



# MARCAÇÃO FLUORESCENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK/ERK EM GLIOBLASTOMA

**Júlia Caroline Marcolin**  
Orientador: Guido Lenz

## INTRODUÇÃO

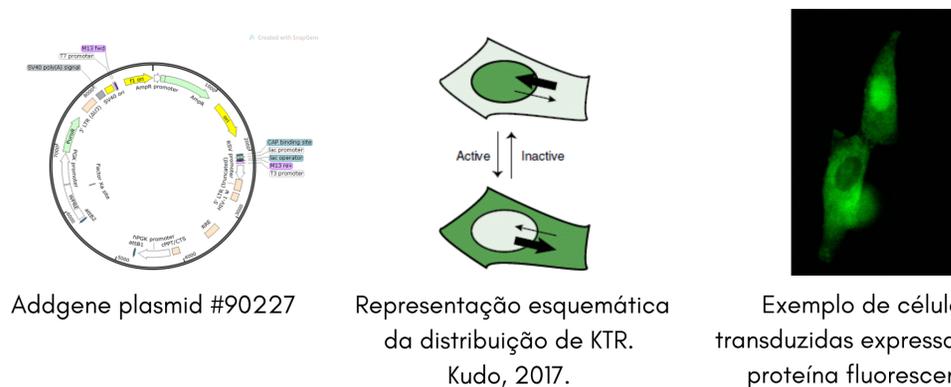
Células de um mesmo tumor apresentam diferenças em suas dinâmicas de funcionamento, tanto de caráter genético quanto epigenético. A atividade das vias de sinalização ocorre através de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), sendo a quinase regulada pela sinalização extracelular (*extracellular signal-regulated kinase - ERK*) a responsável pelos processos de crescimento, divisão e diferenciação celular, embriogênese e reparo de tecidos. A desregulação desta via está relacionada ao desenvolvimento de câncer, uma vez que altera funções celulares que propiciam a tumorigênese.

## OBJETIVO

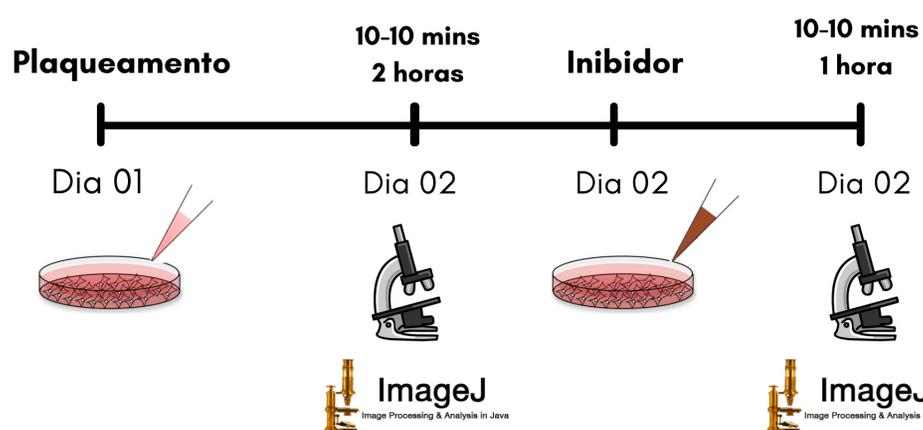
Este trabalho tem como objetivo produzir uma linhagem celular expressando estavelmente um repórter fluorescente de translocação de ERK quinase (KTRs) para medir a atividade de ERK em células vivas e verificar a dinâmica da ativação de ERK em células de glioblastoma (GBM).

## METODOLOGIA

A linhagem de glioblastoma A172 foi transduzida com repórter fluorescente KTR, o qual permite acompanhar a atividade de ERK em células únicas através da translocação citoplasmática da fluorescência verde. Esse vetor foi inserido ao genoma das células da linhagem celular por transdução lentiviral para se obter uma linhagem com expressão estável da proteína fluorescente.

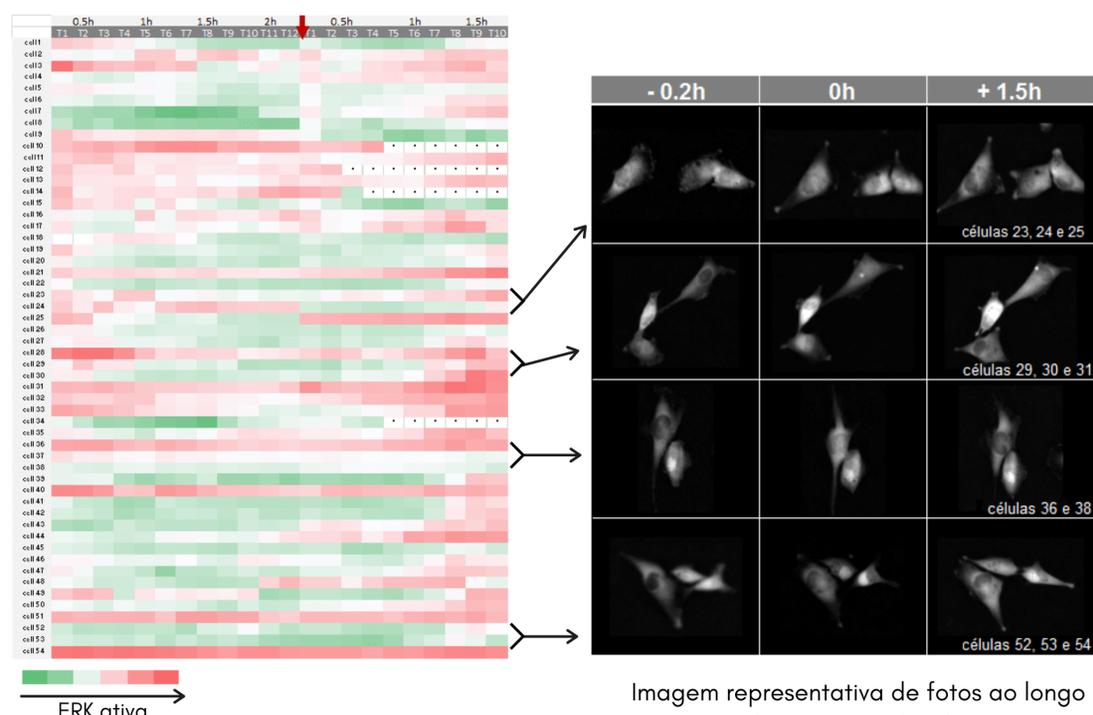


As células foram plaqueadas e tratadas com inibidor da via de sinalização de ERK (PD184352) e analisadas através de microscopia de fluorescência com fotos sequenciais para registrar a cinética de ativação e inativação de ERK em células únicas, o qual foi obtido pela divisão do valor da fluorescência do citoplasma pela fluorescência do núcleo.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados demonstram que a expressão da proteína fluorescente é estável e capaz de responder a inibição com  $0,17 \mu\text{M}$  do inibidor em aproximadamente 15 minutos. Além disso, algumas 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 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, como proliferação e migração.



## REFERÊNCIAS

Kudo, Takamasa & Jeknić, Stevan & N Macklin, Derek & Akhter, Sajja & Hughey, Jake & Regot, Sergi & W Covert, Markus. (2017). Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nature Protocols*. 13. 155-169. 10.1038/nprot.2017.128.