

RECONHECIMENTO MOLECULAR ENTRE SEPTINAS

João Emanuel Granato, Richard Charles Garratt

IFSC/Universidade de São Paulo

joao.granato@usp.br

Objetivos

Expressar, purificar e proceder aos ensaios de cristalização do heterodímero SEPT2-SEPT8; utilizar os cristais em experimentos de difração de raios-X visando determinar a estrutura do heterocomplexo; determinar o conteúdo de nucleotídeo (GDP e/ou GTP) das septinas.

Métodos e Procedimentos

Inicialmente, fez-se a transformação da cepa *Rosetta (DE3)* de *E. coli* e cultura em meio LB. A expressão do heterocomplexo ocorreu com IPTG 0,3 M por 16 h, a 20 °C. Após a lise celular por sonicação, procederam-se os protocolos de purificação por ICAM e por SEC. Todas as etapas de expressão e purificação foram monitoradas por SDS-PAGE a 10%. Uma vez purificado, realizaram-se estudos biofísicos do heterodímero (SEC-MALS e CD com curva de desnaturação térmica), e se iniciaram os ensaios de cristalização. Os cristais obtidos foram, então, submetidos aos experimentos de difração de raios-X e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do CCP4 Software Suite.

Resultados

A purificação por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) resultou em um pico (I) com a massa molecular de um dímero (~ 81kDa) e um outro pico (II) com a massa molecular de um monômero (~ 36 kDa). No gel de SDS-PAGE da purificação do pico I foram observadas as bandas correspondentes às septinas. No SEC-MALS observaram-se dois picos: um pico de ~ 64 kDa e um segundo pico de ~ 34 kDa com a altura do primeiro pico em relação ao segundo pico sugerindo que a amostra era

suficientemente homogênea para fins práticos. A curva de desnaturação térmica indicou que o valor para a temperatura de melting (T_m) do dímero seria de 53,3 °C. Os ensaios de cristalização foram bem-sucedidos em condições bastante diversas de cristalização. A análise dos dados dos experimentos de difração de raios-X resultou em uma estrutura do heterodímero com resolução de 2,3 Å (R-work = 0,2428 e R-free = 0,2955). Com o grau de refinamento da estrutura alcançado, foi possível verificar a presença do íon Mg^{2+} associado ao nucleotídeo.

Conclusões

A expressão e purificação do heterodímero SEPT2-SEPT8 foram bem-sucedidas. Os estudos biofísicos foram indicativos de que a amostra obtida era bem homogênea. A estrutura do heterodímero foi determinada com uma resolução razoável, na qual foi possível verificar a presença do íon Mg^{2+} ligado ao nucleotídeo. O refinamento da estrutura será continuado para estudos posteriores.

Referências Bibliográficas

- VALADARES, N.F.; PEREIRA, H.M.; ARAUJO, A.P.U; GARRATT, R.C. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017.
- VALADARES, N.F.; GARRATT, R.C. Septin crystallization for structural analysis. In: GLADFELTER, A. (Ed.). **Series: Methods in Cell Biology**. Cambridge: Academic Press, 2016. v. 136, p. 321-338.