UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARINA GABRIEL FONTES

Interações de septinas de *Schistosoma mansoni* com modelos de
membranas

São Carlos

2019

MARINA GABRIEL FONTES

Interações de septinas de *Schistosoma mansoni* com modelos de
membranas

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto
de Física de São Carlos da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian
de Araujo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fontes, Marina Gabriel

Interações de septinas de *Schistosoma mansoni* com modelos de membranas / Marina Gabriel Fontes; orientadora Ana Paula Ulian de Araujo - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Septina. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Interação septina-membrana. I. Araujo, Ana Paula Ulian de , orient. II. Título.

Aos meus pais, Vera e Bento, pelo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araujo pela confiança, orientação, apoio e, principalmente, paciência. Obrigada por sempre me escutar e ajudar.

À Dr^a Ana Eliza Zeraik pelos ensinamentos, apoio, incentivo e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho e desde o início da minha iniciação científica.

À minha orientadora no exterior Prof^a. Dr^a. Amy Gladfelter por ter me recebido em seu laboratório, e por toda ajuda e atenção durante os seis meses de estágio. Agradeço também a todos os membros do *Gladfelter Lab*, especialmente ao Kevin Cannon pelos ensinamentos, discussões e sugestões.

Ao Prof. Dr. Ricardo De Marco pela confiança, ajuda e orientação desde 2013.

À Dr^a. Patricia Suemy Kumagai pela ajuda no planejamento e na execução das medidas de EPR, e pelas discussões e sugestões.

Aos técnicos Fernando, Rafael, e, especialmente, à Andressa e Bel pela manutenção da ordem no laboratório e pela ajuda com os equipamentos e experimentos.

Aos membros e ex-membros do grupo de septinólogos pelas discussões e sugestões.

Aos meus colegas e amigos do grupo de Biofísica em especial à Ana Eliza, Paty, Militar, Gabriel, Diogo, Luiza, Wesley e Rapha por sempre estarem dispostos a ajudar, e pela amizade.

Aos meus amigos da graduação Camila, Guilherme e Nicolau pela ajuda, amizade e companheirismo.

À minha grande amiga Camila pela amizade e apoio durante todos esses anos.

Ao Rapha pelo amor, paciência, apoio e incentivo.

À toda a minha família, em especial aos meus pais, Vera e Bento, e ao meu irmão Pedro pelo amor, suporte e incentivo. Obrigada por sempre me apoiarem.

Ao Instituto de Física de São Carlos e à Universidade de São Paulo pela excelência no ensino e na pesquisa. Aos docentes e funcionários do IFSC, especialmente da biblioteca pela prontidão e competência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do processo nº 2016/13961-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do

processo nº 2017/09905-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Coragem”

Minha avó, Maria Porcina da Silva

RESUMO

FONTES, M. G. **Interações de septinas de *Schistosoma mansoni* com modelos de membranas**. 2019. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Septinas são GTPases capazes de se polimerizar. Essas proteínas, componentes do citoesqueleto, participam de diversos processos celulares nos quais elas se encontram associadas às membranas, como na citocinese, na ciliogênese e na exocitose. Para que possam exercer essas variadas funções, as septinas organizam-se como hetero-oligômeros (complexos) não-polares, os quais podem interagir entre si, formando estruturas maiores como filamentos, anéis e redes. Essas proteínas são altamente conservadas em eucariotos, todavia, o número de genes de septinas entre espécies é variável de uma, em *Chlamydomonas reinhardtii*, até mais de uma dezena de genes de septinas em humanos. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa descreveram quatro septinas em *Schistosoma mansoni*, nomeadas *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2*. Ainda, recentemente, foi verificado que essas septinas são capazes de se ligar a membranas modelo, constituindo um modelo mais simples, quando comparadas às humanas, para estudar os mecanismos de associação às membranas. Neste trabalho, foram investigadas a influência da curvatura das membranas para a interação septinas-lipídios e a especificidade de septinas por diferentes fosfolipídios. Além das septinas de *S. mansoni*, o complexo de septinas de *Ciona intestinalis* foi também incluído, visando análises comparativas. Experimentos de microscopia confocal de fluorescência mostraram que tanto a *SmSEPT10* isolada, quanto os complexos de septinas de *S. mansoni* e de *C. intestinalis* ligam-se, preferencialmente, a membranas com curvaturas de $2 \mu\text{m}^{-1}$ (diâmetro de $0,96 \mu\text{m}$). Essa tendência parece ser intrínseca de septinas, visto que complexos de outros organismos já haviam apresentado a mesma preferência. A capacidade de uma septina individual, no caso *SmSEPT10*, de distinguir curvaturas é um indicativo de que a polimerização não é necessária para esse mecanismo. A interação das septinas aos modelos de membrana só foi detectada na presença de dextrose, sugerindo que esse açúcar atue na estabilização dessas proteínas e abrindo novas frentes de estudo sobre a estabilidade das septinas. Os experimentos de microscopia, em conjunto com ensaios de *PIP Strips*, demonstraram que o complexo de septinas de *C. intestinalis* liga-se, preferencialmente, à fosfatidilserina, enquanto as septinas de *S. mansoni* apresentam uma preferência por fosfoinositóis. Finalmente, ensaios preliminares com construções mutantes do C-terminal

da *SmSEPT10* possibilitaram o desenvolvimento de uma hipótese para o mecanismo de associação dessa septina às membranas.

Palavras-chave: Septina. *Schistosoma mansoni*. Interação septina-membrana.

ABSTRACT

FONTES, M. G. **Interactions of *Schistosoma mansoni* septins with membrane models.** 2019. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Septins are polymerizable GTPases. These cytoskeletal proteins are involved in several cellular processes in which they are associated to membranes, including cytokinesis, ciliogenesis and exocytosis. In order to perform these various functions, septins assemble into non-polar hetero-oligomers (complexes), which interact with each other forming higher-order structures such as filaments, ring and gauzes. These proteins are highly conserved in eukaryotes, yet the number of septin genes varies from one, in *Chlamydomonas reinhardtii*, to more than a dozen septin genes in humans. Previous studies from our research group described four septins in *Schistosoma mansoni*, named *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* and *SmSEPT7.2*. Recently, it was verified that these proteins are capable of binding to model membranes, constituting a simpler model, when compared to human septins, to study the mechanism of membrane association. In this work, the influence of membrane curvature to the septin-lipid binding and the septin specificity to different phospholipids were investigated. In addition to *S. mansoni* septins, the septin complex from *Ciona intestinalis* was also included for comparative analyzes. Confocal fluorescence microscopy experiments showed that both *SmSEPT10* and the septin complexes from *S. mansoni* and *C. intestinalis* bind, preferably, to membranes with $2\ \mu\text{m}^{-1}$ curvatures ($0,96\ \mu\text{m}$ diameter). This tendency seems to be intrinsic to septins, as hetero-oligomers from other organisms had already presented the same binding preference. The capacity of an individual septin to distinguish curvatures is an indicative that the polymerization is not required for this mechanism. The interaction of these septins to the membrane models was only detected in the presence of dextrose, suggesting that this sugar acted in the protein stabilization, thus opening up new to study septin stability. These microscopy experiments, together with PIP Strips assays, demonstrated that the septin complex from *C. intestinalis* binds preferentially to phosphatidylserine, whereas septins from *S. mansoni* show a preference to phosphoinositides. Finally, preliminary assays with mutant constructions of *SmSEPT10* C-terminal enabled the development of a hypothesis for the association mechanism of these proteins to membranes.

Keywords: Septin. *Schistosoma mansoni*. Septin-membrane interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Organização das septinas. Representação esquemática de hetero-oligômeros de septinas, os quais formam filamentos, feixes, redes e anéis.22
- Figura 2 - As septinas atuam em diversos processos celulares. A) Anéis de septinas podem formar barreiras de difusão no sítio de citocinese e agir como um suporte para outras proteínas. B) Septinas também se organizam na membrana plasmática, o que promove a rigidez da membrana e permite o suporte de proteínas integrais da membrana, como receptores e transportadores. Para separar a membrana ciliar da membrana plasmática, um anel de septinas forma uma barreira de difusão na base do cílio. C) Assim como casos anteriores, um anel de septina no annulus do espermatozoide funciona como uma barreira entre a peça intermediária e a cauda.23
- Figura 3 - Representações esquemáticas de septinas. A) Domínios estruturais de uma septina típica: região polibásica presente no N-terminal, domínio GTPase com os motivos G1, G3 e G4, elemento único de septinas (SUE) e C-terminal com *coiled-coil*. B) As septinas de animais podem ser classificadas nos grupos da SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7.25
- Figura 4 - Estruturas dos hetero-oligômeros de septinas. A) Hexâmero formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7, as quais interagem entre si por suas interfaces NC e G. Observa-se a presença de GTP (magenta) e de GDP (verde) nas estruturas. O código PDB do complexo: 2QAG. B) As interfaces NC e G de uma septina estão indicadas na representação. Dentro de um filamento, septinas do mesmo grupo poderiam se substituir.27
- Figura 5 - Representação esquemática das septinas de *Schistosoma mansoni*. Da esquerda à direita, encontram-se a região polibásica (PB) no N-terminal, o domínio GTPase, o elemento único de septina (SUE) e o *coiled-coil* (CC) no C-terminal.29
- Figura 6 - Septinas individuais de *S. mansoni* ligam-se às GUVs. Vesículas compostas por 94,9 mol% DOPC, 5 mol% PI(4,5)P₂ e 0,1 mol% Rh-DPPE foram incubadas com 100 nM de septinas individuais de *S. mansoni* marcadas (verde): A) *SmSEPT5*; B), C) e D) *SmSEPT10*. Observa-se que ambas as septinas individuais interagem com as membranas, entretanto a *SmSEPT10* parece formar estruturas de “gaiola” que distorcem as GUVs.32
- Figura 7 - O C-terminal da *SmSEPT10* é necessário para a ligação às GUVs. Vesículas gigantes (94,9 mol% DOPC, 5 mol% PI(4,5)P₂ e 0,1 mol% Rh-DPPE) foram incubadas com 100 nM de construções proteicas da *SmSEPT10* marcadas (verde): A) *SmSEPT10G* (somente o domínio GTPase); B) *SmSEPT10NG* (N-terminal e domínio GTPase); e C) *SmSEPT10GC* (domínio GTPase e C-terminal). A interação com as membranas só foi observada na presença do C-terminal da proteína. A escala equivale a 30 µm.33
- Figura 8 - Imagem de uma câmara. Cilindro plástico colado à superfície da lâmina.46
- Figura 9 - Purificação da *SmSEPT10*. A) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Os picos correspondentes às frações monoméricas e dimericas estão assinalados. B) Análise da eluição em SDS-PAGE 12% mostrando: 1) padrão de massa molecular; 2) fração correspondente ao volume 12 mL da cromatografia de exclusão molecular.53

Figura 10 - Purificação do heterocomplexo de septinas de <i>S. mansoni</i> . A) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex 200. B) Análise das frações do complexo eluídas, analisadas em SDS-PAGE 12%: 1) padrão de massa molecular; 2-3) frações correspondentes aos volumes 10 e 11 mL da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. As três bandas correspondem à septina 7.2 (59,3 kDa), septina 5 (51,3 kDa) e septina 10 (48,1 kDa).	54
Figura 11 - Purificação das construções <i>SmSEPT10C</i> e dos mutantes. A) SDS-PAGE 12%: 1) padrão de massa molecular; 2) amostra da <i>SmSEPT10C</i> após a segunda etapa cromatográfica de purificação (SEC); 3-7) amostras dos mutantes S8C, A49C, A65C, A83C e G98C, respectivamente, após a cromatografia de afinidade. B) Cálculo da massa molecular da <i>SmSEPT10C</i> por SEC-MALS.	55
Figura 12 - Espectros de CD convencional na região do UV distante dos mutantes da <i>SmSEPT10C</i> a 20°C.	56
Figura 13 - Heterocomplexos (verde) de <i>C. intestinalis</i> (A) e de <i>S. mansoni</i> (B) ligam, preferivelmente, às membranas (vermelho) com diâmetros menores. Os diâmetros das esferas estão descritos no topo e, à esquerda, estão as componentes das imagens referentes aos lipídios e às septinas. A composição lipídica da membrana usada foi de: 5 mol% PI(4,5)P ₂ , 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE. A concentração dos heterocomplexos foi de 83 nM e 250 nM para <i>C. intestinalis</i> e <i>S. mansoni</i> , respectivamente.	58
Figura 14 - Adsorção de <i>SmSEPT10</i> às membranas. <i>Boxplots</i> da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. Composição lipídica: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P ₂ , 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-DE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; *, p-valor < 0,05.	59
Figura 15 - Interação do heterocomplexo de septinas de <i>S. mansoni</i> com membranas. <i>Boxplots</i> da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. A composição lipídica utilizada foi: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P ₂ , 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; *, p-valor < 0,05; n.s., não-significativo.	60
Figura 16 - O heterocomplexo de <i>C. intestinalis</i> liga às membranas com diâmetros menores, preferivelmente. <i>Boxplots</i> da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. Composição lipídica: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P ₂ , 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-DE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; **, p-valor < 0,01; n.s., não-significativo.	61
Figura 17 - O heterocomplexo de septinas de <i>S. mansoni</i> e a <i>SmSEPT10</i> ligam predominantemente à membranas com PI(4,5)P ₂ . <i>Boxplots</i> da adsorção de: A) heterocomplexo/ B) <i>SmSEPT10</i> para cada composição lipídica. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005.	62
Figura 18 - O heterocomplexo de septinas de <i>C. intestinalis</i> liga, preferivelmente, a membranas com POPS. <i>Boxplot</i> da adsorção da septina para cada composição lipídica. O diâmetro da membrana era de 0,96 µm. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005.	63
Figura 19 - Especificidade de ligação da <i>SmSEPT10</i> a diferentes fosfolipídios nas condições (A e B) sem dextrose e (C e D) com dextrose. A e C) Imagens da revelação do <i>PIP</i>	

<i>Strip</i> após incubação com a <i>SmSEPT10</i> . B e D) Análise quantitativa da ligação aos lipídios em relação à marcação do <i>spot</i> em branco.	65
Figura 20 - Não houve ligação significativa da <i>SmSEPT10G</i> (controle negativo). Intensidade média relativa de ligação da <i>SmSEPT10G</i> aos lipídios nas condições (A) sem dextrose e (B) com dextrose.	66
Figura 21 - Interação do heterocomplexo de septinas de <i>C. intestinalis</i> a diferentes fosfolipídios. A) Na condição experimental sem dextrose, não houve ligação significativa. B) Com dextrose, o heterocomplexo interagiu com PS.	66
Figura 22 - Gráfico da análise quantitativa da ligação do heterocomplexo de septinas de <i>S. mansoni</i> aos lipídios presentes na <i>PIP Strip</i>	67
Figura 23 - Curva padrão da análise da desnaturação térmica por DSF.	68
Figura 24 - Gráficos de intensidade de fluorescência por temperatura. Curvas correspondem à desnaturação térmica da <i>SmSEPT10</i> (em triplicata) nas seguintes condições: A) Tampão A; B) Tampão A com 0,5 M de dextrose; C) Tampão A com 0,5 M de sacarose; D) Tampão A com 0,5 M de sorbitol.	69
Figura 25 - Curvas de desnaturação térmica da <i>SmSEPT10</i> por CD. Os experimentos foram realizados na presença (azul) e na ausência (preto) de dextrose.	70
Figura 26 - Fotos das cubetas após a desnaturação térmica da <i>SmSEPT10</i> . A) Sem a adição da dextrose, nota-se a presença de precipitados proteicos (partículas brancas). B) Já no tampão com o açúcar, essas partículas não são observadas.	71
Figura 27 - Experimento padrão de MST. A) Curvas do movimento termoforético de uma molécula fluorescente após ligação a diferentes concentrações de um ligante. B) Gráfico da fluorescência normalizada pela concentração do ligante em um tempo específico. As diferentes concentrações do ligante são indicadas pelo gradiente de cores à direita.	72
Figura 28 - As curvas de MST da septina 10 (60 nM) não apresentaram alterações na presença de vesículas. A) Gráfico da fluorescência normalizada da <i>SmSEPT10</i> marcada <i>versus</i> a concentração de lipídios. B) Fluorescência inicial da septina 10 marcada sem e com as vesículas. Utilizou-se 20% de potência do LED e potência alta do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.	73
Figura 29 - Curva de MST mostrando indícios da ligação de 10 µM de lipídios (vesículas) à <i>SmSEPT10</i> (20 µM) sem incubação. A) Gráfico da fluorescência normalizada por concentração da <i>SmSEPT10</i> . A amplitude de resposta obtida foi de 5,4, com razão sinal/ruído equivalente a 6,0. B) Fluorescência das vesículas com e sem <i>SmSEPT10</i> . Utilizou-se 40% de potência do LED e potência média do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.	74
Figura 30 - Curvas de MST após 1h de incubação invalidam as medidas. A) Gráfico da fluorescência normalizada por concentração da <i>SmSEPT10</i> . A amplitude de resposta obtida foi de 10,4, com razão sinal/ruído equivalente a 5,7. B) Fluorescência das vesículas com e sem <i>SmSEPT10</i> . Utilizou-se 40% de potência do LED e potência média do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.	74
Figura 31 - Espectros de fluorescência das vesículas na ausência e presença de proteínas. A) Assim como nos experimentos de MST, observou-se que a fluorescência das	

