

Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2007/05000-8
Vigência: 1/9/2008 a 31/8/2012

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) compreendem uma família de proteínas que podem ser subdivididas em dois grupos funcionais majoritários baseados na sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional. Já foram identificadas 13 CDKs humanas (CDK1-CDK13). A CDK2 é o membro mais bem caracterizado, funcional e estruturalmente. As CDKs 7, 8, 9, 10 e 11 são importantes reguladores transcricionais. O fator geral de transcrição TFIIF contém a CDK7-ciclina H e o complexo de proteínas associadas aos hormônios da tireoide contém a CDK8-ciclina C. A CDK9-ciclina T1 pertence ao fator de alongação da transcrição P-TEFb, conhecidos por fosforilar o CTD da subunidade maior da RNAP II, tão bem quanto os passos subsequentes da expressão gênica. Os complexos da CDK10 se associam com o fator de transcrição Ets2, e a CDK11 associa-se com a CK2, e está envolvida com “splicing” de RNA, além de ser um regulador transcricional. A CDK9 foi recentemente clonada e expressa em *E. coli*, mas há poucos estudos funcionais e estruturais relacionados a ela. As referidas CDKs serão clonadas, expressas e purificadas seguindo o protocolo estabelecido para a CDK9 e, de posse dessas proteínas, estudos estruturais e funcionais serão realizados. Essas proteínas serão bioquimicamente caracterizadas e serão efetuados ensaios da atividade enzimática na presença de inibidores. Serão realizados ainda estudos das estruturas secundárias por técnicas de dicróismo circular e das estruturas terciárias, pela cristalização das referidas CDKs, e consequente resolução das estruturas. O estudo das CDKs envolvidas na regulação transcricional irá contribuir para o entendimento da relação estrutura-função dessas CDKs e sua relação com oncogenes e supressores de tumor. O estudo estrutural irá contribuir para o desenvolvimento de inibidores químicos de baixo peso molecular que possam inibir especificamente essas CDKs.

119 Clonagem, expressão e estudo de especificidade das calicreínas teciduais humanas hK5 e hK7

Luciano Puzer
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Processo 2006/53607-6
Vigência: 1/1/2007 a 31/12/2010

As calicreínas humanas hK5 e hK7 fazem parte de uma família de 15 serino-peptidases (hK1-hK15) que, à exceção de hK1, hK2 e hK3, foram recentemente identificadas e caracterizadas como calicreínas. Pouco se conhece sobre a especificidade dessas enzimas, mas alguns dados

experimentais sugerem que hK5 e hK7 podem estar participando ativamente de processos fisiopatológicos relacionados à descamação da pele. Portanto, a caracterização de suas especificidades é crucial, não apenas para mapear os sítios de interação enzima/substrato, como também para o desenvolvimento de substratos e/ou inibidores específicos e/ou seletivos para ambas as enzimas. Pretende-se clonar e expressar hK5 e hK7 usando dois vetores de expressão, pET-28a(+) e pPIC9K. O primeiro vetor será usado para produzir as enzimas em células de *E. coli*, visando à produção de anticorpos monoclonais. As enzimas usadas no estudo de especificidade serão produzidas com o vetor pPIC9K em células de *P. pastoris*. A caracterização da especificidade das hK5 e hK7 será feita com o uso de peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência, baseados na sequência de referência Abz-KLRSSKQ-EDDnp, que tem se mostrado eficiente no estudo de outras peptidases. Com os dados cinéticos obtidos a partir do estudo de especificidade, a pesquisa se empenhará no desenvolvimento de substratos fluorescentes seletivos e/ou específicos para as hK5 e hK7. Além disso, usando bibliotecas de inibidores de serino-peptidases, pretende-se buscar inibidores seletivos e/ou específicos para essas enzimas.

120 Estudo molecular e funcional da oncoproteína SET

Andréia Machado Leopoldino
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2006/06334-4
Vigência: 1/4/2007 a 31/3/2011

A abordagem deste projeto é aquela utilizada durante o pós-doutorado (PD) no National Institute of Health (NIH, EUA) (Processo FAPESP 05/03380-2) e constitui uma nova linha de pesquisa a ser implantada e estabelecida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. O objetivo central é o estudo de proteínas (marcadores) selecionadas como marcadores tumorais usando estudos funcionais baseados principalmente em RNA de interferência. Recentemente, validamos em amostras de tumores de cabeça e pescoço um novo marcador tumoral, a proteína SET (resultados obtidos durante o PD no exterior), que havia sido identificada também pelo grupo do dr. Silvio Gutkind durante um *screening* usando microarranjos de RNA em tumores de cavidade oral. Na presente proposta, será dada continuidade ao estudo desse marcador tumoral para aumentar o conhecimento sobre sua função e verificar seu potencial como alvo terapêutico. Importantes resultados foram obtidos nessa primeira avaliação da SET, que mostraram sua participação em uma das vias mais importantes para a tumorigênese, a via PTEN/AKT (artigo