por meio da cristalografia.

Resultados e Discussão

O domínio *kinase* da proteína PRPF4 foi expresso em sistema de células eucarióticas de inseto SF9 (40kDa). A proteína foi confirmada por avaliação de massa intacta.

Figura 1: filtração em gel da proteína PRPF4.

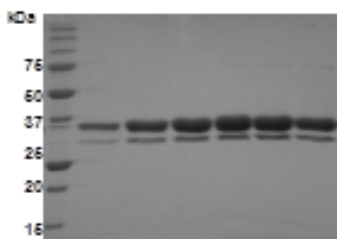
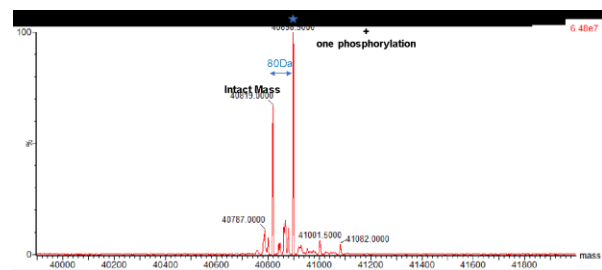


Figura 2: confirmação da massa intacta de PRPF4.



A proteína purificada está sendo testada em ensaios para verificar a atividade enzimática. Em paralelo estão sendo testados tampões com diferentes combinações de sais e detergentes para melhorar a obtenção de cristais. Para parte de função celular, os níveis de expressão de PRPF4 foram inicialmente avaliados em linhagens de células de câncer de mama e os experimentos estão sendo repetidos em triplicatas para apresentação de conclusões.

Conclusões

Com os experimentos realizados obtivemos a expressão da proteína recombinante PRPF4 em sistema de células de inseto. A expressão não havia sido possível inicialmente em bactérias. As pesquisas que têm sido realizadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG, Unicamp) e no SGC Unicamp certamente contribuirão para o objetivo de melhor entendimento de tal proteína.

Agradecimentos

À Dra. Katlin B. Massirer e às equipes do Laboratório de RNA e microRNAs em Doenças (CBMEG, UNICAMP) e do Structural Genomics Consortium (SGC, UNICAMP). Esse projeto foi financiado pela UNICAMP e pelo CNPq por meio da bolsa PIBIC.

¹ Edwards, A. M. et al. Too many roads not taken. *Nature* 470, 163–5 (2011).
² Corkery, D. P. et al. PRP4K is a HER2-regulated modifier of taxane sensitivity. *Cell Cycle* 14, 1059–1069 (2014).