vesículas decaiu com a adição de <i>Sm</i> SEPT10. B) O decaimento também ocorreu com a adição de <i>Sm</i> SEPT10G.	75
Figura 32 - Marcação de spin sítio-dirigida do MTSSL. A) Reação da sonda MTSSL com o grupo -SH de uma proteína produz uma cadeia lateral marcada. B) Espectro de EPR de MTSSL em água e em uma solução de glicerol-água.....	76
Figura 33 - Representação esquemática das construções proteicas mutantes do C-terminal da <i>Sm</i> SEPT10. As regiões preditas de formação de α -hélices são mostradas em azul, os retângulos em cinza indicam regiões não estruturadas e as marcações em vermelho sinalizam as mutações. A escala (abaixo) mostra a posição dos aminoácidos entre as extremidades N e C terminais das construções.....	77
Figura 34 - Espectros de EPR dos cinco mutantes da construção <i>Sm</i> SEPT10C nas condições (A) sem dextrose e (B) com dextrose. Em todos os casos, as construções com mutações em regiões terminais da α -hélice apresentam espectros com linhas finas, enquanto que as que têm mutações em regiões centrais exibem espectros com linhas largas. Todos os espectros foram coletados a 20°C.....	78
Figura 35 - Espectros de EPR dos mutantes marcados na ausência (—) e na presença (—) de vesículas, em tampão sem dextrose. Os espectros correspondem à: A) <i>Sm</i> SEPT10C S8C; B) <i>Sm</i> SEPT10C A49C; C) <i>Sm</i> SEPT10C A65C; D) <i>Sm</i> SEPT10C A83C; e E) <i>Sm</i> SEPT10C G98C.....	80
Figura 36 - Espectros de EPR dos cinco mutantes de <i>Sm</i> SEPT10C na ausência (—) e na presença de vesículas compostas por 10 mol% de POPS e 90 mol% de POPC (—) e 5 mol% de PI(4,5)P ₂ e 95 mol% de POPC (—). Os espectros são referentes à: A) <i>Sm</i> SEPT10C S8C; B) <i>Sm</i> SEPT10C A49C; C) <i>Sm</i> SEPT10C A65C; D) <i>Sm</i> SEPT10C A83C; e E) <i>Sm</i> SEPT10C G98C.....	81
Figura 37 - As interfaces anfipáticas representadas por <i>helical wheel</i> . Os diagramas correspondem às sequências dos resíduos 45 a 62 (A) e dos resíduos 68 a 85 (B) da construção <i>Sm</i> SEPT10C.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de identidade entre as septinas de <i>S. mansoni</i> e de humanos.	28
Tabela 2 - Detalhamento das construções utilizadas.	37
Tabela 3 - Volumes de esferas e SUVs	45
Tabela 4 - Razão entre os mínimos em 222 nm e 208 nm	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Septinas	21
1.2	Estrutura das septinas e polimerização	24
1.3	Septinas em <i>Schistosoma mansoni</i>	28
1.4	Interação de septinas com membranas	30
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Clonagem e expressão das septinas de <i>S. mansoni</i>	37
3.2	Purificação da <i>SmSEPT10</i> e de suas construções	39
3.3	Purificação dos mutantes da <i>SmSEPT10C</i>	40
3.4	Purificação do complexo de septinas de <i>S. mansoni</i>	40
3.5	Produção dos complexos de septinas de <i>C. intestinalis</i>	41
3.6	Avaliação do estado oligomérico da <i>SmSEPT10C</i> por cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos	41
3.7	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	42
3.8	Marcação das proteínas	42
3.9	Preparação das vesículas unilamelares	44
3.10	Microscopia confocal de fluorescência	44
3.11	<i>PIP Strips</i>	47
3.12	Influência da dextrose na estabilidade térmica da <i>SmSEPT10</i>	48
3.13	Termoforese em microescala e espectroscopia de fluorescência	49
3.14	Ressonância Paramagnética Eletrônica	50
4	RESULTADOS	53
4.1	Obtenção das septinas	53
4.2	Interação entre septinas e miméticos de membrana	57
4.3	Avaliação da especificidade de ligação	64
4.4	Estabilidade térmica da <i>SmSEPT10</i> na presença de glicose	68
4.5	Parâmetros de interação	71
4.6	Identificação do domínio da <i>SmSEPT10C</i> necessário para a ligação com membranas	75
5	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

As septinas são proteínas componentes do citoesqueleto que se ligam à GTP e GDP. Em 1971, essas proteínas foram descritas, pela primeira vez, por Hartwell, em um estudo que visava identificar genes envolvidos no ciclo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*. Observou-se que mutações em quatro genes, Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 (Cdc, do inglês, *cell division cycle*), resultaram em falhas na citocinese.¹ Posteriormente, experimentos de microscopia eletrônica e de imunofluorescência revelaram que essas proteínas localizavam-se como um anel filamentoso no septo de brotamento dessas leveduras.²⁻³ Por isso, essas proteínas foram nomeadas de septinas.⁴

Desde a descoberta em leveduras, as septinas já foram descritas em vários outros organismos e mostraram-se amplamente conservadas em eucariotos. Análises filogenéticas identificaram septinas em fungos, animais e protistas, mas não em plantas.⁵⁻⁶ No organismo mais estudado, *Saccharomyces cerevisiae*, foram descritas sete septinas, sendo Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12, já mencionadas anteriormente, além das septinas Spr3 e Spr28 - específicas do processo de esporulação – e a Shs1, a qual não é necessária para a viabilidade celular.⁷⁻⁸ Entretanto, o número de septinas varia entre os organismos.⁹ Por exemplo, a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* possui uma septina (CrSEPT), já em humanos, existem treze genes que codificam essas proteínas, produzindo as septinas SEPT1 a SEPT12 e SEPT14 (SEPT13 foi considerado um pseudogene).⁹⁻¹⁰ Na verdade, considerando que muitas dessas septinas apresentam variantes, o número de isoformas dessas proteínas em humanos é maior que o número de genes.

As septinas são capazes de formar hetero-oligômeros, os quais se organizam em estruturas mais complexas como filamentos, feixes, anéis e redes (Figura 1). Essas estruturas interagem com outros componentes do citoesqueleto (actina e microtúbulos),¹¹⁻¹² membranas celulares e diversas outras proteínas.¹³

Figura 1 – Organização das septinas. Representação esquemática de hetero-oligômeros de septinas, os quais formam filamentos, feixes, redes e anéis.

Fonte: FUNG¹⁴

Os filamentos de septinas podem formar barreiras de difusão que restringem os movimentos de proteínas, limitando, por exemplo, a difusão lateral de proteínas integrais de membrana (Figura 2B).¹⁵ Assim, essas barreiras proporcionam a compartimentalização das células. Por exemplo, esse processo é crucial para o brotamento de leveduras, no qual o crescimento celular é restrito à célula-filha (Figura 2A).¹⁶⁻¹⁷ Evidências da formação dessas barreiras de difusão foram detectadas em células de mamífero que não estavam em divisão. Como um exemplo, em espermatozoides, proteínas de membrana são compartimentalizadas por meio de uma estrutura anelar, composta por septinas (Figura 2C).¹⁸⁻¹⁹ Estruturas semelhantes também foram observadas na base de dendritos²⁰⁻²¹ e de cílios²²⁻²³ (Figura 2B).

Septinas também atuam como “andaimes” ou suportes para outras proteínas, facilitando as interações entre elas. Essa função foi amplamente descrita em leveduras, nas quais os suportes formados por anéis de septinas permitem a concentração de proteínas importantes para a citocinese no sítio de divisão celular.²⁴⁻²⁵ Esses suportes também são essenciais para o tráfego de vesículas,²⁶⁻²⁷ a regulação da dinâmica dos microtúbulos,²⁸⁻²⁹ o remodelamento de membranas,³⁰⁻³¹ entre outros.

Figura 2 - As septinas atuam em diversos processos celulares. A) Anéis de septinas podem formar barreiras de difusão no sítio de citocinese e agir como um suporte para outras proteínas. B) Septinas também se organizam na membrana plasmática, o que promove a rigidez da membrana e permite o suporte de proteínas integrais da membrana, como receptores e transportadores. Para separar a membrana ciliar da membrana plasmática, um anel de septinas forma uma barreira de difusão na base do cílio. C) Assim como casos anteriores, um anel de septina no annulus do espermatozoide funciona como uma barreira entre a peça intermediária e a cauda.

Fonte: Elaborada pela autora

As funções atribuídas às septinas são tão variadas, que existem até indícios da ação antimicrobiana. Estudos indicam que o recrutamento de septinas é um mecanismo de defesa celular contra infecções bacterianas. Em células humanas infectadas por *Shigella flexneri*, complexos de septinas formam filamentos que envolvem a bactéria. Essa gaiola constituída de septinas previne a divisão e a proliferação desse microrganismo, que são eliminados por autofagia.³²

Em vista da diversidade de processos celulares dependentes das septinas, não é surpreendente que alterações nessas proteínas estejam associadas a doenças. Mudanças nos níveis de expressão de septinas estão relacionados com casos de câncer de mama e de ovário.³³⁻³⁶ Mutações na septina 9 foram identificadas em pacientes com uma neuropatia hereditária.³⁷⁻³⁸ Outras doenças neurológicas, como Alzheimer e Parkinson, também apresentam associação com o mal funcionamento das septinas.³⁹

1.2 Estrutura das septinas e polimerização

Pertencentes à superclasse das *P-loop* GTPases, as septinas apresentam um domínio de ligação aos nucleotídeos de guanina, que, em muitos casos, é capaz de hidrolisar o GTP. Esse domínio GTPase (domínio G) contém três motivos conservados: G1, G3 e G4. O motivo G1, também denominado de *P-loop* ou *Walker A*, interage com o grupo fosfato do nucleotídeo. O G3, que se encontra na região conhecida como *switch II*, liga-se a Mg^{2+} e é essencial para hidrólise do GTP. Já G4 é importante para a ligação seletiva de nucleotídeos de guanina.⁴⁰⁻⁴¹

O elemento único de septina (do inglês SUE, *septin unique element*), presente na região C-terminal do domínio G, corresponde a um conjunto de aproximadamente 50 resíduos característicos das septinas que as distingue das outras GTPases. Apesar da função desse elemento não ser completamente elucidada, estudos mostram que essa região está envolvida na formação das interfaces de ligação entre septinas.^{40, 42}

Além desse domínio central conservado, as septinas também apresentam regiões N e C - terminais variáveis, sendo que pouco se sabe sobre suas estruturas e funções.

O N-terminal de algumas septinas apresenta uma sequência adjacente ao domínio G – localizada na hélice $\alpha 0$ – que é rica em resíduos básicos, conhecida como região polibásica. Em várias espécies, observou-se que essa região é uma das responsáveis pela ligação das septinas à membranas, especialmente aos fosfoinositóis.⁴³⁻⁴⁵ Ademais, existem evidências

experimentais de que o N-terminal pode ser intrinsicamente desordenado em determinadas septinas.⁴⁶

De maneira semelhante ao N-terminal, o domínio C-terminal das septinas também varia consideravelmente em termos de sequência e comprimento. A maioria das septinas apresenta no C-terminal uma região de α -hélice, capaz de se organizar em estrutura do tipo *coiled-coil*.^{4,40} Esse domínio foi apontado como necessário para a interação entre septinas.^{42,44} Entretanto, como não é ubíquo a todas as septinas, estudos mais recentes sugerem outras funções associadas. Como um exemplo, já foi descrito por nosso grupo de pesquisa que o C-terminal da septina 10 de *Schistosoma mansoni* é responsável pela interação dessa proteína com membranas.⁴⁷ A Figura 3A ilustra a distribuição desses domínios proteicos.

Figura 3 - Representações esquemáticas de septinas. A) Domínios estruturais de uma septina típica: região polibásica presente no N-terminal, domínio GTPase com os motivos G1, G3 e G4, elemento único de septinas (SUE) e C-terminal com *coiled-coil*. B) As septinas de animais podem ser classificadas nos grupos da SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7.

Fonte: Elaborada pela autora.

Baseando-se nas similaridades das sequências e dos domínios estruturais, as septinas de metazoários podem ser categorizadas em quatro grupos (Figura 3B). Originalmente, Kinoshita desenvolveu essa classificação para septinas humanas.⁹ Posteriormente, por meio de uma análise filogenética e evolucionária, Cao et al. demonstraram que as septinas de outros metazoários também poderiam ser divididas entre esses mesmos grupos.⁴⁸

As septinas humanas que compõem os grupos da SEPT6 (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14) e da SEPT7 apresentam domínios C-terminal longos e com sequências preditas de formar *coiled-coils*. Entretanto, as septinas do grupo da SEPT6 não possuem uma treonina conservada e essencial para a atividade catalítica do domínio G.⁴⁹ Assim, essas septinas não são capazes de hidrolisar o GTP. Já o grupo da SEPT3, composto pelas septinas SEPT3, SEPT9 e SEPT12, é característico pela ausência de *coiled-coil* no curto domínio C-terminal. As demais septinas humanas - SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5 - apresentam domínio *coiled-coil* mais curto em relação à SEPT7 e formam o grupo da SEPT2. Essa classificação não permite descrever as relações de ortologia entre septinas de animais e fungos, apesar de existirem semelhanças estruturais.⁶

Como já foi mencionado anteriormente, um importante aspecto das septinas é a capacidade de elas interagirem entre si e formarem hetero-oligômeros. O tamanho desses complexos é variável, visto que os organismos expressam quantidades diferentes de septinas. No caso de *C. elegans*, que só possui duas septinas, um hetero-tetrâmero com duas cópias de cada septina foi observado.⁵⁰ O complexo de septinas melhor caracterizado é o de *Saccharomyces cerevisiae*, formado pelas septinas essenciais Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12. Experimentos de microscopia eletrônica mostraram que essas septinas formam um octâmero com a seguinte ordem: Cdc11- Cdc12- Cdc3-Cdc10- Cdc10- Cdc3- Cdc12- Cdc11.⁵¹

Em humanos, as septinas se associam, predominantemente, em hexâmeros ou octâmeros.⁵² Por meio da técnica de cristalografia de raio-X, Sirajuddin e colegas resolveram a estrutura do hexâmero formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 (Figura 4A).⁵³ Estudos recentes mostraram que esse hetero-oligômero é formado por repetições das septinas 2-6-7-7-6-2, nessa ordem.⁵⁴⁻⁵⁵ Cada septina apresenta duas interfaces de interação. Elas foram denominadas de interfaces G e NC. A primeira é formada, em parte, pelo sítio de ligação ao nucleotídeo. Já a interface NC é composta, predominantemente, pelas regiões N e C terminais do domínio G.

As interações entre SEPT2-SEPT2 e SEPT6-SEPT7 são mediadas pelas interfaces NC, já as interações entre SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT7 são geradas pelas interfaces G. Mesmo a 4 Å de resolução, as densidades eletrônicas dos nucleotídeos são perceptíveis. As septinas 2 e 7 estão ligadas à GDP, enquanto uma molécula de GTP encontra-se ligada à SEPT6. Isso é coerente, visto que as septinas do grupo da SEPT6 não têm atividade catalítica.

