

Universidade de São Paulo Instituto de Física de São Carlos

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos

13^a edição

Livro de Resumos

São Carlos
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.
358p.

Texto em português.

1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

PG161

Septinas de *Magnaporthe oryzae*: uma abordagem estrutural

CAVINI, Italo Augusto¹; ARAUJO, Ana Paula Ulian de¹; FERNÁNDEZ, Luis Alberto Valverde¹; CIOL, Heloisa¹; PINTO, Andressa Patricia Alves¹; ABBAS, Zaighum¹; MENDONÇA, Deborah Cezar¹; GARRATT, Richard Charles¹

lvalverde7@usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos - USP

As septinas são ubíquas em fungos e animais e podem ser encontradas em diversos locais nas células e podem-se envolver em muitos processos importantes além da citocinese. (1) No fungo *Magnaporthe oryzae* que é o agente causador da brusone do arroz, uma rede de filamentos se forma na base do apressório por meio das septinas, que formam uma estrutura de anel dinâmica, que se localiza com a os filamentos de actina. (2) As septinas, fornecem a rigidez cortical e a curvatura da membrana necessárias para a protrusão de uma cavilha de penetração rígida para romper a superfície da folha. O objetivo deste trabalho é a caracterização estrutural das septinas de *M. oryzae*, individualmente e de seus complexos, tendo como objetivos expressar as proteínas em *E. coli*, purificar e caracterizar as septinas de forma estável e depois avaliar o grau de oligomerização, teor de nucleotídeo além de realizar ensaios de cristalização; coletar dados de difração de raios-x dos cristais obtidos para resolução das estruturas, realizar ensaios de microscopia electrónica por contrastação negativa para confirmar a organização dos complexos com as proteínas integrais e resolver a estrutura dos complexos por Crio-ME. Atualmente conseguimos expressar e avaliar o estado oligomérico através da técnica SEC-MALS do complexo sep5-sep6-sep3-sep4 (octâmero em NaCl2 300mM), sep5-sep6 (dímero em 300mM de NaCl2). No caso de sep7 a proteína não é muito estável, então trabalhamos só com o domínio GHLa0 o que resulto em um dímero. No caso de sep3-sep4 ainda não foi avaliado o estado oligomérico mas já foi purificado de forma estável. Depois de avaliar o estado oligomérico fizemos ensaios de cristalografia onde obtivemos cristais e microscopia electrónica por contrastação negativa onde os resultados da mostram que o complexo sep5-sep6-sep3-sep4 em NaCl2 50mM forma filamentos, e em NaCl2 300mM forma octâmeros e hexâmetros. Quando se fez microscopia electrónica por contrastação negativa de sep5-sep6 em NaCl2 150mM olhamos tetrameros, informação que vamos confirmar no SEC-MALS. Usando o método de Gibson Assembly (3) foram feitas subclonagens para expressar os domínios G das septinas: sep3G-sep4G, sep5G-sep6G, sep7G e sep8G e sep8GCDTM, essas subclonagens estão sendo sequenciadas para confirmar se as sequências estão corretas e continuar com os testes de expressão.

Palavras-chave: Septina. *Magnaporthe oryzae*. Biologia estrutural

Agência de fomento: FAPESP (2022/00152-4)

Referências:

1 VALADARES, N.F. *et al.* Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0320-4.

2 OSÉS-RUIZ, M. *et al.* Appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe oryzae* is regulated by a Pmk1-dependent hierarchical transcriptional network. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1383-1397, 2021. DOI: 10.1038/s41564-021-00978-w.

3 GIBSON, D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. **Methods in Enzymology**. 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.