

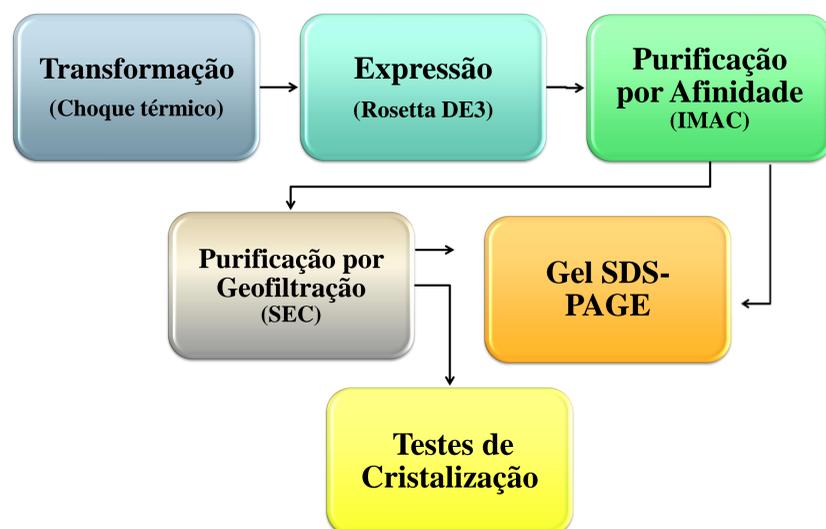
RESUMO

Septinas são proteínas que podem polimerizar em filamentos não polares e que estão relacionadas a processos intracelulares como ciclo celular, formação de uma barreira de difusão e recrutamento de proteínas parceiras. Descritas pela primeira vez em células de levedura por Hartwell (1971), elas são amplamente conhecidas por sua atividade GTPase, embora algumas septinas tenham perdido esta função ao longo da evolução. Apesar de terem sido descobertas em leveduras, as septinas podem ser encontradas numa miríade de organismos muito diferentes, como algas, protozoários, vermes e mamíferos, com notável exceção as plantas. Nos seres humanos, defeitos ligados a essas proteínas estão relacionados a doenças como câncer, infertilidade masculina, Alzheimer e Parkinson. Em leveduras, as septinas polimerizam em heterooctâmeros compostos por quatro septinas diferentes que se repetem na seguinte ordem: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. Com extensa literatura no que tange morfologia celular e fisiologia, estudos estruturais sobre septinas de leveduras são escassos, de modo que até o momento só existe uma estrutura cristalográfica relatada para o domínio GTPase de Cdc11. Em vista da baixa qualidade deste modelo e considerando a necessidade de preencher esta lacuna estrutural, o presente trabalho tem como objetivo a expressão heteróloga do domínio GTPase destas quatro septinas seguida de etapas de purificação, no intuito de posteriormente estudá-las isoladamente e determinar suas estruturas cristalográficas.