Posteriormente, Sandrock et al e Kim et al mostraram que a SEPT9 se associa a esse complexo por interagir com a SEPT7, formando um octâmero (2-6-7-9-9-7-6-2).⁵⁶⁻⁵⁷

Diversos estudos (*in vitro* e *in vivo*) mostraram que septinas pertencentes ao mesmo grupo podem substituir umas às outras na mesma posição do complexo.⁵⁷⁻⁵⁸ Por exemplo, SEPT2 poderia ser substituída pelas septinas 1, 4 ou 5. Assim, existiriam 60 combinações teóricas possíveis para as septinas humanas (Figura 4B). Entretanto, acredita-se que o número de hetero-oligômeros biologicamente relevantes seja menor do que esse valor, já que algumas septinas só são expressas em tecidos e células específicos.⁵⁹

Figura 4 - Estruturas dos hetero-oligômeros de septinas. A) Hexâmero formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7, as quais interagem entre si por suas interfaces NC e G. Observa-se a presença de GTP (magenta) e de GDP (verde) nas estruturas. O código PDB do complexo: 2QAG. B) As interfaces NC e G de uma septina estão indicadas na representação. Dentro de um filamento, septinas do mesmo grupo poderiam se substituir.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os hetero-oligômeros interagem entre si, ponta a ponta, formando filamentos apolares.⁴⁰ Experimentos de microscopia eletrônica mostraram que septinas de diversos organismos

formam filamentos *in vivo* e *in vitro*.^{2, 60-62} Além disso, esses filamentos também podem se agrupar por meio de interações laterais. Bertin et al. reportaram conexões entre filamentos paralelos, que formavam estruturas semelhantes a trilhos de trem. Essas interações laterais foram atribuídas aos *coiled-coils* que se encontram perpendiculares aos filamentos.⁵¹ A organização das septinas em estruturas ainda mais complexas, como anéis⁶³⁻⁶⁴ e redes,⁶⁵⁻⁶⁶ também foi descrita.

Os mecanismos que regulam a formação desses filamentos ainda não foram completamente elucidados, mas acredita-se que fatores intrínsecos e extrínsecos às septinas atuem nessa regulação. Estudos estruturais abordaram o papel da ligação e hidrólise dos nucleotídeos de guanina na auto-regulação das septinas.⁴⁰ Ademais, a ligação das septinas às proteínas parceiras, como as Borgs,⁶⁷ e às membranas fosfolipídicas^{64-65,68} também atuam como fatores de regulação externos às septinas.

1.3 Septinas em *Schistosoma mansoni*

Nesse estudo, utilizaram-se as septinas de *Schistosoma mansoni*. Esse platelminto é o agente etiológico da esquistossomose, uma doença tropical que afeta mais de 200 milhões de pessoas mundialmente.⁶⁹

As septinas de *S. mansoni* foram previamente caracterizadas pela Dra. Ana Eliza Zeraik, durante seu doutoramento em nosso grupo de pesquisa. No seu estudo, quatro sequências, homólogas a três septinas humanas, foram identificadas no genoma do platelminto, as quais foram nomeadas *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2* devido às similaridades na sequência de aminoácidos com as septinas humanas SEPT5, SEPT10 e SEPT7, respectivamente.⁷⁰ As porcentagens de identidade encontram-se na Tabela 1. Essas proteínas apresentaram todos os domínios conservados em septinas, com exceção da *SmSEPT10*, em que a região polibásica é ausente (Figura 5).⁷⁰

Tabela 1 - Porcentagem de identidade entre as septinas de *S. mansoni* e de humanos.

Septinas	Porcentagem de identidade (%)
<i>SmSEPT5</i> – SEPT5	57
<i>SmSEPT10</i> – SEPT10	65
<i>SmSEPT7.1</i> – SEPT7	47
<i>SmSEPT7.2</i> – SEPT7	55

Fonte: Adaptada de ZERAIK⁷⁰

Figura 5 - Representação esquemática das septinas de *Schistosoma mansoni*. Da esquerda à direita, encontram-se a região polibásica (PB) no N-terminal, o domínio GTPase, o elemento único de septina (SUE) e o coiled-coil (CC) no C-terminal.

Fonte: ZERAIK⁷¹

As septinas de *S. mansoni* podem ser classificadas nos quatro grupos derivados das septinas humanas. A *SmSEPT5* pertence ao grupo da SEPT2, a *SmSEPT10*, ao da SEPT6 e as *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2*, ao grupo da SEPT7. É interessante notar que *S. mansoni* apresentou uma possível duplicação gênica, o que resultou em duas septinas 7, grupo que em outros organismos contém apenas um membro.⁷⁰ A ausência de septinas do grupo da SEPT3 é coerente com o que foi observado em outros protostômios, como *C. elegans* e *D. melanogaster* e acredita-se que isso decorra de uma deleção em um ancestral em comum.⁴⁸

Experimentos de microscopia eletrônica revelaram que o hetero-oligômero formado pelas septinas *SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2* pode polimerizar-se em filamentos e estruturas maiores como feixes de filamentos e anéis.⁷² Apesar de não existir confirmação experimental, acredita-se que essas proteínas se organizem no complexo como o hetero-oligômero formado pelas septinas humanas SEPT2/SEPT6/SEPT7.

As septinas *SmSEPT5* e *SmSEPT7.2* apresentaram atividade catalítica, enquanto *SmSEPT10* não foi capaz de hidrolisar GTP.⁷¹ Isso era esperado, visto que é uma característica em comum entre septinas do grupo da SEPT6. A avaliação dos estados oligoméricos das septinas *SmSEPT5* e *SmSEPT10* indicou que essas proteínas formam homo-dímeros em solução.⁴⁷ Como as construções *SmSEPT5G*, *SmSEPT10G* (somente o domínio G das respectivas proteínas) e *SmSEPT10NG* (N-terminal e domínio G) são encontradas na forma monomérica, enquanto a *SmSEPT10GC* (domínio G e C-terminal) é dimérica, concluiu-se que a homo-oligomerização da *SmSEPT10* ocorre pelo domínio C-terminal. Quanto a *SmSEPT5*, só foi possível afirmar que a formação do homo-dímero não ocorre pela interface G.

Os estados oligoméricos de todas essas proteínas não foram alterados pela incubação com GTP e GDP, diminuição da concentração de sal ou tratamento com fosfatase alcalina.⁴⁷ No entanto, hetero-dímeros constituídos pelas construções *SmSEPT5G* e *SmSEPT10G* foram formados somente quando incubados com GTP, GDP ou GTP γ . Isso indica que essas septinas interagem entre si pela interface G, o que reforça a hipótese de que o complexo de septinas de *S. mansoni* seja semelhante ao de septinas humanas.⁴⁷

Dentre as análises biofísicas realizadas com as septinas individuais de *S. mansoni*, vale ressaltar os estudos de agregação e formação de filamentos β -amilóides. A *SmSEPT5* mostrou-se mais sensível à temperatura, sendo que, a partir de 30 °C, foi observada a formação de agregados proteicos e amilóides. Para a *SmSEPT10*, esses fenômenos ocorreram a partir de 37 °C.⁴⁷

As únicas estruturas cristalográficas obtidas das septinas de *S. mansoni* foram da construção *SmSEPT10G* ligada a GTP e outra a GDP.⁷³ A diferença mais relevante entre essas estruturas foi um deslizamento de uma fita β no domínio GTPase, no qual os resíduos Lys93 e Leu94 da proteína com GDP assumem as posições de Lys95 e Leu96 na construção com GTP. Assim, as fitas $\beta 2$ e $\beta 3$ encontram-se estendidas na direção da interface NC na presença do GTP.⁷³ Sugeriu-se que essa mudança estrutural poderia participar do mecanismo pelo qual as septinas se ligam às membranas, visto que Zhang et al. verificaram a importância da hidrólise de GTP para a interação.⁴³ Além disso, deslizamentos semelhantes são observados em proteínas da família das Arfs. Nessas GTPases, a associação com fosfolipídios depende da exposição de um grupo miristoil no N-terminal, na presença de GTP, e não de GDP.⁷⁴

1.4 Interação de septinas com membranas

Como as septinas são encontradas no córtex das células e estão envolvidas em processos de remodelamento de membranas, o entendimento do processo de associação de septinas às membranas celulares se mostra essencial, entretanto esses mecanismos ainda são pouco entendidos.

Como já foi mencionado, vários estudos reportaram que a região responsável pela interação proteína-membrana é uma sequência polibásica conservada, presente no N-terminal das septinas. Zhang et al. mostraram que a septina 4 de camundongo ligava-se às membranas por meio da interação específica da região polibásica com fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato (PI(4,5)P₂).⁴³ Observou-se também que o domínio N-terminal da Cdc10 de *Saccharomyces*

cerevisiae participa da interação com monocamadas lipídicas contendo o mesmo fosfolipídio.⁶⁵ De maneira semelhante, experimentos com mutantes da Cdc11 de levedura demonstraram que a mesma região básica é necessária para a ligação a fosfatidilinositol-4-fosfato e fosfatidilinositol-5-fosfato (respectivamente, PI(4)P e PI(5)P).⁴⁴

Entretanto, estudos mais recentes revelaram que outros domínios proteicos também atuam na interação de septinas às membranas. Por exemplo, uma hélice anfipática conservada no C-terminal da Cdc12 revelou-se importante para a ligação dessa septina aos lipídios.⁷⁵ Outro trabalho identificou duas hélices anfipáticas, adjacentes a sequências polibásicas, presentes nos domínios G e N-terminal da SEPT9 humana.⁷⁶ Verificou-se que a associação dessa septina às membranas era dependente das hélices, e não dos resíduos básicos, os quais proporcionavam a especificidade de ligação aos fosfoinositois (PIs).

Essa observação realça um aspecto importante da ligação das septinas às membranas: a especificidade por diferentes fosfolipídios. É evidente que existe uma ligação preferencial de septinas ao lipídio PI(4,5)P₂, entretanto interações com outros fosfolipídios já foram reportadas. Diversos estudos mostraram interações com outros PIs, como PI(4)P e PI(5)P. Complexos de septinas de mamíferos (SEPT2/SEPT6/SEPT7) ligaram-se a lipossomos gigantes de PC:PI (fosfatidilcolina e fosfatidilinositol), embora nenhuma interação tenha sido observada com PA (ácido fosfatídico), PG (fosfatidilglicerol) ou PS (fosfatidilserina).⁶⁸ Steels et al. mostraram que septinas individuais humanas SEPT12 e SEPT2, assim como a SEPT12 de rato, interagem com os lipídios PI e PS.⁷⁷ O complexo de septinas de *Saccharomyces cerevisiae* também interage com PS, apesar da afinidade da interação ser menor do que com PIs.⁷⁵

Outra questão relevante relacionada à organização de septinas em membranas é o fato de estas proteínas serem encontradas normalmente em regiões em que as membranas são altamente curvadas, como no septo do brotamento em leveduras e na base de dendritos e cílios.^{21-22,78} Sugere-se, portanto, que as septinas reconheçam a curvatura ou influenciem a mudança de forma das membranas.

Vários estudos já mostraram a capacidade das septinas de deformarem vesículas *in vitro*. A adição do complexo de septinas humanas recombinantes em suspensões com vesículas gigantes unilamelares (GUVs) induziu a protusão de túbulos, sendo esse um indício da capacidade das septinas de produzir a curvatura na membrana.⁶⁸ Recentemente, Beber et al. relataram que o complexo de septinas de levedura é capaz de remodelar GUVs e de induzir a tubulação. Curiosamente, quando essas septinas foram expostas simultaneamente a curvaturas positivas (convexas) e negativas (côncavas), verificou-se que os filamentos formados

apresentaram preferência de ligação às superfícies côncavas.⁷⁹ Em contrapartida, estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Amy Gladfelter, mostraram que septinas de fungos e humanas são capazes de distinguir curvaturas convexas. As septinas de ambos os organismos adsorveram-se predominantemente às membranas com curvaturas positivas de $2\ \mu\text{m}^{-1}$.⁸⁰ Além disso, para o complexo de septinas de levedura, a capacidade de distinguir diferentes curvaturas foi atribuída à hélice anfipática presente no C-terminal da Cdc12.⁷⁵

Especialmente para as septinas de *S. mansoni*, um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa reportou que tanto as septinas individuais *SmSEPT5* e *SmSEPT10*, quanto o hetero-oligômero (*SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2*), interagiram com GUVs (Figura 6).⁴⁷

Como era esperado, a presença de fosfolipídios negativamente carregados – PI(4,5)P₂ ou PS - na membrana foi necessária para ligação, o que reforça a hipótese de que essa interação apresente um caráter eletrostático.

Figura 6 - Septinas individuais de *S. mansoni* ligam-se às GUVs. Vesículas compostas por 94,9 mol% DOPC, 5 mol% PI(4,5)P₂ e 0,1 mol% Rh-DPPE foram incubadas com 100 nM de septinas individuais de *S. mansoni* marcadas (verde): A) *SmSEPT5*; B), C) e D) *SmSEPT10*. Observa-se que ambas as septinas individuais interagem com as membranas, entretanto a *SmSEPT10* parece formar estruturas de “gaiola” que distorcem as GUVs.

Fonte: ZERAIK⁴⁷

No caso da *SmSEPT10*, observou-se que essa proteína formava uma estrutura de rede que deformava as vesículas, gerando curvaturas diferentes (Figuras 6C e D). A ligação dessa proteína à membrana foi um resultado surpreendente, visto que a *SmSEPT10* não possui a região polibásica no N-terminal.

Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que a região C-terminal da septina 10 de *S. mansoni* promovia a interação com as membranas, dado que *SmSEPT10G* e *SmSEPT10NC* não foram capazes de se associarem às GUVs (Figura 7).⁴⁷

Figura 7 - O C-terminal da *SmSEPT10* é necessário para a ligação às GUVs. Vesículas gigantes (94,9 mol% DOPC, 5 mol% PI(4,5)P₂ e 0,1 mol% Rh-DPPE) foram incubadas com 100 nM de construções proteicas da *SmSEPT10* marcadas (verde): A) *SmSEPT10G* (somente o domínio GTPase); B) *SmSEPT10NG* (N-terminal e domínio GTPase); e C) *SmSEPT10GC* (domínio GTPase e C-terminal). A interação com as membranas só foi observada na presença do C-terminal da proteína. A escala equivale a 30 μm.

Fonte: ZERAIK⁴⁷

Aspectos ainda não elucidados sobre a interação de septinas de *S. mansoni* com membranas motivaram a execução desse trabalho, visando esclarecer, de forma comparativa, questões relevantes como a influência da curvatura das membranas na ligação de septinas, a especificidade de interação dessas proteínas individuais e de hetero-complexos de septinas a diferentes fosfolipídios e o novo mecanismo pelo qual o C-terminal da *SmSEPT10* se liga às membranas.

2 OBJETIVOS

Com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a interação entre septinas e membranas, traçaram-se os seguintes objetivos específicos:

- Produzir de forma recombinante as septinas de *Schistosoma mansoni* em complexo e isoladamente;
- Analisar a importância da curvatura das membranas para interação septina-lipídios;
- Avaliar a especificidade de ligação das septinas de *S. mansoni* e, comparativamente, do complexo de *Ciona intestinalis* a diferentes fosfolipídios;
- Investigar o mecanismo de interação do domínio C-terminal da *SmSEPT10* com modelos de membrana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão das septinas de *S. mansoni*

As metodologias de clonagem, expressão e purificação das septinas individuais e do heterocomplexo de septinas de *S. mansoni* são uma atualização do protocolo desenvolvido pela Dra. Ana Eliza Zeraik.⁷¹ As sequências codificantes correspondentes às septinas 5, 7.2 e 10 de *Schistosoma mansoni* (*SmSEPT5*, *SmSEPT7.2* e *SmSEPT10*, respectivamente) e à construção derivada *SmSEPT10G* foram cedidos pela Dra. Ana Eliza Zeraik já inseridas nos vetores de expressão indicados na Tabela 2.

A CDS (do inglês, *coding DNA sequence*) da construção *SmSEPT10C* foi obtida usando a sequência da septina 10 inserida no vetor pET28a como molde para a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* flanqueando a sequência de DNA de interesse. Esta foi subclonada no vetor pET28a(+), a fim de produzir a proteína truncada *SmSEPT10C*-His, utilizando protocolos padrão de clonagem como descritos em Sambrook et al.⁸¹

Também foram produzidos cinco mutantes da *SmSEPT10C*. Em cada um deles, substituiu-se pontualmente um aminoácido de cadeia lateral pequena, todos próximos a regiões positivamente carregadas, por uma cisteína. Considerando que o C-terminal da septina 10 tem 106 resíduos, as construções mutantes foram nomeadas de *SmSEPT10C* S8C, *SmSEPT10C* A49C, *SmSEPT10C* A65C, *SmSEPT10C* A83C e *SmSEPT10C* G98C. As sequências codificantes desses cinco mutantes foram sintetizadas e inseridas no vetor de expressão pET28a(+) TEV pela empresa GenScript.

Detalhes sobre as construções encontram-se na Tabela 2. Vale ressaltar que a cauda de histidina foi fusionada à extremidade N-terminal das construções.

Tabela 2 - Detalhamento das construções utilizadas.

