

Introdução

As septinas são proteínas ligadoras de GTP que estão associadas a eventos biológicos importantes em eucariotos. Primeiramente caracterizadas em leveduras, em humanos foram descobertos 14 genes para septinas que podem ser encontradas na membrana plasmática, no citoplasma e/ou núcleo e sua expressão parece estar regulada de acordo com o ciclo celular, linhagem celular e estágio de desenvolvimento. A estrutura primária destas proteínas de 40-60 kDa possui regiões bastante conservadas entre diferentes espécies (Figura 1). Possuem os domínios N e C-terminal variáveis e um domínio central conservado. A maioria das septinas possui no início do seu domínio conservado um motivo (P-loop) característico de proteínas ligadoras de GTP/ATP. Possuem também um ou mais domínios coiled-coil próximos à porção C-terminal. O gene da septina 10 está localizado no cromossomo 8 e a proteína no citoplasma e núcleo celular. Esta apresenta homologia com as septinas 6 e 8 por possuir um motivo ligador de ATP/GTP e um domínio coiled-coil na porção C-terminal.

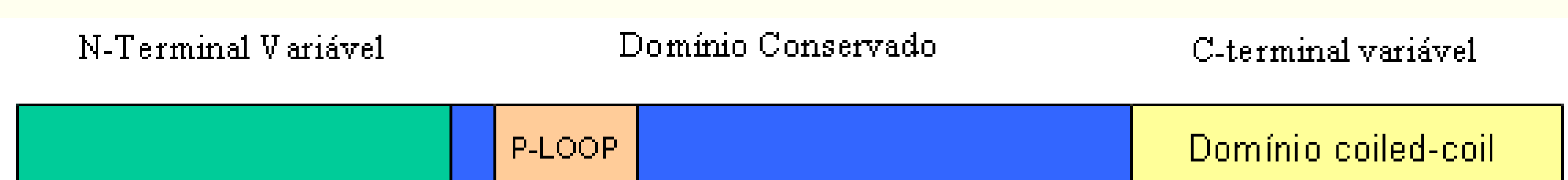


Figura 1 - Ilustração esquemática da estrutura primária de septinas.

Materiais e Métodos

As construções da septina 10I (proteína inteira) e 10GC (domínio GTPase+C-terminal) e 10G (domínio GTPase) foram amplificadas por reação de PCR utilizando-se bibliotecas humanas disponíveis no LNLS. As amplificações foram clonadas em vetor PGEM-T-easy vector (Promega) e estes submetidos ao seqüenciamento. Após a confirmação da seqüência correta foram subclonadas: a 10I em vetores de expressão pET28a-HIS e a 10GC e 10G em vetores de expressão pGEX-4T-3 (Novagen). Após seqüenciamento para confirmação dos genes, os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* de diferentes linhagens.

Resultados e Discussão

Os fragmentos gênicos correspondentes às construções sept10I, sept10GC e 10G (figura 2) da septina humana 10 foram amplificados por reação de PCR e os fragmentos gênicos resultantes das amplificações foram ligados no vetor pGEM®-T Easy (Promega), que por sua vez foi utilizado para a transformação da linhagem DH5α de *E. coli*. Os clones foram selecionados a partir da coloração das colônias. As colônias azuladas são as bactérias com plasmídeos sem incerto e as de coloração branca são as bactérias com plasmídeos recombinantes (figura 3). Feita a seleção, os clones foram seqüenciados e a presença de colônias recombinantes foi confirmada por PCR de colônia (figura 4).