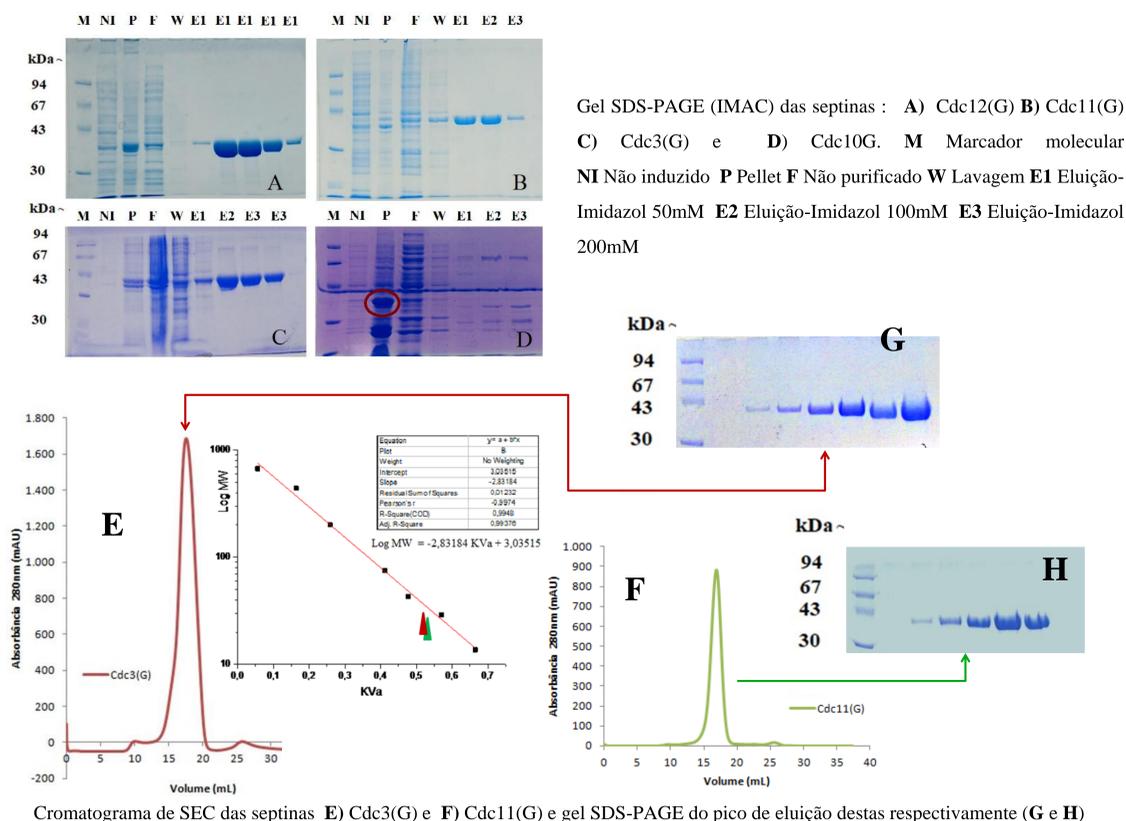
OBJETIVOS

Expressão e purificação do domínio GTPase das septinas de levedura Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 voltada à posterior caracterização biofísica e ensaios de cristalização.

METODOLOGIA



RESULTADOS



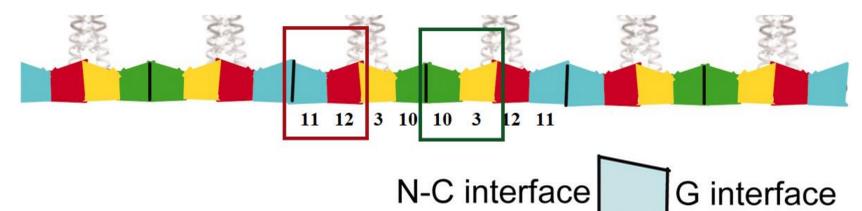
Terminada a etapa de expressão proteica, as células foram lisadas por sonicação e, após centrifugação, o sobrenadante foi purificado inicialmente ao passar por uma resina de níquel, que interage com a His-tag das proteínas. A eluição se deu utilizando concentrações crescentes de Imidazol (E1, E2 e E3; **A-D**; **G** e **H**) para as proteínas solúveis Cdc3(G), Cdc11(G) e Cdc12(G), enquanto Cdc10(G), por ser insolúvel, ficou retida no pellet (P; em **D**). As frações eluídas de Cdc3(G) e Cdc11(G) foram purificadas por geofiltração (**E** e **F**), que mostrou a homogeneidade da amostra também vista em gel (**G** e **H**). Uma curva de calibração da coluna as identificou como monômeros.

Ensaio de cristalização culminaram em cristais de Cdc11(G) que difrataram à baixa resolução:



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Os domínios GTPase das septinas Cdc3, Cdc11 e Cdc12 foram purificados por cromatografia de afinidade e SEC (exceção à Cdc12);
- Cdc3(G) e Cdc11(G) foram purificadas como monômeros;
- Cdc12(G) é muito instável e de fácil precipitação, enquanto Cdc10(G) é muito insolúvel e não pôde ser purificada até o momento;
- Cdc11(G) originou cristais que foram otimizados para maior tamanho, porém difrataram a resoluções abaixo de 4Å;
- O próximo passo do projeto visa a co-expressão das septinas com o relativo parceiro presente na interface G (conforme ilustrado na imagem a seguir), onde nosso grupo vem obtendo sucesso na determinação de estruturas cristalográficas em septinas humanas.



REFERÊNCIAS

- BERTIN, A., MCMURRAY, M. A., GROB, P., PARK, S.-S., GARCIA, G., PATANWALA, I., ... NOGALES, E. Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8274–8279, 2008.
- BRAUSEMANN, A., GERHARDT, S., SCHOTT, A. K., EINSLE, O., GROBE-BERKENBUSCH, A., JOHNSON, N., & GRONEMEYER, T. Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Structural Biology*, 193(3), 157–161, 2016.
- HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69, 265–276, 1971.

APOIADORES