Proteína	Construção	Massa molecular (kDa)	Vetor de expressão	Sítios de restrição utilizados	Referência
<i>SmSEPT10</i>	Proteína inteira com His-tag*	50,5	pET28a(+)	<i>NheI</i> e <i>BamHI</i>	Zeraik ⁷⁰
Hetero-complexo de septinas de <i>S. mansoni</i>	<i>SmSEPT10</i> , <i>SmSEPT5</i> e <i>SmSEPT7.2</i> – His-tag (proteínas inteiras)	<i>SmSEPT10</i> - 48,1, <i>SmSEPT5</i> - 51,3 e <i>SmSEPT7.2</i> - 59,3	<i>SmSEPT10</i> - pACYCDuet-1, <i>SmSEPT5</i> e <i>SmSEPT7.2</i> - pETDuet-1	<i>SmSEPT10</i> - <i>BglII</i> e <i>XhoI</i> , <i>SmSEPT5</i> - <i>BglII</i> e <i>XhoI</i> e <i>SmSEPT7.2</i> - <i>NcoI</i> e <i>BamHI</i>	Zeraik ⁷²

(continua)

(continuação)

Proteína	Construção	Massa molecular (kDa)	Vetor de expressão	Sítios de restrição utilizados	Referência
<i>SmSEPT10G</i>	Domínio GTPase (aminoácidos 39 a 306) com His-tag	33,3	pET28a(+)	<i>NheI</i> e <i>BamHI</i>	Zeraik ⁷³
<i>SmSEPT10C</i>	Domínio C - terminal (aminoácidos 307 a 412) com His-tag	15,3	pET28a(+)	<i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	Este trabalho
<i>SmSEPT10C S8C</i>	Domínio C - terminal mutado, com troca da Ser8 por Cys (His-tag)	15,3	pET28a(+) TEV	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	Este trabalho
<i>SmSEPT10C A49C</i>	Domínio C - terminal mutado, com troca da Ala49 por Cys (His-tag)	15,3	pET28a(+) TEV	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	Este trabalho
<i>SmSEPT10C A65C</i>	Domínio C - terminal mutado, com troca da Ala65 por Cys (His-tag)	15,3	pET28a(+) TEV	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	Este trabalho
<i>SmSEPT10C A83C</i>	Domínio C - terminal mutado, com troca da Ala83 por Cys (His-tag)	15,3	pET28a(+) TEV	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	Este trabalho
<i>SmSEPT10C G98C</i>	Domínio C - terminal mutado, com troca da Gly98 por Cys (His-tag)	15,3	pET28a(+) TEV	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	Este trabalho

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a transformação da linhagem de expressão *E. coli* Rosetta (DE3), os plasmídeos contendo a *SmSEPT10*, a *SmSEPT10G*, a *SmSEPT10C* ou as construções mutantes foram misturados com as células competentes e incubados em gelo por 30 min. Em seguida, essas bactérias foram submetidas a um choque térmico à 42 °C por 90 segundos, seguidos de 90 segundos em banho de gelo. Após o choque, houve a adição de 250 µL de meio de cultura LB (*Lysogenic-Broth*) e incubou-se a mistura à 37 °C por 1 hora sob agitação constante (250 rpm). Posteriormente, essas células foram plaqueadas em meio LB ágar contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). As placas foram incubadas à 37 °C por 16 h.

Para a expressão das proteínas, inoculou-se uma colônia dessa placa em 5 mL de meio líquido LB contendo os mesmos antibióticos presentes na placa. Após 16 h de incubação à 37 °C sob agitação constante, esse inóculo foi diluído em 1L de meio de cultura LB, contendo os mesmos antibióticos, e incubado novamente sob as mesmas condições. A indução da expressão foi feita pela adição de 0,4 mM de IPTG ao meio quando a densidade óptica atingiu

(DO_{600nm}) valores entre 0,6 e 0,8. Em seguida, a suspensão celular foi incubada à 18 °C por 16 h, sob agitação constante.

Para a produção do heterocomplexo, utilizou-se o sistema de coexpressão. Como está apresentado na Tabela 2, a CDS da *SmSEPT10* foi inserida no vetor pACYCDuet-1 (Novagen), entre os sítios *Bgl*III e *Xho*I, já as sequências codificantes das septinas 5 - *SmSEPT5* - e 7.2 - *SmSEPT7.2* - foram inseridos no vetor pETDuet-1 (Novagen) entre os sítios *Bgl*III, *Xho*I e *Nco*I, *Bam*HI, respectivamente. Células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes foram cotransformadas com os vetores por meio do choque térmico, sendo os transformantes selecionados em placas contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (50 µg/mL). Assim como nos casos das septinas individuais, a expressão do complexo de septinas foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG à cultura bacteriana em meio LB, incubando-se por 16 h à 18 °C.

Em todos os casos, após a expressão, a suspensão celular foi centrifugada à 6000 g por 45 minutos à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de células foi ressuspensão em 30 mL de tampão A (HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, 10% (v/v) de glicerol e β-mercaptoetanol 5 mM), no caso da *SmSEPT10*, *SmSEPT10G*, *SmSEPT10C* e dos mutantes, ou de tampão B (HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, 10% (v/v) de glicerol e β-mercaptoetanol 5 mM), no caso do heterocomplexo.

Em seguida, as células foram lisadas por sonicação, com amplitude de 15%, em 10 ciclos de 25 segundos, intercalados com 59 segundos de pausa, em banho de gelo. Para obter a porção solúvel, a amostra foi centrifugada à 17000 g por 30 minutos, à 4 °C. No caso do heterocomplexo, esse processo de centrifugação foi realizado duas vezes para assegurar a completa separação da porção insolúvel.

3.2 Purificação da *SmSEPT10* e de suas construções

A primeira etapa de purificação da *SmSEPT10*, *SmSEPT10G* e *SmSEPT10C* foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando em todos os casos 2 mL da resina Ni-NTA (Qiagen), previamente equilibrados com o tampão A. Cada extrato solúvel foi repassado pela resina cinco vezes, seguindo-se três lavagens de 30 mL: a primeira lavagem composta pelo mesmo tampão A, a segunda pelo tampão A acrescido de 0,2% (v/v) de Tween-20 e a terceira, pelo tampão A contendo 10 mM de imidazol. A eluição das proteínas foi realizada com 7 mL de tampão A contendo 500 mM de imidazol.

A segunda etapa da purificação constituiu-se em uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE *Healthcare*), realizada em um cromatógrafo *AKTA purifier* (GE *Healthcare*). Novamente, utilizou-se o tampão A para todas as proteínas, sendo que o fluxo foi mantido a 0,5 mL/min e alíquotas de 1 mL da eluição foram coletadas. A pureza das proteínas foi monitorada por SDS-PAGE 12%.

3.3 Purificação dos mutantes da *SmSEPT10C*

Para a purificação das construções mutantes, optou-se por um protocolo desnaturante. Realizou-se uma etapa de cromatografia de afinidade igual à descrita anteriormente, com exceção do tampão de ressuspensão, o qual foi o tampão A com adição de ureia 6M, e das lavagens. A primeira lavagem foi constituída pelo tampão de ressuspensão, a segunda, pelo tampão A e a terceira, pelo tampão A com 10 mM de imidazol. A eluição dos mutantes foi realizada com 7 mL de tampão A acrescido de 250 mM de imidazol e mais 7 mL do tampão A com 500 mM de imidazol.

A pureza das proteínas foi monitorada por SDS-PAGE. As construções mutantes não foram submetidas à nova etapa de purificação.

3.4 Purificação do complexo de septinas de *S. mansoni*

Assim como no caso das septinas individuais, duas técnicas cromatográficas foram empregadas. Primeiramente, o heterocomplexo de *S. mansoni* foi purificado por meio da coluna HisTrap FF de 5 mL (GE *Healthcare*) acoplada ao sistema *AKTA purifier*. O extrato foi adicionado à coluna previamente equilibrada com o tampão B. A coluna foi lavada com 25 mL de tampão B contendo 50 mM de imidazol. Por fim, o heterocomplexo foi eluído da coluna com 15 mL de tampão B acrescido de 500 mM de imidazol.

Assim como no caso das septinas individuais, realizou-se a seguir uma cromatografia de exclusão molecular. Contudo, para o heterocomplexo, utilizou-se o tampão B. A pureza do complexo também foi avaliada por SDS-PAGE.

3.5 Produção dos complexos de septinas de *C. intestinalis*

Valendo-se da diversidade de septinas de diferentes organismos estudadas por nosso grupo, a interação do heterocomplexo de septinas de *Ciona intestinalis* com membranas também foi avaliada.

A ascídia *Ciona intestinalis* foi um dos urocordados utilizados nas análises filogenéticas de septinas de metazoários.⁴⁸ Esse organismo, que é um dos invertebrados mais próximos dos vertebrados, apresenta quatro septinas representativas de todos os grupos: *CiSEPT2*, *CiSEPT6*, *CiSEPT7* e *CiSEPT9*, as quais foram nomeadas de acordo com as similaridades com as septinas humanas.^{48, 82} O heterocomplexo utilizado é formado por essas septinas. As etapas de clonagem, expressão e purificação do heterocomplexo de *C. intestinalis* foram realizadas pela aluna de doutorado do nosso grupo, Sinara Brasil.

Resumidamente, para produzir o heterocomplexo de *C. intestinalis* realizou-se a coexpressão de *CiSEPT2*-*CiSEPT6* e de *CiSEPT7*-*CiSEPT9* separadamente. O cDNA de *CiSEPT2* foi inserido no vetor pET28a(+), já o de *CiSEPT6*, no pETDuet-1. Células competentes de *E. coli* da linhagem Rosetta (DE3) foram cotransformadas com esses vetores. No caso da *CiSEPT7* e da *CiSEPT9*, utilizou-se o vetor bicistrônico pETDuet-1 para a coexpressão de ambas as proteínas, utilizando a mesma linhagem bacteriana de expressão.

Esses dois complexos, contendo duas septinas cada, foram purificados por cromatografia de afinidade, por meio da coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare). Em seguida, realizou-se a cromatografia de exclusão molecular com a coluna Superdex 200 10/300 GL. Ambas as colunas estavam acopladas ao sistema AKTA purifier. Para a formação do heterocomplexo inteiro (septinas 2, 6, 7 e 9), os complexos foram incubados por 2 horas em banho de gelo e purificados novamente por cromatografia de exclusão molecular. O tampão de estoque desse heterocomplexo foi HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, 5% (v/v) de glicerol, MgCl₂ 5 mM.

3.6 Avaliação do estado oligomérico da *SmSEPT10C* por cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos

A técnica de SEC-MALS (do inglês, *size exclusion chromatography with multi-angle light scattering*) é utilizada para medir as massas de macromoléculas. A cromatografia de exclusão molecular separa moléculas com base em seus volumes hidrodinâmicos. É possível determinar as massas dessas moléculas ao se empregar uma curva de calibração, na qual se

utiliza padrões de proteínas globulares de massas conhecidas. Entretanto, essa técnica apresenta menor acurácia para proteínas não-globulares. Já a técnica MALS utiliza a intensidade e a dependência angular da luz espalhada acoplada à determinação do índice de refração para medir a massa molecular dessas moléculas em solução. A combinação dessas duas técnicas proporciona resultados mais precisos sobre as massas.⁸³

Por meio dos *softwares* LOGICOIL e COILS, previu-se a formação de um *coiled-coil* em quase toda a extensão do C-terminal da SmSEPT10.⁷⁰ Portanto, por apresentar uma estrutura alongada, experimentos de SEC-MALS foram realizados a fim de determinar o estado oligomérico dessa construção proteica.

Após todas as etapas de purificação, aplicou-se 50 µL da SmSEPT10C concentrada em uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada aos sistemas mini DAWN TREOS (Wyatt Technologies) e OptiLab. Foram realizadas medidas de espalhamento estático a três ângulos (43,6°, 90,0° e 136,4°) e do índice de refração diferencial. Utilizou-se o *software* ASTRA 7 (Wyatt Technologies) para o cálculo da massa molecular.

3.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Como todos os mutantes da construção SmSEPT10C foram purificados utilizando um protocolo desnaturante, a técnica de CD (do inglês, *circular dichroism*) na região do UV-distante foi usada para confirmar a aquisição de estrutura secundária após o reenovelamento dessas proteínas.

Após a purificação, utilizou-se a coluna PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare) para trocar o tampão das proteínas por um contendo fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) e NaCl 100 mM.

Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J815 no intervalo de comprimento de onda de 190 a 280 nm à 20 °C, utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho ótico. O espectro apresentado é uma média de seis varreduras acumulativas a uma velocidade de 50 nm/min. Os espectros foram processados por meio do *software* CDTools,⁸⁴ incluindo subtração da linha de base e média dos espectros.

3.8 Marcação das proteínas

Para os experimentos de microscopia confocal, todos os heterocomplexos de septinas e a SmSEPT10 foram marcados com AlexaFluor 488 NHS ester (Life technologies) de acordo

com uma adaptação do protocolo fornecido pelo fabricante. Esse fluoróforo foi dissolvido, previamente, em DMSO à concentração final de 10 mg/mL e dividido em alíquotas de 10 μ L, as quais eram conservadas à -20 °C.

O fluoróforo foi adicionado à solução da proteína com excesso molar de 3x e essa mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e, em seguida, por mais 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. O excesso da sonda foi retirado por meio de uma coluna PD SpinTrap G-25 (GE *Healthcare*). Esse fluoróforo também foi utilizado nos experimentos de termoforese em microescala (MST, do inglês *microscale thermophoresis*), sendo que o protocolo de marcação foi o mesmo.

Além disso, na técnica de MST, utilizou-se também o fluoróforo RED-tris-NTA (NT-647 da empresa Nanotemper *Technologies*). Essa sonda liga-se à cauda de histidina da proteína. Empregou-se o protocolo de marcação disponibilizado pelo fabricante. A sonda foi solubilizada em tampão PBS-T a uma concentração de 5 μ M. Misturaram-se o fluoróforo e a proteína de modo que a concentração proteica era o dobro da concentração da sonda. Essa solução foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a amostra foi centrifugada por 10 minutos à 4 °C e 15000 g. Essa técnica de marcação não requer a remoção do excesso da sonda.

Já para a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês *electron paramagnetic resonance*), as cinco construções mutantes foram marcadas com a sonda paramagnética metanotiosulfonato (MTSSL). Para que essa estratégia fosse utilizada, o agente redutor β -mercaptoetanol foi retirado do tampão por meio de uma cromatografia de exclusão molecular com a coluna HiTrap *Desalting* (GE *Healthcare*) de 5 mL, em um cromatógrafo *AKTA purifier*. A proteína eluída da coluna estava no tampão de marcação composto por HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM e 10% (v/v) de glicerol.

Em seguida, essas construções foram incubadas com MTSSL em excesso de 3 vezes em relação à concentração da proteína, por 2h à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a etapa de marcação, os mutantes foram, novamente, submetidos à cromatografia de exclusão molecular, na mesma coluna usada anteriormente, para que o excesso do marcador MTSSL fosse removido. O tampão final dos mutantes foi HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 10% (v/v) de glicerol e dextrose 0,5 M.

Por fim, essas construções foram concentradas em sistema Millipore (NMWL 3 kDa).

3.9 Preparação das vesículas unilamelares

Os lipídios POPC (1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina), POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina), 18:1 PI(4,5)P₂ (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'mio-inositol-4',5'-bisfosfato)), Rhod-PE (N-lissamina B sulfonil Rodamina ligada a fosfatidiletanolamina da lecitina de ovo) e 16:0 NBD-PE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)) foram adquiridos comercialmente da empresa *Avanti Polar Lipids*. Esses lipídios foram dissolvidos em clorofórmio e misturados de acordo com a composição pretendida, posteriormente descrita. Essa mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio ou argônio. Para retirar qualquer resquício do solvente orgânico, as amostras foram centrifugadas à vácuo por duas horas, no mínimo. Em seguida, os lipídios foram hidratados no tampão de escolha. As amostras foram submetidas a dez ciclos de congelamento/descongelamento.

Para a produção de vesículas unilamelares pequenas (SUV, da sigla em inglês, *small unilamellar vesicle*), a amostra foi sonicada em um sonicador de banho até que se obtivesse uma suspensão transparente.

No caso das vesículas unilamelares grandes (LUV, da sigla em inglês, *large unilamellar vesicles*), a mistura de lipídios foi extrusada em um mini-extrusor (*Avanti Polar Lipids*). O tamanho da vesícula foi dependente do poro da membrana utilizada.

Após a formação de ambos os tipos de vesículas, seu tamanho e qualidade foram certificados por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *dynamic light scattering*) com o equipamento Zetasizer µV (*Malvern Instruments*).

