



**Universidade:
presente!**

UFRGS
PROPEAQ



XXXI SIC

21. 25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

Evento	Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Marcação fluorescente da via de sinalização MAPK/ERK em glioblastoma
Autor	JÚLIA CAROLINE MARCOLIN
Orientador	GUIDO LENZ

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular - Instituto de Biociências - UFRGS
Marcação fluorescente da via de sinalização MAPK/ERK em glioblastoma

Autor: Júlia Caroline Marcolin
Orientador: Guido Lenz

Células de um mesmo tumor apresentam diferenças em suas dinâmicas de funcionamento, tanto de caráter genético quanto epigenético. Comportamentos unicelulares geralmente diferem da dinâmica média populacional e células de uma mesma população respondem de maneira diferente a um mesmo estímulo, fazendo com que haja um perfil heterogêneo na ativação de vias de sinalização, por exemplo. Nesse processo, tem-se a atividade das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), as quais são uma família de proteínas que transmitem sinais do meio extracelular para o núcleo celular através de uma cascata de sinalização. Dentre as MAPKs, a quinase regulada pela sinalização extracelular (*extracellular signal-regulated kinase* - ERK) participa da regulação de mecanismos relacionados a crescimento, divisão e diferenciação celular, embriogênese e reparo de tecidos. Após receber o sinal extracelular, ocorre uma ativação sequencial das proteínas quinases que irão fosforilar seus substratos, propiciando a transcrição de genes específicos que regulam as respostas celulares. A desregulação desta via está relacionada ao desenvolvimento de câncer, uma vez que altera funções celulares que propiciam a tumorigênese.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é produzir uma linhagem celular expressando estavelmente um repórter fluorescente de translocação de ERK quinase (KTRs) e verificar a dinâmica da ativação de ERK em células únicas de glioblastoma (GBM). Para isso, a linhagem de glioblastoma U138-MG foi marcada com repórter fluorescente KTR (Addgene #90227). O sistema KTR utilizado é uma técnica que permite acompanhar a ativação de ERK em células únicas através da translocação núcleo-citoplasmática da fluorescência. Esse vetor possui uma sequência para produção de proteína fluorescente, um sinal de localização nuclear e um sinal de exportação nuclear, fazendo com que a fluorescência verde das células seja homogeneamente distribuída entre o núcleo e o citoplasma. A ativação da quinase levará ao acúmulo da fluorescência no citoplasma e uma redução na razão de fluorescência núcleo-citoplasmática dependendo se a quinase está ativa ou inativa. Esse vetor foi inserido ao genoma das células da linhagem U138 por transdução lentiviral e as células transduzidas foram tratadas com puomicina para se obter uma linhagem com expressão estável da proteína fluorescente. Para validar a expressão da proteína fluorescente, células foram plaqueadas em baixa densidade e tratadas com inibidores e ativadores da sinalização de ERK e analisadas através de microscopia de fluorescência com fotos sequenciais para registrar a ativação e inibição da via ERK nas células. Dados preliminares utilizando a linhagem transduzida demonstram que a expressão da proteína fluorescente é estável e capaz de responder a inibição com 0,2 μ M de PD184352 em aproximadamente 15 minutos. Após a remoção do meio contendo inibidor, as células foram capazes de reativar a sinalização de ERK em intervalos de tempo entre 5 e 30 minutos, demonstrando que a linhagem é capaz de responder e demonstrar diferenças na sinalização da via de interesse. A expectativa agora é verificar se há diferenças entre as células na dinâmica dessas ativações e inativações e verificar se há correlação dessa ativação com fenótipos celulares.