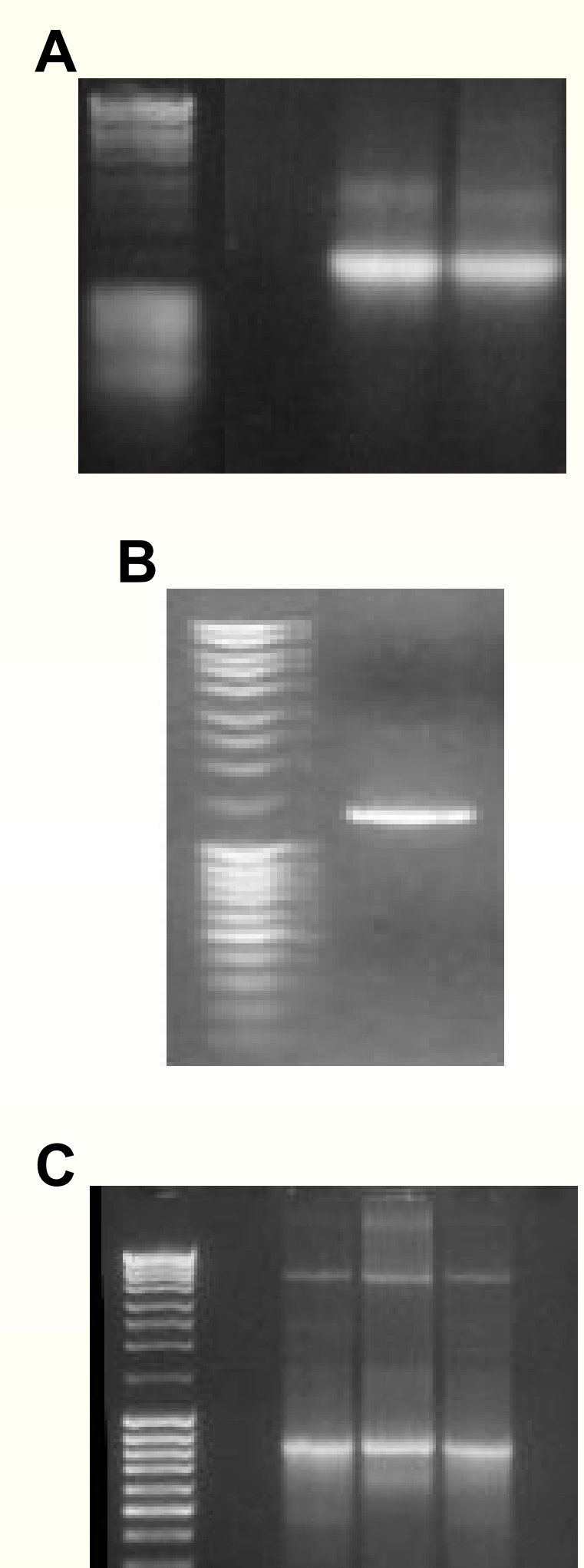


Figura 2. Amplificação das construções: sept10I (A), sept10GC (B) e sept10G (C). Padrão de massa molecular Mass Ruller™ DNA Ladder Mix (Fermentas), 10I 1521pb, 10GC 1332pb e 10G 819pb.