3.10 Microscopia confocal de fluorescência

Os experimentos de microscopia e suas análises foram realizados durante o estágio de seis meses no laboratório da Dra. Amy S. Gladfelter na Universidade da Carolina do Norte, EUA. A metodologia empregada foi uma adaptação do protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa norte-americano.⁸⁰

Essencialmente, nesse experimento, as septinas marcadas com um fluoróforo eram misturadas a suspensões de esferas maciças cobertas por uma bicamada de fosfolipídios também fluorescente. Por meio da microscopia confocal de fluorescência, pretendia-se

observar o acúmulo de proteínas em volta da bicamada, o que implica na ligação entre as septinas e os fosfolipídios.

Para tal experimento, SUVs foram adsorvidas às esferas não-funcionalizadas de sílica (Bangs *Laboratories*). Os diâmetros médios das esferas utilizadas foram de 0,96, 3,17, 5,06 e 6,46 μm . Esferas menores não foram usadas porque elas eram indistinguíveis dos agregados proteicos. As composições lipídicas das vesículas utilizadas foram de: 1) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rhod-PE; 2) 5 mol% PI(4,5)P₂, 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rhod-PE; e 3) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rhod-PE.

As misturas de vesículas, esferas e tampão de estoque da proteína a ser utilizada foram preparadas de acordo com os valores da Tabela 3 e mantidas sob agitação à 22°C por 1 hora. Foram adicionados 50 nmol de lipídios para cada 440 mm² de área superficial de esfera.

As esferas cobertas por uma bicamada lipídica foram centrifugadas por 30 segundos à velocidade mínima para a sedimentação. Quatro lavagens foram realizadas para remover o excesso de vesículas em solução. Por fim, essas esferas foram diluídas para o tampão final de reação para cada septina ou complexo, descrito a seguir.

Tabela 3 - Volumes de esferas e SUVs

Diâmetro da esfera (μm)	Volume da suspensão estoque da esfera (μl)	Volume de tampão (μl)	Volume de SUVs (μl)	Volume final da mistura (μl)
6,46	8,94	61,1	10	80
5,06	7,00	63	10	80
3,17	4,39	65,6	10	80
0,96	1,33	68,7	10	80

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o propósito de formar câmaras sobre uma lâmina para microscópio, cilindros plásticos foram colados às lâminas, cuja superfície foi previamente revestida com polietilenoglicol (Figura 8). Em cada câmara, adicionou-se: 10 μl de septina marcada com AlexaFluor 488 em seu respectivo tampão de estoque, 75 μl da suspensão de esferas cobertas por lipídios no tampão de reação e 15 μl de tampão de reação.

Para as septinas de *S. mansoni*, o tampão de reação foi composto por HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 10% (v/v) de glicerol, β -mercaptoetanol 5 mM, BSA (sem ácidos graxos) 1 mg/mL, 0,1% de metilcelulose e dextrose 0,5 M. Para o heterocomplexo de *C. intestinalis*, a composição foi HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 5% (v/v) de glicerol, $MgCl_2$ 5 mM, BSA (sem ácidos graxos) 1 mg/mL, 0,1% de metilcelulose e dextrose 0,5 M. A concentração final de proteína foi de: 83 nM do heterocomplexo de *C. intestinalis*, 250 nM do heterocomplexo de *S. mansoni* e 300 nM de SmSEPT10.

Imagens de cada câmara foram capturadas a cada 10 minutos desde a mistura, até 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Utilizou-se microscópio confocal com *spinning disk* (Nikon) e objetiva 100 $\times$ Plan Apo 1.49 NA (imersão à óleo) para a visualização. Todos os planos no eixo z foram coletados por meio do piezo *z-drive* (Mad City Labs), controlado pelo *software* Elements, com amostragem de *Nyquist* para os canais da rodamina e 488.

Figura 8 - Imagem de uma câmara. Cilindro plástico colado à superfície da lâmina.
Fonte: Elaborada pela autora.

O *software* Imaris 8.1.2 foi utilizado para a análise dos dados de microscopia confocal. O *background* de todas as imagens foi subtraído em ambos os canais por meio do filtro do programa. A superfície das esferas foi determinada pela fluorescência correspondente ao canal do lipídio. Em algumas imagens, observou-se que algumas das esferas estavam aglomeradas por causa dos filamentos de septinas ou que alguns agregados proteicos ficavam “presos” às membranas. Nesses casos, essas esferas foram excluídas da análise. A adsorção das septinas em cada esfera foi calculada pela divisão da soma da intensidade de fluorescência dessas proteínas (AlexaFluor 488) pela soma da intensidade de fluorescência do lipídio marcado (Rodamina B).

Os gráficos desses dados em relação à composição lipídica ou ao diâmetro das esferas foram gerados pelo *software* Origin. Os retângulos dos *boxplots* representam os quartis de 25% e 75% da amostra. A linha intermediária corresponde à mediana e o pequeno quadrado, à média. Os *whiskers* indicam 5% e 95% das amostras. Finalmente, os círculos mostram os *outliers*.

Durante a análise estatística desses dados, observou-se que a adsorção de septinas não apresentava uma distribuição normal. Assumindo uma abordagem não paramétrica, realizaram-se testes de Wilcoxon.

3.11 *PIP Strips*

PIP Strips são membranas de nitrocelulose que apresentam 15 lipídios imobilizados e mais um *spot* correspondente ao branco. Os ensaios com *PIP Strips* visaram determinar a especificidade de interação entre septinas e diferentes lipídios. Utilizaram-se os heterocomplexos de septinas de *S. mansoni* e de *C. intestinalis*, a *SmSEPT10* e a *SmSEPT10G*, a qual corresponde ao controle negativo.

Seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (TBS-T: 10 mM de Tris, pH 7,6, 140 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 + 0,1% de ovalbumina) por duas horas. Após o bloqueio, lavou-se a membrana com TBS-T três vezes. Essa etapa de lavagem foi repetida após todos os passos de incubação e antes da revelação. A proteína purificada foi incubada com a membrana *overnight* à 4°C em tampão TBS-T ou no mesmo acrescido de dextrose 0,5 M.

No dia seguinte, a membrana foi incubada com os anticorpos primário e secundário, ambos por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Por fim, a revelação foi feita com o *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) por 2 minutos e as imagens foram detectadas com o sistema *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad) a cada segundo. Analisaram-se as imagens capturadas após 1 minuto de detecção.

Antes da realização dos experimentos com as *PIP Strips*, foram realizados ensaios de *Western Blotting* para averiguar as concentrações ideais das proteínas e dos anticorpos utilizados (dados não mostrados). A concentração utilizada de *SmSEPT10* e de *SmSEPT10G* foi 0,25 µg/mL (5 nM e 8 nM, respectivamente), a do complexo de *S. mansoni* foi 151 µg/mL (0,7 µM) e a do complexo de *C. intestinalis* foi 156 µg/mL (0,5 µM).

Para os experimentos com a *SmSEPT10*, a *SmSEPT10G* e o heterocomplexo de *S. mansoni*, utilizaram-se o anticorpo primário anti-septina 10 (*Imuny Biotechnology*) e o

anticorpo secundário *goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated* (ThermoFisher Scientific) na proporção 1:30000. Para o heterocomplexo de *C. intestinalis*, empregaram-se o anticorpo primário anti-6xHis (Cusabio) e o anticorpo secundário *rabbit anti-mouse IgG HRP-conjugated* (Sigma-aldrich) (diluições 1:5000).

A análise quantitativa foi realizada com o *software* ImageLab5.2 (Bio-Rad). Os *spots* das membranas foram demarcados e a intensidade média dos pixels de cada área foi medida. O *background* geral da imagem foi subtraído. Calcularam-se as intensidades relativas ao branco de todos os *spots*. Gráficos dessas intensidades relativas com os respectivos desvios padrão foram gerados pelo *software* Origin.

3.12 Influência da dextrose na estabilidade térmica da SmSEPT10

Como será apresentada nos resultados a seguir, a interação das septinas com modelos de membrana somente foi observada na presença de 0,5M de dextrose. A fim de estudar o efeito desse monossacarídeo sobre a septina 10 de *Schistosoma mansoni*, empregaram-se as técnicas de fluorescência diferencial de varredura (DSF, do inglês *differential scanning fluorimetry*) e de CD.

A metodologia do DSF, rápida e pouco dispendiosa, permite analisar a estabilidade térmica de proteínas em diferentes situações.⁸⁵ Nesse experimento, monitora-se o desenovelamento térmico da proteína na presença de um fluoróforo hidrofóbico. Os fluoróforos utilizados nessa técnica apresentam alta intensidade de fluorescência em ambientes apolares, comparada a soluções aquosas, nas quais ocorre *quenching*.

Conforme há o aumento da temperatura e o desenovelamento da proteína, porções hidrofóbicas da mesma são expostas ao solvente. Assim, com o aumento da afinidade do fluoróforo pela proteína e, conseqüentemente, o aumento da intensidade de fluorescência, é possível medir a temperatura de desnaturação da proteína.

Utilizou-se, nesse caso, o fluoróforo *SYPRO Orange* (ThermoFisher Scientific), uma das melhores sondas para DSF, por que apresenta uma alta razão sinal-ruído e um comprimento de onda de excitação por volta de 500 nm, o qual reduz a possibilidade de que outras moléculas interfiram nas propriedades óticas do fluoróforo.⁸⁵

Após uma triagem inicial, determinou-se que as concentrações ideais da SmSEPT10 e de *SYPRO Orange* eram de 10 μ M e 50X, respectivamente, para um volume final de 50 μ L. Além da amostra com a proteína e o fluoróforo, realizaram-se ensaios controle somente com a

proteína ou o fluoróforo, sendo que todas as amostras foram repetidas quatro vezes. Utilizaram-se quatro tampões diferentes, os quais eram o tampão A, o mesmo com adição de 0,5 M de dextrose, de sorbitol ou de sacarose.

Baseando-se no protocolo descrito por Ericsson,⁸⁶ as amostras foram adicionadas a uma placa de 96 poços (Bio-Rad), a qual foi selada com uma fita apropriada da mesma marca. A placa foi aquecida em um termociclador CFX96 *Real-Time* (Bio-Rad) de 10 a 90 °C em incrementos de 0,5 °C a cada 30 segundos. Simultaneamente, a fluorescência foi monitorada, utilizando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 470 e 569 nm, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. As análises foram realizadas com uma planilha Excel DFS *analysis tool*.

A estabilidade térmica da *SmSEPT10* também foi avaliada por meio da técnica de dicroísmo circular. Amostras dessa proteína em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e 10% de glicerol ou no mesmo, acrescido de dextrose 0,5 M foram inseridas em cubetas de 0,1 cm de caminho ótico. Utilizou-se o espectropolarímetro Jasco J815 acoplado a um módulo Peltier para o controle de temperatura. As medidas foram realizadas no comprimento de onda fixo de 222 nm, enquanto a temperatura foi variada entre 10 e 90 °C, em intervalos de 1°C, a um passo de 1 °C/min. As intensidades, coletadas em elipticidade, foram transformadas para elipticidade molar residual.

3.13 Termoforese em microescala e espectroscopia de fluorescência

A técnica de termoforese em microescala monitora o movimento de moléculas marcadas com um fluoróforo – moléculas alvo - ao longo de um gradiente microscópico de temperatura. Mudanças na camada de hidratação, carga e tamanho das moléculas alvo são causadas pela interação dessas com algum tipo de ligante. Essas alterações são medidas e resultam em parâmetros da ligação (K_d e coeficiente de Hill).⁸⁷

A princípio, os alvos eram a *SmSEPT10* ou o complexo de septinas de *S. mansoni* marcados com um fluoróforo, já os ligantes eram as vesículas. As vesículas utilizadas apresentavam diâmetros de 0,5 ou 1 μ m (LUVs) e eram compostas por 10 mol% POPS e 90 mol% POPC ou 5 mol% PI(4,5)P₂ e 95 mol% POPC.

Foram testadas duas composições do tampão de reação: HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 10% (v/v) de glicerol, β -mercaptoetanol 5 mM e dextrose 0,5 M, e a segunda composição era igual, exceto pela ausência de dextrose.

Além disso, foram produzidas vesículas com um lipídio marcado, em vez de marcar a proteína. Nesse caso, as atribuições de “alvo” e “ligante” foram invertidas. Utilizou-se 1 mol% de NBD-DPPE nas vesículas, porque, dentre os lipídios marcados disponíveis no laboratório, esse era o único cujo os comprimentos de onda de excitação e emissão eram compatíveis com o equipamento de MST.

Para ambos os casos, amostras do alvo com e sem o ligante em solução foram inseridas em capilares do tipo *standard* MO-K002 (NanoTemper Technologies) e medidas pelo equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) logo após a mistura e com 1 hora da incubação. A potência do LED e do laser infravermelho (IR) variaram entre os experimentos. Os tempos de laser “ligado” e “desligado” foram de 20 e 5 segundos, respectivamente.

Como será mostrado na seção de resultados, a intensidade de fluorescência das vesículas marcadas com NBD decaía com a adição de *SmSEPT10*.

O NBD é um fluoróforo solvatocrômico, o que significa que as características fotofísicas desse fluoróforo (tempo de vida e rendimento quântico) variam de acordo com mudanças no ambiente ao seu redor, como na polaridade e viscosidade do meio.⁸⁸

Valendo-se dessa característica, experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados para verificar se esse decaimento da fluorescência seria um indicativo da ligação entre septinas e vesículas.

Nesses experimentos, utilizaram-se as LUVs (1µm de diâmetro) compostas por 10 mol% de POPS, 89 mol% de POPC e 1 mol% de NBD-DPPE. Incubaram-se, por 1 hora, misturas dessas vesículas a 1 µM de concentração com *SmSEPT10* ou *SmSEPT10G*, ambas a 1 µM. O tampão de reação foi HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 10% (v/v) de glicerol, β-mercaptoetanol 5 mM e dextrose 0,5 M.

A fluorescência das amostras com e sem as proteínas foi medida no equipamento SpectraMax i3 (*Molecular Devices*), com excitação em 460 nm e emissão entre 500 e 560 nm. Os brancos referentes a cada medida foram subtraídos. O experimento foi realizado em triplicata e o erro corresponde ao desvio padrão.

3.14 Ressonância Paramagnética Eletrônica

A marcação de spin sítio-dirigida (SDSL, do inglês *site-directed spin labeling*) é um método muito utilizado na espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do

inglês *electron paramagnetic resonance*) para a caracterização topológica e, principalmente, para a investigação de mudanças conformacionais e dinâmicas de proteínas.⁸⁹⁻⁹² No método tradicional de SDSL, uma mutação de um único resíduo para cisteína e sua subsequente marcação com um reagente nitróxido sulfidril-específico, gera uma cadeia lateral paramagnética.

As amostras analisadas foram os mutantes marcados e misturas desses com as vesículas. Os experimentos foram realizados em duas condições diferentes: na presença e na ausência de dextrose 0,5 M.

Na condição sem o açúcar, o tampão de reação era composto por HEPES 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 10% (v/v) de glicerol. As proteínas foram incubadas com LUVs (vesículas com 1µm de diâmetro), compostas por 5 mol% PI(4,5)P₂ e 95 mol% POPC, na proporção 1:50 (proteína:lipídio), por 1 hora à temperatura ambiente. Com a dextrose acrescida ao tampão anterior, incubaram-se os mutantes com as LUVs, compostas por 5 mol% PI(4,5)P₂ e 95 mol% POPC ou 10 mol% POPS e 90 mol% POPC, nas mesmas condições descritas acima. Todas as amostras foram colocadas em capilares hematócitos.

Os espectros de EPR foram adquiridos em espectrômetro Varian E109 (Varian, Inc., EUA) à 20°C. Foi empregada frequência de microondas da ordem de 9,4 GHz. A varredura de campo foi de 160 G, a amplitude de modulação de 1,0 G, constante de tempo de 0,064 s, modulação do campo magnético de 100 kHz e potência de 40 mW. Foi efetuado o número de varreduras necessário para se obter espectros com relação sinal/ruído suficientemente alta para uma análise adequada. Os espectros finais foram normalizados pela área. A concentração de proteína utilizada nos experimentos de EPR foi em torno de 20-30 µM. Os experimentos de EPR e as análises dos espectros foram realizados com a supervisão da pós-doutoranda Dr. Patricia Suemy Kumagai.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das septinas

As análises eletroforéticas e cromatográficas mostraram que a *SmSEPT10* e o complexo de septinas de *S. mansoni* foram obtidos com alto grau de pureza e massas moleculares compatíveis com o esperado (Figura 9Figura 10). Foram observados picos distintos de dímeros e monômeros da *SmSEPT10* (Figura 9A), sendo que, nos experimentos realizados com essa proteína, utilizou-se a amostra dimérica. No caso do heterocomplexo (Figura 10), observou-se a presença das três septinas envolvidas.^{47, 72}

Figura 9 - Purificação da *SmSEPT10*. A) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Os picos correspondentes às frações monoméricas e diméricas estão assinalados. B) Análise da eluição em SDS-PAGE 12% mostrando: 1) padrão de massa molecular; 2) fração correspondente ao volume 12 mL da cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - Purificação do heterocomplexo de septinas de *S. mansoni*. A) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex 200. B) Análise das frações do complexo eluídas, analisadas em SDS-PAGE 12%: 1) padrão de massa molecular; 2-3) frações correspondentes aos volumes 10 e 11 mL da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. As três bandas correspondem à septina 7.2 (59,3 kDa), septina 5 (51,3 kDa) e septina 10 (48,1 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

A *SmSEPT10G* foi obtida pura e monomérica, como era o esperado.⁷³ Os resultados referentes à purificação de *SmSEPT10G* não são mostrados, visto que essa construção foi usada somente como um controle negativo para os experimentos.

