

Estudo da interação não-canônica entre septinas do grupo I e II através de sua interface G.

Paola Lanzoni ¹, Richard Charles Garratt ².

1. Estudante de Mestrado do Instituto de Física de São Carlos – USP. *paola.lanzoni@usp.br.

2. Professor do FCI/GC, IFSC-USP, São Carlos/SP.

Septinas, constante de afinidade, SEPT3.

Introdução

As septinas são proteínas filamentosas que possuem sítio de ligação GTP-GDP e estão presentes no citoesqueleto das células eucarióticas. Este grupo de proteínas foi inicialmente identificado como participantes do ciclo de divisão celular de leveduras, mas posteriormente foi identificado em organismos mais complexos como platenelintos, animais superiores, insetos e recentemente em algas. Em humanos, estas proteínas estão relacionadas a diversos tipos de doenças figurando entre elas o câncer, doenças degenerativas, e até infertilidade em homens. Os primeiros estudos estruturais foram feitos por Sirajuddin e colegas (1) quando se conseguiu resolver a primeira estrutura de um filamento de septinas de humanos formado por SEPT2 (do grupo III), SEPT6 (do grupo II) e SEPT7 (grupo IV). Este trímero já havia sido identificado por Kinoshita (2) a partir de estudos de imunoprecipitação em células HeLa. Baseando-se na homologia das septinas e na estrutura de filamento fisiológico encontrado, Kinoshita propôs regras para a formação canônica de filamentos de septinas, em que trímeros se formariam de acordo com SEPT2/6/7, onde SEPT2 ou a SEPT6 poderiam ser trocadas por outra septina do mesmo grupo enquanto SEPT7 não poderia ser trocada, tornando-a única e indispensável para a formação dos filamentos. A validade desta regra foi verificada em experimentos realizados de duplo- e triplo-híbrido (3), onde trímeros diferentes que respeitam esta regra foram detectados. Porém, além destes, também foram identificadas interações não propostas por Kinoshita (aqui chamadas de “não-canônicas”). Algumas interações não-canônicas são formadas por septinas do grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) que interagem com septinas do grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14) pela sua interface G, o que levou a proposta de que septinas do grupo I possam se posicionar no lugar das septinas do grupo III no filamento descrito por Sirajuddin *et al.*

O objetivo deste trabalho é verificar a interação entre SEPT3, uma septina do grupo I, e todas as septinas do grupo II, determinando a sua constante de afinidade.

Resultados e Discussão

Primeiramente estão sendo analisados os padrões de oligomerização através da co-expressão em pETDuet-1 (Novagen) e co-purificação dos dímeros SEPT3-SEPT6, SEPT3-SEPT8, SEPT3-SEPT10, SEPT3-SEPT11 e SEPT3-SEPT14, integrando assim a análise para todas as septinas integrantes do grupo II com a SEPT3 pertencente a grupo I, esta última possuindo a extensão de 6x-histidina para a co-purificação por afinidade ao cobalto.

Utilizando 1 L de cultura de *E. coli* Rosetta expressas durante 16h a 4°C sob indução de 0,2mM de IPTG, testes de purificação por afinidade ao cobalto foram realizados a 4°C, em tampão Tris (25mM Tris, 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50mM L-Arg, 50mM L-Glu, pH 7,8). Eluições

seriadas foram feitas com tampão Tris+500mM Imidazol variando-se o volume de eluição.

Os resultados para a co-purificação em coluna de cobalto para os dímeros SEPT3-SEPT8 (Figura 1A) e SEPT3-SEPT10 (Figura 1B) mostraram um padrão de afinidade aparentemente variável entre os dois dímeros, sendo que SEPT3 se liga mais a SEPT8, quando comparado com a sua ligação a SEPT10.

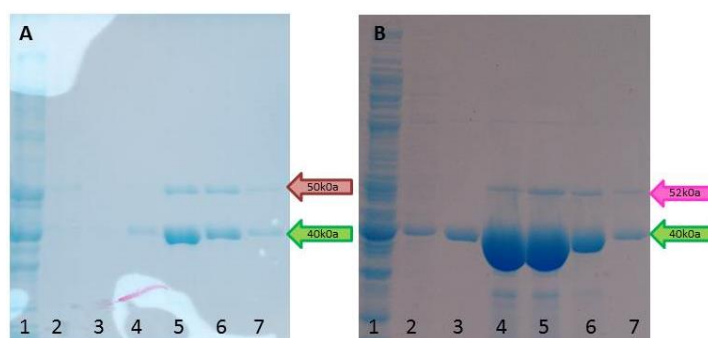


Figura 1. SDS-PAGE 10% do processo de purificação por afinidade ao cobalto dos dímeros SEPT3-SEPT8 (1A) e SEPT3-10 (1B). *Legenda:* 1 – Fração não-ligada, 2 – 1ª Lavagem, 3 – 2ª Lavagem, 4 – 1ª Eluição, 5 – 2ª Eluição, 6 – 3ª Eluição, 7 – 4ª Eluição. *Dados:* SEPT3 – 40kDa, SEPT8 – 50kDa, SEPT10 – 52kDa.

Baseado na literatura, sabemos que a interação canônica SEPT2-SEPT6 possui alta afinidade. Baseando-se em uma análise qualitativa do SDS-PAGE da Figura 1, dímeros SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT10 mostram que, apesar de existentes, as interações não-canônicas são muito fracas. Análises quantitativas serão realizadas através de ultracentrifugação analítica.

Conclusões

Verificamos com os resultados obtidos que apesar de existente, as interações não-canônicas SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT10 são fracas.

Agradecimentos

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

SIRAJUDDIN, M; FARKASOVSKY, M; HAUER, F; KÜHLMANN, D; MACARA, IG; WEYAND, M; STARK, H; WITTINGHOFER, A. Structural Insights into Filament Formation by Mammalian Septins. *Nature* (2007) 449: 311-317.

KINOSHITA, M. Assembly of Mammalian Septins. *J Bio Chem* (2003) 134: 491-496.