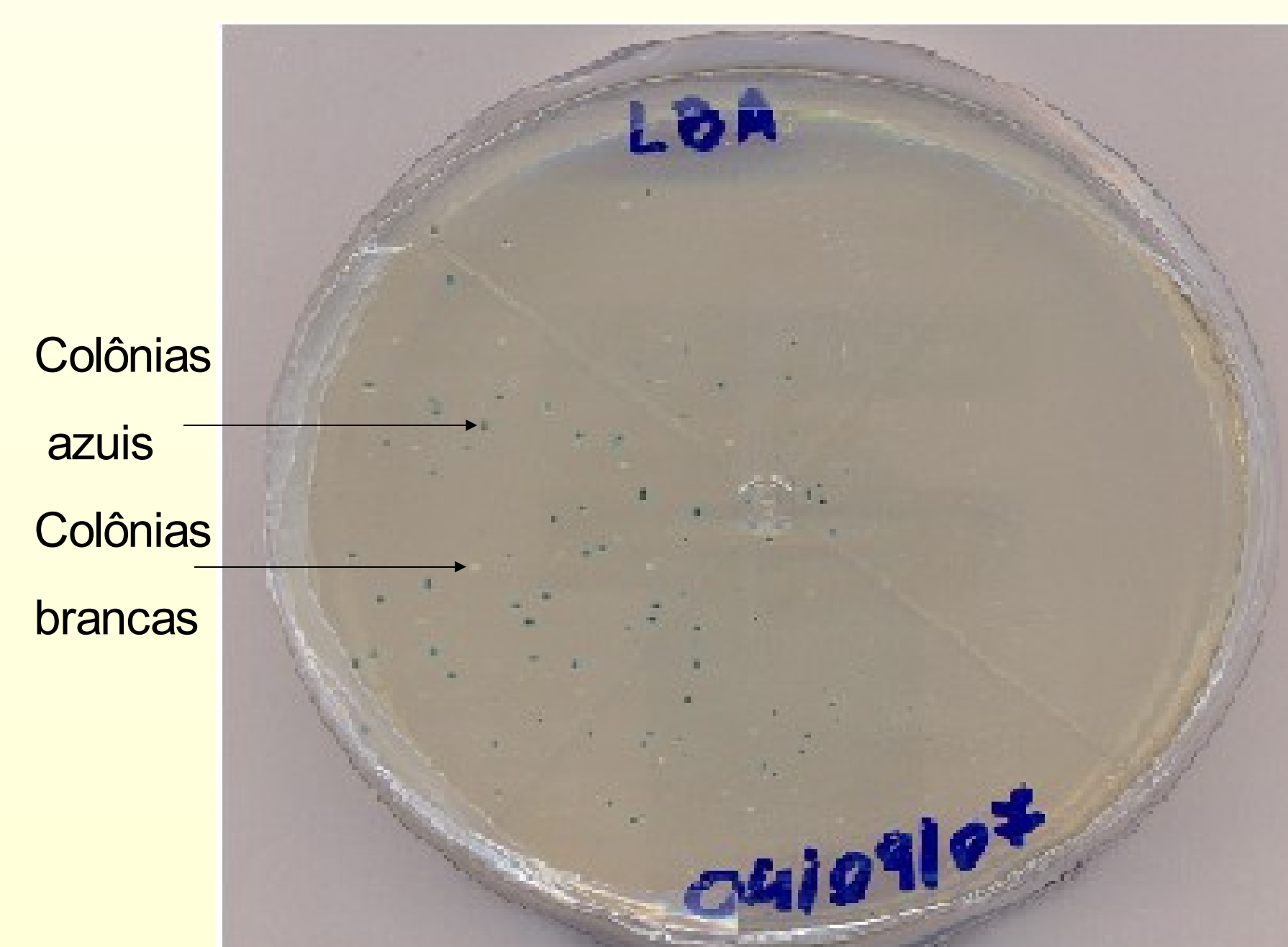


Figura 3. Seleção das colônias.

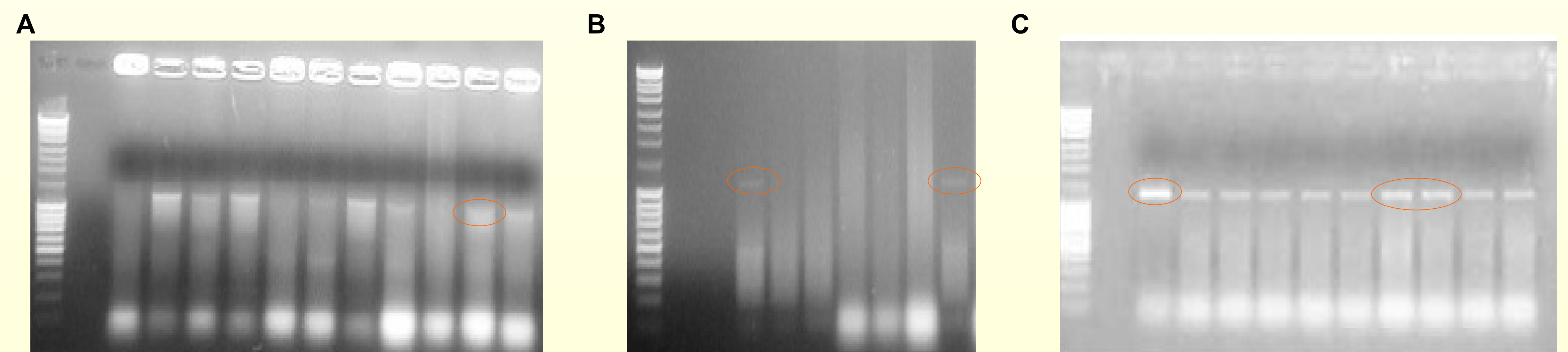


Figura 4. PCR de colônia das construções 10G (A), 10GC (B) e 10I (C) nos vetores de expressão pET28a-HIS, PGEX-4T3 e PGEX-4T3 respectivamente. As colônias destacadas foram as utilizadas para extração plasmidial e seqüenciamento.

Conclusão

Todos os clones desejados foram obtidos com sucesso tanto no vetor de clonagem quanto nos vetores de expressão em todas as construções propostas. Testes de expressão estão em andamento com o objetivo de produzir proteína para purificação por afinidade.