Assim como as outras construções individuais, a *SmSEPT10C* foi obtida pura e apresentou alto rendimento (Figura 11A). Por meio da técnica de SEC-MALS, observou-se que o estado oligomérico da *SmSEPT10C* é compatível com um dímero (Figura 10B), sendo que a massa molecular obtida foi de $21,4 \pm 0,1$ kDa, o que corresponde a um erro de 30% em relação à massa molecular teórica para o dímero (30,6 kDa). Como essa construção proteica é relativamente pequena, altas concentrações são necessárias para obter intensidades satisfatórias de espalhamento. Apesar da *SmSEPT10C* ter sido concentrada ao máximo possível, o erro ainda foi alto. Mesmo assim, a predição do estado dimérico é significativa, já que o erro em relação ao que se esperaria considerando a massa do monômero seria de 39,9%.

Quanto aos mutantes da *SmSEPT10C*, esses apresentavam baixa afinidade pela resina de níquel, o que impossibilitou a continuidade da purificação. Optou-se, portanto, pela purificação sob condições desnaturantes, pois com a completa exposição da cauda de histidinas, a ligação à resina foi eficiente. Como essas construções mostravam-se instáveis e suscetíveis à agregação, não foi possível realizar uma segunda etapa de purificação. Assim, as amostras expostas na Figura 11A foram utilizadas nos experimentos. Observa-se a presença de

uma banda menos intensa de aproximadamente 30 kDa nas amostras das construções mutantes, porém de natureza desconhecida.

Figura 11 - Purificação das construções *SmSEPT10C* e dos mutantes. A) SDS-PAGE 12%: 1) padrão de massa molecular; 2) amostra da *SmSEPT10C* após a segunda etapa cromatográfica de purificação (SEC); 3-7) amostras dos mutantes S8C, A49C, A65C, A83C e G98C, respectivamente, após a cromatografia de afinidade. B) Cálculo da massa molecular da *SmSEPT10C* por SEC-MALS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os *softwares* Jpred e PSIPRED foram utilizados para realizar previsões para todos os mutantes, os quais mostraram a formação de uma α -hélice entre os resíduos 9 e 97 do C-terminal da *SmSEPT10* e, assim como o *software* COILS, partes dessas hélices são previstas de formar *coiled-coil*. Entretanto, não há um consenso entre as previsões sobre a extensão e o estado oligomérico do *coiled coil*.

Como as proteínas mutantes foram desnaturadas durante a etapa de purificação, medidas de CD foram realizadas para avaliar a estrutura secundária dessas proteínas após o reenovelamento. Os espectros de CD obtidos sugerem que todos os mutantes se apresentam estruturados, possuindo elementos do tipo α -hélices devido aos picos negativos característicos em 208 e 222 nm (Figura 12). O pico positivo em 190 nm não foi observado devido ao ruído elevado. Assim, os resultados de CD permitiram a detecção da estrutura secundária esperada para os mutantes e, assim, a continuidade dos experimentos subsequentes.

Figura 12 - Espectros de CD convencional na região do UV distante dos mutantes da *SmSEPT10C* a 20°C.
Fonte: Elaborada pela autora.

A medida da concentração das construções mutantes foi realizada por método indireto (Bradford). Como os espectros foram normalizados pela concentração das construções, observa-se uma variação na intensidade do sinal, provavelmente como reflexo das pequenas flutuações na determinação das concentrações proteicas.

Experimentos de SEC-MALS foram realizados com os mutantes marcados, mas devido às baixas concentrações obtidas para essas proteínas, os resultados não foram conclusivos, impedindo assim a determinação do seu estado oligomérico.

Para o mutante *SmSEPT10* S8C, entretanto, através dos espectros de CD foi possível inferir indiretamente a formação de um dímero, a partir da formação do *coiled-coil*, evidenciada pela razão dos mínimos 222/208 igual a $1,01 \pm 0,04$. Lembrando que os mínimos em 222 nm e 208 nm são indicativos da estrutura helicoidal, assim, a razão 222/208 expressa a existência de um *coiled-coil* dimérico, se o valor for maior do que 1, ou a presença de uma hélice isolada, se a razão for menor ou igual a 0,9.⁹³⁻⁹⁴ No caso dos outros mutantes, porém, o erro elevado impossibilitou essa determinação (Tabela 4).

Tabela 4 - Razão entre os mínimos em 222 nm e 208 nm

Construção	Razão $[\theta]_{222/208}$
<i>Sm</i> SEPT10 S8C	$1,01 \pm 0,04$
<i>Sm</i> SEPT10 A49C	$1,0 \pm 0,1$
<i>Sm</i> SEPT10 A65C	$1,0 \pm 0,1$
<i>Sm</i> SEPT10 A83C	$0,97 \pm 0,09$
<i>Sm</i> SEPT10 G98C	$0,95 \pm 0,07$

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Interação entre septinas e miméticos de membrana

A ligação do complexo de septinas de *S. mansoni* e da *Sm*SEPT10 às GUVs já havia sido reportada,⁴⁷ mas tentativas iniciais de detectar a ligação entre septinas e bicamadas lipídicas não foram bem-sucedidas. Assim, para tentar solucionar esse problema, foram testadas alterações das condições experimentais, incluindo mudanças na composição do tampão, na temperatura e no tempo de incubação, bem como o protocolo de marcação da proteína, entre outros. No protocolo padrão desenvolvido pelo grupo da Dra. Gladfelter, usava-se 0,1% de metilcelulose como um *crowding agent*, mas para as septinas usadas nesse trabalho, isto não foi eficiente para proporcionar que a ligação fosse observada. Nessas condições experimentais, observava-se que as septinas marcadas estavam em solução, mas não aderiam à membrana. Em alguns casos, muitos agregados proteicos apareciam em solução.

Finalmente, a condição adequada para observar a interação foi obtida pela adição de 0,5 M de dextrose no tampão final de reação. Essa condição foi testada porque, durante os experimentos com as septinas de *S. mansoni* interagindo com GUVs,⁴⁷ essa concentração de dextrose era adicionada para manter o equilíbrio osmótico entre a solução dentro da vesícula e o tampão exterior. Nos novos experimentos realizados não haveria necessidade de manter o equilíbrio osmótico, visto que as bicamadas lipídicas estavam adsorvidas às esferas maciças. Todavia, a adição de dextrose no tampão atuou positivamente na interação entre septinas e lipídios, talvez pela alta viscosidade gerada.

Uma vez que esse problema foi solucionado, o passo seguinte foi investigar a especificidade de ligação das septinas aos diferentes fosfolipídios e curvaturas de membrana. Três composições lipídicas e quatro tamanhos de esferas foram utilizados.

Observou-se que os heterocomplexos de septinas de *S. mansoni* e de *C. intestinalis* e a septina individual *SmSEPT10* se ligaram às membranas compostas por 5 mol% PI(4,5)P₂ ou 10 mol% POPS, além de apresentarem uma preferência por curvaturas maiores, ou seja, diâmetros menores (Figura 13).

Figura 13 - Heterocomplexos (verde) de *C. intestinalis* (A) e de *S. mansoni* (B) ligam, preferivelmente, às membranas (vermelho) com diâmetros menores. Os diâmetros das esferas estão descritos no topo e, à esquerda, estão as componentes das imagens referentes aos lipídios e às septinas. A composição lipídica da membrana usada foi de: 5 mol% PI(4,5)P₂, 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE. A concentração dos heterocomplexos foi de 83 nM e 250 nM para *C. intestinalis* e *S. mansoni*, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o processamento das imagens, analisou-se, quantitativamente, a adsorção das septinas em relação ao diâmetro ou à composição lipídica da membrana. Deve ser enfatizado que as diferentes concentrações utilizadas dos complexos e da *SmSEPT10* influenciam nas intensidades de adsorção. Portanto, esse parâmetro deve ser considerado ao comparar os resultados das diferentes septinas.

Com respeito à adsorção das septinas dependente dos diâmetros das membranas, notou-se que houve maior ligação de *SmSEPT10* e dos heterocomplexos de *S. mansoni* e de *C. intestinalis* às esferas menores, na maioria dos casos às membranas com 0,96 μm de diâmetro (Figura 14, Figura 15 e Figura 16).

Figura 14 - Adsorção de *SmSEPT10* às membranas. *Boxplots* da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. Composição lipídica: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P₂, 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-DE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; *, p-valor < 0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Interação do heterocomplexo de septinas de *S. mansoni* com membranas. *Boxplots* da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. A composição lipídica utilizada foi: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P₂, 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; *, p-valor < 0,05; n.s., não-significativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - O heterocomplexo de *C. intestinalis* liga às membranas com diâmetros menores, preferivelmente. *Boxplots* da adsorção das septinas por diâmetro da membrana. Composição lipídica: A) 10 mol% POPS, 89,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; B) 5 mol% PI(4,5)P₂, 94,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE; e C) 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-DE. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005; **, p-valor < 0,01; n.s., não-significativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

É interessante notar que esse mesmo padrão de ligação já foi observado com complexos de septinas de outros organismos.⁸⁰ Tanto o complexo de septinas humanas (SEPT2, SEPT6 e SEPT7), quanto o de septinas de *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc10, Cdc3, Cdc12 e Cdc11) apresentaram maior adsorção às membranas com diâmetros de 0,96 e 3,17 μm.⁸⁰ Já nas membranas com diâmetros maiores (5,06 e 6,46 μm) ou menores (0,3 μm), a ligação era pequena ou nula.

Ao analisar a adsorção das septinas em membranas de mesmo diâmetro de diferentes composições lipídicas, outro padrão recorrente foi verificado. Como esperado, a ligação das proteínas ocorreu somente em membranas que continham POPS ou PI(4,5)P₂, lipídios negativamente carregados (Figura 17 Figura 18). A ligação às membranas compostas por 99,9 mol% POPC e 0,1 mol% Rh-PE não foi comparativamente significativa.

Esses resultados reiteram a hipótese de que a ligação entre septinas e fosfolipídios

apresenta um caráter eletrostático, o que torna a presença de cargas disponíveis na membrana um aspecto essencial para a interação. Além disso, nota-se que, para todas as proteínas, há uma diferença de afinidade por POPS ou por PI(4,5)P₂, podendo ser que isso ocorra por diferenças nas cargas locais, nas estruturas moleculares ou nos ambientes das cadeias acil desses fosfolipídios.

Em contrapartida aos padrões observados, as septinas de *S. mansoni* e de *C. intestinalis* não apresentaram a mesma especificidade de ligação a diferentes fosfolipídios. O heterocomplexo e a septina individual de *S. mansoni* interagiram mais com membranas compostas por 5 mol% PI(4,5)P₂ (Figura 17). Esse resultado era esperado, visto que a preferência de septinas de outros organismos por PI(4,5)P₂ já foi amplamente descrita na literatura.^{43, 65}

Figura 17 - O heterocomplexo de septinas de *S. mansoni* e a *SmSEPT10* ligam predominantemente à membranas com PI(4,5)P₂. *Boxplots* da adsorção de: A) heterocomplexo/ B) *SmSEPT10* para cada composição lipídica. Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005.

Fonte: Elaborada pela autora.

Porém, para o heterocomplexo de septinas de *C. intestinalis*, é interessante notar que houve maior adsorção às membranas com POPS (Figura 18).

Figura 18 - O heterocomplexo de septinas de *C. intestinalis* liga, preferivelmente, a membranas com POPS. *Boxplot* da adsorção da septina para cada composição lipídica. O diâmetro da membrana era de 0,96 μm . Resultados do Teste de Wilcoxon: ***, p-valor < 0,005.

Fonte: Elaborada pela autora.

Particularidades estruturais das septinas de diferentes organismos e a variação na formação do heterocomplexo – número e ordem das proteínas – são fatores que podem explicar essa diferença de afinidade. Também deve ser levado em consideração que os organismos estudados são filogeneticamente distantes e, portanto, podem apresentar componentes e proporções lipídicas particulares em suas membranas.

Por fim, um resultado inédito foi a verificação de que a *SmSEPT10* individualmente, ou seja, fora da estrutura do heterocomplexo, liga-se à membrana e, além disso, tem a capacidade de reconhecer diferentes curvaturas e composições lipídicas.

Até o momento, a mínima conformação de septinas biologicamente relevante capaz de detectar diferentes curvaturas era o heterocomplexo de septinas de levedura no qual a Cdc 11 apresentava uma mutação na hélice $\alpha 6$ que impossibilitava a polimerização desse complexo.⁸⁰ Assim como nos outros casos estudados, o padrão de afinidade de ligação desse heterocomplexo às diferentes curvaturas foi o mesmo. Entretanto, a intensidade de adsorção foi drasticamente reduzida quando comparada com a do heterocomplexo *wild type*. Desse modo, sugeriu-se que um heterocomplexo único apresenta uma preferência intrínseca por curvaturas, contudo, a polimerização mostrou-se essencial para a estabilização da ligação.

Os resultados observados com a *SmSEPT10* aprofundam essa hipótese, porque, apesar de ter sido a amostra mais concentrada, as intensidades de adsorção foram menores do que as do complexo. Isso indica que a organização das septinas em heterocomplexos, assim como a polimerização destes em filamentos, favorece a ligação estável com membranas.

4.3 Avaliação da especificidade de ligação

Ensaaios com as *PIP Strips* realizados com a *SmSEPT10*, *SmSEPT10G* e o heterocomplexo de *C. intestinalis* foram feitos antes dos experimentos de microscopia, logo, sem a adição da dextrose no tampão de incubação. Contudo, após notarmos a importância desse açúcar para a interação das septinas com os lipídios, experimentos com todas as proteínas em tampão com dextrose também foram feitos, os quais possibilitaram as comparações desses resultados.

Analisando os resultados obtidos com a *SmSEPT10*, observou-se ligação a lipídios negativamente carregados tanto na presença quanto ausência de dextrose (Figura 19).

Na condição experimental sem esse açúcar, houve interação com PS, PA e cinco lipídios da família dos fosfoinositóis – PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,5)P₂ e PI(4,5)P₂ (Figura 19 A e B), entretanto a marcação não foi homogênea, nem específica, visto que o *background* apresentou alta intensidade e houve marcação no *spot* em branco (Figura 19 A e B). Já com o açúcar no tampão de incubação, a proteína ligou-se novamente ao PS e a quatro dos mesmos fosfoinositóis anteriores - PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,5)P₂ (Figura 19 C e D).

A) *Sm*SEPT10 B) *Sm*SEPT10 C) *Sm*SEPT10 com dextrose D) *Sm*SEPT10 com dextrose

Figura 19 - Especificidade de ligação da *Sm*SEPT10 a diferentes fosfolipídios nas condições (A e B) sem dextrose e (C e D) com dextrose. A e C) Imagens da revelação do *PIP Strip* após incubação com a *Sm*SEPT10. B e D) Análise quantitativa da ligação aos lipídios em relação à marcação do *spot* em branco.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de a *Sm*SEPT10 ter se ligado a uma maior variedade de lipídios na condição sem a dextrose, as intensidades relativas foram baixas quando comparadas com os valores na presença desse aditivo. Em ambos os casos, houve maior interação com o PI(5)P, porém a intensidade relativa sem dextrose foi de apenas $2,3 \pm 0,6$, enquanto que com o açúcar, o valor passou para 6 ± 1 .

Como era esperado, a *Sm*SEPT10G não apresentou ligação significativa em ambas as

condições experimentais, visto que essa construção funciona como controle negativo para o experimento (Figura 20).

Figura 20 - Não houve ligação significativa da *SmSEPT10G* (controle negativo). Intensidade média relativa de ligação da *SmSEPT10G* aos lipídios nas condições (A) sem dextrose e (B) com dextrose.

Fonte: Elaborada pela autora.

No caso do complexo de septinas de *Ciona intestinalis*, não houve ligação significativa sem a dextrose (Figura 21). Já na presença do açúcar, a única interação significativa foi com o PS. A preferência por esse lipídio é interessante, porque corrobora com o resultado obtido nos experimentos de microscopia.

Figura 21 - Interação do heterocomplexo de septinas de *C. intestinalis* a diferentes fosfolipídios. A) Na condição experimental sem dextrose, não houve ligação significativa. B) Com dextrose, o heterocomplexo interagiu com PS.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante ressaltar que os padrões de ligação não foram alterados com a adição da

dextrose, sendo mais evidente no caso da *SmSEPT10* (Figura 19 B e D). Isso significa que esse aditivo provavelmente apenas proporciona ligações mais estáveis, sem alterar a especificidade das septinas pelos diferentes lipídios. Para o complexo de septinas de *C. intestinalis*, o experimento sem adição de dextrose mostrou um erro muito elevado, não permitindo uma conclusão sobre um padrão de interação.

Com o complexo de septinas de *S. mansoni*, optou-se por realizar o experimento somente na presença do açúcar, uma vez que, nesse caso, já haviam sido realizados os experimentos de microscopia com as esferas recobertas de lipídios na presença de dextrose. Nesse caso, verificou-se ligação significativa ao PS, PI(5)P e PI(3,5)P₂ (Figura 22). Ainda assim, o fato mais relevante é a grande similaridade entre os padrões de ligação desse complexo e da *SmSEPT10*.

Figura 22 - Gráfico da análise quantitativa da ligação do heterocomplexo de septinas de *S. mansoni* aos lipídios presentes na *PIP Strip*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esse resultado sugere que a septina 10 pode ser a proteína responsável pela especificidade de ligação aos lipídios ou, alternativamente, que esse padrão de ligação é uma característica comum às septinas de *S. mansoni* que formam esse heterocomplexo. Entretanto, é necessária a realização de outros experimentos para elucidar essa questão. Curiosamente, um trabalho recente do grupo da Dra. Gladfelter mostrou que uma hélice conservada no C-terminal da Cdc12 é necessária e suficiente para que o complexo de septinas de levedura distinga diferentes curvaturas e composições lipídicas. Assim, esse resultado mostra que uma única septina pode influenciar a afinidade de ligação do complexo inteiro.⁷⁵

4.4 Estabilidade térmica da *SmSEPT10* na presença de glicose

Na tentativa de explicar a razão pela qual a ligação entre septinas e miméticos de membranas só foi detectada na presença de uma alta concentração de dextrose, experimentos que avaliaram a estabilidade térmica da *SmSEPT10* na presença açúcares e polióis foram realizados.

Isso porque, em diversos organismos, a estabilidade das macromoléculas é protegida de condições de estresse pelo acúmulo de altas concentrações de pequenas moléculas orgânicas, denominadas de osmólitos.^{95, 96} Essas moléculas estabilizadoras são quimicamente diversas e incluem polióis (glicerol, sorbitol), açúcares (dextrose, sacarose), alguns aminoácidos, entre outros. O aumento da estabilidade termodinâmica não ocorre por ligações desses osmólitos às macro-moléculas, mas pela alteração das propriedades de solvente da água circundante.⁹⁷ Assim, as atividades funcionais dessas macromoléculas não são comprometidas.

A primeira abordagem foi avaliar a estabilidade térmica da *SmSEPT10* por meio da técnica de DSF. Uma curva padrão do experimento de DSF inicia-se com a fluorescência baixa ou nula, visto que o fluoróforo apresenta baixa afinidade pela proteína. Com o aumento da temperatura, porções hidrofóbicas da proteína são expostas, permitindo a ligação ao fluoróforo. Após atingir um valor máximo, a fluorescência decai conforme a proteína desnovelada começa a agregar, como exemplificado na Figura 23.

Figura 23 - Curva padrão da análise da desnaturação térmica por DSF.

Fonte: NIESEN⁸⁵

A Figura 24 mostra as curvas de desnaturação da *SmSEPT10* nas quatro situações estudadas. Nota-se que, em todos os casos, a fluorescência inicial é alta, portanto, não é possível observar a transição de desnaturação da proteína. Assim, esses resultados foram inconclusivos sobre a possibilidade de estabilização da proteína pela dextrose.

Figura 24 - Gráficos de intensidade de fluorescência por temperatura. Curvas correspondem à desnaturação térmica da *SmSEPT10* (em triplicata) nas seguintes condições: A) Tampão A; B) Tampão A com 0,5 M de dextrose; C) Tampão A com 0,5 M de sacarose; D) Tampão A com 0,5 M de sorbitol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma explicação para a intensidade alta de fluorescência a baixas temperaturas é a exposição de regiões hidrofóbicas que estariam nas interfaces de ligação dessa septina à sua parceira (*SmSEPT5* ou à *SmSEPT7.2*). Experimentos realizados por outro aluno do nosso grupo de pesquisa mostraram curvas semelhantes com a septina 8 humana.⁹⁸ Já com o dímero formado pelas septinas 8 e 5 humanas, observou-se uma melhora no perfil da curva e, consequentemente, a estabilização dessas proteínas.⁹⁸

Uma segunda avaliação da estabilidade térmica foi realizada usando dicroísmo circular. A Figura 25 mostra as curvas de desnaturação da *SmSEPT10* obtidas por essa técnica.

Figura 25 - Curvas de desnaturação térmica da *SmSEPT10* por CD. Os experimentos foram realizados na presença (azul) e na ausência (preto) de dextrose.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em ambas as condições experimentais testadas (com e sem dextrose), as curvas não mostraram transições de desnaturação da proteína. A única transição detectada ocorreu por volta de 60 °C.

Sabe-se que a *SmSEPT10* é estável até 37 °C e que a partir dessa temperatura, essa proteína forma filamentos β-amilóides, os quais agregam-se e, possivelmente, precipitam.⁴⁷ Assim, essa transição tardia observada não deve indicar a desnaturação da proteína. Comparando as duas curvas, nota-se uma pequena diferença entre as temperaturas dessa transição, o que poderia indicar uma estabilização desses filamentos. Entretanto, outros experimentos são necessários para esclarecer essa alteração.

Outra diferença observada entre as duas condições foi a ausência de precipitados proteicos visíveis após aquecimento na presença de dextrose (Figura 26B). Novamente, isso não confirma a estabilização da proteína em sua conformação nativa, mas indica que a presença desse açúcar no tampão retarda a precipitação dessas moléculas.

A) Tampão sem dextrose

B) Tampão com dextrose

Figura 26 - Fotos das cubetas após a desnaturação térmica da *SmSEPT10*. A) Sem a adição da dextrose, nota-se a presença de precipitados proteicos (partículas brancas). B) Já no tampão com o açúcar, essas partículas não são observadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Experimentos de estabilidade térmica da *SmSEPT10* também foram medidos por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) (resultados não mostrados). Nesse caso, não foram observadas diferenças na estabilidade dessa septina com e sem a dextrose. Entretanto, o controle de temperatura do equipamento era realizado por um banho de água, o qual não permite a regulação precisa da temperatura, impossibilitando a verificação de pequenas mudanças na estabilidade.

4.5 Parâmetros de interação

A fim de determinar os parâmetros de interação (K_d e coeficiente de Hill) para as ligações observadas nos experimentos de microscopia, utilizou-se a técnica de MST.

A Figura 27 mostra as curvas derivadas de um experimento padrão de MST.⁹⁹ Inicialmente, as moléculas estão distribuídas homogeneamente dentro do capilar e a fluorescência inicial detectada é constante. Com a ativação do laser infravermelho (IR, do inglês, *infrared*), a temperatura dentro de uma região pontual do capilar aumenta. Assim, as moléculas em solução movimentam-se para fora dessa região aquecida. Esse movimento

termoforético é representado na Figura 27A entre 0 e 20 segundos. Quando o laser é desligado, as moléculas tendem a retornar à situação inicial por difusão, o que caracteriza a curva após os 20 segundos.⁸⁷

O movimento termoforético das moléculas fluorescentes muda conforme ocorre a interação com ligantes. Assim, uma titulação do ligante resulta em uma mudança gradual na termoforese (Figura 27A), a qual é representada como uma curva da fluorescência normalizada (F_{norm}) pela concentração de ligante em um tempo específico (Figura 27B).

Figura 27 - Experimento padrão de MST. A) Curvas do movimento termoforético de uma molécula fluorescente após ligação a diferentes concentrações de um ligante. B) Gráfico da fluorescência normalizada pela concentração do ligante em um tempo específico. As diferentes concentrações do ligante são indicadas pelo gradiente de cores à direita.

Fonte: Adaptada de NANOTEMPER.⁹⁹

Nesse trabalho, primeiramente, as proteínas marcadas foram tratadas como “os alvos” e vesículas eram “os ligantes”. Apesar de múltiplas tentativas em diversas condições experimentais, não se observou ligação. Variaram-se o diâmetro das LUVs (de 0,5 a 1 μm), a composição lipídica (com 5 mol% de PI(4,5) P_2 ou 10 mol% de POPS), o tampão de reação (com e sem dextrose), a proporção proteína: lipídio e o fluoróforo (ligado à cauda de histidina ou às aminas primárias da septina).

A Figura 28 ilustra um dos experimentos no qual se incubou a *SmSEPT10*, marcada com o Alexa Fluor 488, com vesículas compostas por 10 mol% de POPS e 90 mol% de POPC de diâmetro de 0,5 μm , incubadas por 1 hora. Nesse caso, o tampão de reação continha 0,5 M de dextrose em sua composição.

Mesmo com uma alta proporção de lipídios (2,4 mM) em relação à concentração de septinas (60 nM), não foi observada ligação.

Figura 28 - As curvas de MST da septina 10 (60 nM) não apresentaram alterações na presença de vesículas. A) Gráfico da fluorescência normalizada da *SmSEPT10* marcada *versus* a concentração de lipídios. B) Fluorescência inicial da septina 10 marcada sem e com as vesículas. Utilizou-se 20% de potência do LED e potência alta do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.

Fonte: Elaborada pela autora.

A hipótese levantada sobre a razão pela qual a ligação não foi observada baseia-se nas imagens de microscopia confocal. Nesses experimentos, mesmo nos casos em que a ligação era detectada, via-se que muitas proteínas ainda estavam em solução, as quais geravam um *background* intenso. Assim, a afinidade de ligação pode ser baixa demais para a detecção experimental por MST.

Em outra tentativa de investigar a ligação, vesículas compostas por um 1 mol% de NBD-DPPE, 10 mol% de POPS e 89 mol% de POPC foram produzidas. Essas vesículas marcadas seriam os “alvos” e as proteínas, os “ligantes”.

Nesses experimentos, a ligação foi observada, entretanto a fluorescência decaía conforme a interação entre septinas e vesículas aumentava. Para a técnica de MST, a fluorescência inicial deve manter-se constante entre as amostras sem e com ligantes, logo, esse decaimento impossibilitou que conclusões sobre a ligação fossem inferidas.

As Figuras 29 e 30 correspondem a um dos experimentos em que essa queda é observada. Nesse caso, as vesículas, de composição lipídica mencionada acima, apresentavam 1 μ m de diâmetro. Também havia 0,5 M de dextrose nesse tampão de reação. Mesmo sem um período de incubação, foi possível observar uma diferença significativa – amplitude de resposta de 5,4 - entre a vesícula com e sem a *SmSEPT10* (Figura 29A), o que é um indicativo de ligação. Nota-se que, nessa situação, as intensidades de fluorescência das vesículas com e sem a proteína ainda são semelhantes (Figura 29B).

Figura 29 - Curva de MST mostrando indícios da ligação de 10 μM de lipídios (vesículas) à *SmSEPT10* (20 μM) sem incubação. A) Gráfico da fluorescência normalizada por concentração da *SmSEPT10*. A amplitude de resposta obtida foi de 5,4, com razão sinal/ruído equivalente a 6,0. B) Fluorescência das vesículas com e sem *SmSEPT10*. Utilizou-se 40% de potência do LED e potência média do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entretanto, após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, observou-se a queda expressiva da intensidade de fluorescência das vesículas na presença da proteína (Figura 30B). Por essa razão, os resultados mostrados nas Figuras 29A e 30A não são válidos, concluindo-se que a fluorescência do NBD foi afetada pela presença da proteína. Neste contexto, a técnica de MST não pode ser utilizada para avaliar a interação entre as vesículas e as septinas em estudo.

Figura 30 - Curvas de MST após 1h de incubação invalidam as medidas. A) Gráfico da fluorescência normalizada por concentração da *SmSEPT10*. A amplitude de resposta obtida foi de 10,4, com razão sinal/ruído equivalente a 5,7. B) Fluorescência das vesículas com e sem *SmSEPT10*. Utilizou-se 40% de potência do LED e potência média do laser IR. A avaliação da resposta de MST foi observada após 1,5 s de excitação com laser IR.

Fonte: Elaborada pela autora.

Experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados para verificar se esse decaimento da fluorescência poderia ser usado como uma alternativa para mensurar a interação. Entretanto, observou-se que a variação da fluorescência não era causada pela ligação específica das septinas às vesículas, mas sim pela presença de proteínas, pois quando *SmSEPT10G* (controle negativo) foi adicionado, também houve variação da fluorescência (Figura 31B).

Figura 31 - Espectros de fluorescência das vesículas na ausência e presença de proteínas. A) Assim como nos experimentos de MST, observou-se que a fluorescência das vesículas decaiu com a adição de *SmSEPT10*. B) O decaimento também ocorreu com a adição de *SmSEPT10G*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o fluoróforo NBD é sensível às mudanças no ambiente ao seu redor, é possível que o aumento da viscosidade do meio, causado pela adição de proteínas, tenha causado o decaimento da fluorescência.⁸⁸

4.6 Identificação do domínio da *SmSEPT10C* necessário para a ligação com membranas

Como já foi descrito por nosso grupo de pesquisa, o C-terminal da *SmSEPT10* é essencial para interação proteína-membrana.⁴⁷ Com o intuito de mapear a região de interação do *coiled-coil* com membranas, medidas de EPR foram realizadas com os cinco mutantes individualmente marcados. Os resíduos mutados foram escolhidos por flanquear regiões com concentração de resíduos básicos.

Um marcador de spin MTSSL, ligado à cadeia lateral de um resíduo em uma proteína (Figura 32A), exibe um espectro típico de EPR como é mostrado na Figura 32B, no qual três linhas são observadas. Esses espectros foram obtidos em dois ambientes diferentes, em água e

com 85% de glicerol.⁹² A diferença de mobilidade entre eles é facilmente observada, sendo que em água, as três linhas são bem finas e estreitas e a amplitude do sinal, quase a mesma entre elas. Já em glicerol, os movimentos são restringidos pela viscosidade do meio, refletindo no alargamento das linhas e na variação da intensidade entre as três linhas.

A)

B)

Figura 32 - Marcação de spin sítio-dirigida do MTSSL. A) Reação da sonda MTSSL com o grupo -SH de uma proteína produz uma cadeia lateral marcada. B) Espectro de EPR de MTSSL em água e em uma solução de glicerol-água.

Fonte: Adaptada de HUBBELL⁸⁹; TAKÁCS.⁹²

A Figura 33 ilustra a posição relativa da mutação e, consequentemente, do MTSSL nos diferentes mutantes *Sm*SEPT10C produzidos.

Figura 33 - Representação esquemática das construções proteicas mutantes do C-terminal da *SmSEPT10*. As regiões preditas de formação de α -hélices são mostradas em azul, os retângulos em cinza indicam regiões não estruturadas e as marcações em vermelho sinalizam as mutações. A escala (abaixo) mostra a posição dos aminoácidos entre as extremidades N e C terminais das construções.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de EPR coletados para cada um dos mutantes, em tampão com e sem a dextrose, apresentaram as três linhas provenientes do nitróxido (Figura 34A e B). Isso mostra que, em todos os casos, a marcação de cada um deles foi efetiva, no entanto com um rendimento baixo, de cerca de 50-60% da proteína total.

Os espectros de EPR em solução mostram uma resultante de todos os processos que ocorrem naquele momento, no microambiente onde o marcador de spin está inserido. Observou-se que todos os espectros, em ambas as condições experimentais, apresentavam duas populações distintas: uma mais restrita (linhas mais largas) e outra, mais flexível (linhas mais finas). Considerou-se que essas populações se originaram de um equilíbrio entre as possíveis conformações das hélices marcadas. Os mutantes, se estruturados como *coiled-coils*, experimentariam maiores restrições de movimento, o que originaria as linhas mais largas. Por outro lado, hélices isoladas apresentariam maior mobilidade e produziriam linhas finas.

Figura 34 - Espectros de EPR dos cinco mutantes da construção *SmSEPT10C* nas condições (A) sem dextrose e (B) com dextrose. Em todos os casos, as construções com mutações em regiões terminais da α -hélice apresentam espectros com linhas finas, enquanto que as que têm mutações em regiões centrais exibem espectros com linhas largas. Todos os espectros foram coletados a 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, nota-se que os espectros de cada um dos mutantes diferem entre si na largura e amplitude das linhas, refletindo o microambiente que cada radical monitora, ou seja, correspondendo à mobilidade e/ou restrição do movimento da cadeia lateral paramagnética. Dessa forma, as mutações nas extremidades, *SmSEPT10C* S8C e G98C, que flanqueiam a formação da α -hélice, apresentam espectros com linhas mais finas e estreitas, comparado aos

mutantes cujos resíduos alterados são centrais: *SmSEPT10C* A49C e A65C (Figura 34A). Esses, por sua vez, mostram que estão em um ambiente com uma restrição de movimento maior, caracterizado pelas linhas mais largas e o surgimento de ‘ombros’ na região de baixo campo (área destacada em cinza). Em contrapartida, o espectro de EPR do mutante *SmSEPT10C* A83C é semelhante aos espectros de S8C e G98C, o que sugere que esta mutação, por estar próxima ao final da hélice, apresenta uma dinâmica maior do que as outras construções com mutações centrais. Cogitou-se a hipótese de que essa mutação possa ter gerado uma quebra na estrutura da hélice, mas as predições não indicaram mudanças na estrutura secundária.

A adição da dextrose ao tampão de reação causou um grande alargamento em todos os espectros, visto que esse novo tampão apresenta maior viscosidade (10 % de glicerol e 0,5 M de dextrose) e, portanto, reduz a dinâmica de todas as populações em solução (Figura 34B).

Os ensaios dos mutantes na presença de vesículas também foram realizados. Em ambas as condições experimentais (com/sem dextrose), a razão sinal/ruído é pequena, devido à baixa concentração das proteínas. É importante ressaltar que, por causa da baixa precisão desses resultados, as discussões a seguir são de caráter qualitativo e especulativo, sendo que mais experimentos ainda são necessários para conclusões sobre o sistema.

Na condição sem a dextrose, não foi observada alteração nos espectros de todos os cinco mutantes com a adição das vesículas compostas por 5 mol% de PI(4,5)P₂ (Figura 35). A conservação da forma dos espectros pode ter ocorrido pela ausência da interação entre as construções marcadas e as membranas. Esse resultado era o esperado, porque, com base nos outros experimentos já descritos nesse trabalho, a dextrose parece proporcionar uma ligação estável entre as septinas e os fosfolipídios.

Figura 35 - Espectros de EPR dos mutantes marcados na ausência (—) e na presença (—) de vesículas, em tampão sem dextrose. Os espectros correspondem à: A) *SmSEPT10C* S8C; B) *SmSEPT10C* A49C; C) *SmSEPT10C* A65C; D) *SmSEPT10C* A83C; e E) *SmSEPT10C* G98C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Já no ambiente mais viscoso, os espectros de EPR de cada um dos mutantes apresentaram algumas diferenças na presença de vesículas (Figura 36).

Figura 36 - Espectros de EPR dos cinco mutantes de *SmSEPT10C* na ausência (—) e na presença de vesículas compostas por 10 mol% de POPS e 90 mol% de POPC (—) e 5 mol% de PI(4,5)P₂ e 95 mol% de POPC (—). Os espectros são referentes à: A) *SmSEPT10C* S8C; B) *SmSEPT10C* A49C; C) *SmSEPT10C* A65C; D) *SmSEPT10C* A83C; e E) *SmSEPT10C* G98C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se uma diminuição na intensidade do sinal do mutante A65C na presença de vesículas com 5 mol% de PI(4,5)P₂ em sua composição (Figura 36C). Essa queda da intensidade indica uma redução da mobilidade da sonda e, conseqüentemente, da mobilidade dessa região da proteína na presença de vesículas. Portanto, esse resultado sugere a ligação da

construção mutante com as vesículas, limitando a dinâmica da sonda.

Já os espectros dos outros mutantes revelaram acréscimos da intensidade na presença de vesículas em relação à condição ausente de vesículas. Sugere-se que esse aumento do sinal, ou seja, da dinâmica da sonda pode ser causado por mudanças conformacionais na hélice ou pela desestruturação do *coiled-coil* quando as construções marcadas interagiram com as vesículas.

Apenas mudanças sutis foram detectadas nos espectros dos mutantes S8C e A83C, as quais devem ser atribuídas ao alto ruído das medidas (Figura 36A e D).

No caso do A49C, o aumento da intensidade só ocorreu quando essa construção marcada foi incubada com vesículas compostas por 10 mol% de POPS. Curiosamente, as alterações identificadas nos espectros das construções com mutações centrais - A49C e A65C – foram dependentes da composição lipídica da membrana (Figura 36B e C). Isso é um indicativo de que essa região da hélice poderia atuar na especificidade de ligação aos diferentes fosfolipídios.

A fim de compreender essas alterações nos espectros, análises de bioinformática em conjunto com buscas na literatura foram feitas.

Na maior parte das septinas investigadas, a região polibásica no domínio N-terminal é a responsável pela interação dessas proteínas com membranas, especificamente com membranas que apresentam PI(4,5)P₂ em sua composição. De maneira semelhante, o C-terminal em *SmSEPT10* também apresenta repetições de aminoácidos básicos em diferentes regiões da estrutura primária, os quais poderiam proporcionar a ligação eletrostática aos fosfolipídios negativamente carregados.

Além disso, resultados recentes de diferentes grupos de pesquisa identificaram hélices anfipáticas em septinas que também colaboram para a interação com membranas.^{75, 76} Hélices anfipáticas que ligam a membranas são motivos proteicos comuns e presentes em várias proteínas.¹⁰⁰ De modo geral, essas hélices apresentam interfaces hidrofóbicas e hidrofílicas, as quais interagem com as cadeias acil e com a cabeça polar dos fosfolipídios, respectivamente, quando a hélice posiciona-se paralela à superfície da membrana.

Como já foi mencionado anteriormente, Cannon et al.⁷⁵ descreveram uma hélice anfipática presente no C-terminal da Cdc12 de levedura, que é conservada em septinas. Essa estrutura mostrou-se necessária e suficiente para distinguir diferentes composições lipídicas e curvaturas. Entretanto, é interessante notar que essa septina ainda apresentou a capacidade de ligação às membranas mesmo na ausência dessa hélice.

importante talvez seja a identificação de domínios polibásicos que pertencem ou flanqueiam essa região (Figura 37B). Portanto, essa poderia ser uma segunda região da hélice responsável pela interação com a membrana.

5 CONCLUSÕES

Como foi proposto nesse trabalho, certos aspectos do mecanismo de ligação das septinas às membranas foram estudados. Em especial, verificou-se que a curvatura das membranas é um fator importante para a interação. Septinas de diferentes organismos (*S. mansoni* e *C. intestinalis*) apresentaram preferência por membranas com diâmetro de 0,96 μm . Esse padrão de ligação parece ser uma característica intrínseca dessas proteínas, visto que essa mesma preferência já foi reportada para complexos de septinas de humano e de fungos.⁸⁰ Assim, embora a influência da curvatura na interação com membranas ainda não esteja completamente compreendida, os resultados desse trabalho permitem uma generalização da preferência de septinas por essa curvatura ($2 \mu\text{m}^{-1}$).

Além disso, observou-se que a septina individual de *S. mansoni* SmSEPT10 também seguiu esse padrão, o que sugere que a formação de hetero-oligômeros de septinas não é essencial para a distinção de curvaturas.

Por meio dos experimentos de microscopia e dos ensaios com os *PIP Strips*, analisou-se a especificidade de ligação de septinas a diferentes fosfolipídios. Como era esperado, a interação mostrou-se dependente da presença de lipídios negativamente carregados, ressaltando a importância do caráter eletrostático da ligação. Contudo, enquanto o complexo de septinas de *C. intestinalis* ligou-se preferivelmente ao fosfolipídio PS, septinas de *S. mansoni* apresentaram preferência por fosfoinositóis. Esse resultado sugere que septinas de diferentes organismos possuam preferências distintas quanto à composição lipídica das membranas.

Um resultado inesperado desse trabalho foi a observação da importância da dextrose para a ligação entre modelos de membrana e as septinas estudadas nesse projeto. Acredita-se que esse monossacarídeo atue na estabilização das proteínas. Embora esse não tenha sido o foco inicial desse trabalho, o papel desse aditivo foi considerado de extrema relevância para este estudo e das septinas em geral.

Por fim, ensaios preliminares de EPR com construções mutantes da SmSEPT10C apresentaram indícios da ligação da porção C-terminal da septina 10 à membranas. Sugere-se que a especificidade de ligação ocorra pela interação eletrostática entre resíduos básicos desse domínio com fosfolipídios negativamente carregados. Em seguida, interfaces hidrofóbicas estabilizariam a ligação com a membrana. Assim, propõe-se que as regiões anfipáticas dessa hélice sejam essenciais para a interação.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 69, n. 2, p. 265–276, 1971.
- 2 BYERS, B.; GOETSCH, L. E. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 717–721, 1976.
- 3 HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678–3687, 1987.
- 4 PRINGLE, J. R. Origins and development of the septin field. In: HALL, P. A.; HILARY RUSSEL, S. E.; PRINGLE, J. R. (Ed.) **The septins**. Hoboken: John Wiley, 2008. p. 7–34.
- 5 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8–9, p. 681–687, 2011.
- 6 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 103, 2007. doi: 10.1186/1471-2148-7-103.
- 7 FARES, H.; GOETSCH, L.; PRINGLE, J. R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 399–411, 1996.
- 8 DE VIRGILIO, C.; DEMARINI, D. J.; PRINGLE, J. R. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. **Microbiology**, v. 142, Pt 10, p. 2897–2905, 1996.
- 9 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003.
- 10 ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. **Current Biology**, v. 21, n. 10, p. 384–387, 2011.
- 11 SELLIN, M. E. et al. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 23, p. 4588–4601, dez. 2011.
- 12 HAGIWARA, A. et al. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. **Cytoskeleton**, v. 68, n. 9, p. 512–525, 2011.
- 13 NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The Mammalian Septin Interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. 3, 2017. doi: 10.3389/fcell.2017.00003.
- 14 FUNG, K. Y. Y.; DAI, L.; TRIMBLE, W. S. **Cell and molecular biology of septins. International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 310, p. 289–339, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4.
- 15 LUEDEKE, C. et al. Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. **Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 6, p. 897–908, 2005.

- 16 BARRAL, Y. et al. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 841-851, 2000.
- 17 GLADFELTER, A. S. et al. Isolation and Characterization of Effector-Loop Mutants of CDC42 in Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 5, p. 1239-1255, 2001.
- 18 KISSEL, H. et al. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 353-364, 2005.
- 19 IHARA, M. et al. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 343-352, 2005.
- 20 TADA, T. et al. Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1752-1758, 2007.
- 21 XIE, Y. et al. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.
- 22 HU, Q. et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436-439, 2010.
- 23 HU, Q.; NELSON, W. J. Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. **Cytoskeleton**, v. 68, n. 6, p. 313-324, 2011.
- 24 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681-689 2001.
- 25 MCMURRAY, M. A.; THORNER, J. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. **Cell Division**, v. 4, p. 18, 2009. doi: 10.1186/1747-1028-4-18.
- 26 BEITES, C. L. et al. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 434-439, 1999.
- 27 YANG, Y. M. et al. Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca²⁺ influx to neurotransmitter release at a central synapse. **Neuron**, v. 67, n. 1, p. 100-115, 2010.
- 28 SPILIOTIS, E. T. et al. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 2, p. 295-303, 2008.
- 29 KREMER, B. E.; HAYSTEAD, T.; MACARA, I. G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 10, p. 4648-4659, 2005.
- 30 MOSTOWY, S. et al. A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor. **Biophysical journal**, v. 100, n. 8, p. 1949-1959, 2011.
- 31 KREMER, B. E.; ADANG, L. A.; MACARA, I. G. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. **Cell**, 130, n. 5, p. 837-850, 2007.

- 32 SIRIANNI, A. et al. Mitochondria mediate septin cage assembly to promote autophagy of *Shigella*. **EMBO Reports**, v. 17, n. 7, p. 1029–1043, 2016.
- 33 BURROWS, J. F. et al. Altered expression of the septin gene, *SEPT9*, in ovarian neoplasia. **Journal of Pathology**, v. 201, n. 4, p. 581–588, 2003.
- 34 GONZALEZ, M. E. et al. High *SEPT9_v1* expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8554–8564, 2007.
- 35 MONTAGNA, C. et al. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 63, n. 9, p. 2179–2187, 2003.
- 36 SCOTT, M. et al. Altered patterns of transcription of the septin gene, *SEPT9*, in ovarian tumorigenesis. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1325–1329, 2006.
- 37 HANNIBAL, M. C. et al. *SEPT9* gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy. **Neurology**, v. 72, n. 20, p. 1755–1759, 2009.
- 38 KUHLENBÄUMER, G. et al. Mutations in *SEPT9* cause hereditary neuralgic amyotrophy. **Nature Genetics**, v. 37, n. 10, p. 1044–1046, 2005.
- 39 KINOSHITA, A. et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998.
- 40 VALADARES, N. F. et al. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481–500, 2017.
- 41 ANGELIS, D.; SPILIOTIS, E. T. Septin mutations in human cancers. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. 122, p. 1–17, 2016.
- 42 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 414–424, 2005.
- 43 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458–1467, 1999.
- 44 CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2762–2777, 2003.
- 45 AKIL, A. et al. Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV. **Nature, Communications**, v. 7, 2016. doi: 10.1038/ncomms12203.
- 46 GARCIA, W. et al. Dissection of a human septin: Definition and characterization of distinct domains within human *SEPT4*. **Biochemistry**, v. 45, n. 46, p. 13918–13931, 2006.
- 47 ZERAIK, A. E. et al. Biophysical dissection of schistosome septins: Insights into oligomerization and membrane binding. **Biochimie**, v. 131, p. 96–105, 2016. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.014.
- 48 CAO, L. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5526–5532, 2007.

49 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009.

50 JOHN, C. M. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296–3307, 2007.

51 BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8274–8279, 2008.

52 SELLIN, M. E.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 10, p. 1594–1607, 2014.

53 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311–315, 2007.

54 MENDONÇA, D. C. et al. Repositioning septins within the core particle. 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/08/569251.full.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2019.

55 SOROOR, F. et al. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/07/569871.full.pdf>>. Acesso em 30 abr. 2019.

56 KIM, M. S. et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815–826, 2011.

57 SANDROCK, K. et al. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8–9, p. 751–761, 2011.

58 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e13799, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013799.

59 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012.

60 FIELD, C. M. et al. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183–194, 1996.

61 FRAZIER, J. A. et al. Polymerization of purified yeast septins: Evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 737–749, 1998.

62 DEMAY, B. S. et al. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. **Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 6, p. 1065–1081, 2011.

63 GARCIA, G. et al. Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 6, p. 993–1004, 2011.

- 64 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 65 BERTIN, A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 404, n. 4, p. 711–731, dez. 2010.
- 66 RODAL, A. A. et al. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 1, p. 372–384, 2004.
- 67 JOBERTY, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 861–866, 2001.
- 68 TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHI, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. **Current Biology**, v. 19, n. 2, p. 140–145, 2009.
- 69 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is schistosomiasis ?** Disponível em: <<https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>>. Acesso em 30 abr. 2019.
- 70 ZERAIK, A. E. et al. Septins of Platyhelminths: Identification, Phylogeny, Expression and Localization among Developmental Stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1–14, 2013.
- 71 ZERAIK, A. E. **Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni***. 2013. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 72 ZERAIK, A. E. et al. Reversible paralysis of *Schistosoma mansoni* by forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin that affects septins. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 8, p. 523–531, 2014.
- 73 ZERAIK, A. E. et al. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7799–7811, 2014.
- 74 GOLDBERG, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: Mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 237–248, 1998.
- 75 CANNON, K. S. et al. An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 4, p. 1128–1137, 2019.
- 76 OMRANE, M. et al. Septin 9 has Two polybasic domains critical to septin filament assembly and golgi integrity. **Food Science and Human Wellness**, v. 13, p. 138–153, 2019.
- 77 STEELS, J. D. et al. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 64, n. 10, p. 794–807, 2007.
- 78 FARES, H.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, n. 12, p. 1843-1859, 1995.
- 79 BEBER, A. et al. Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. **Nature Communications**, v. 10, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-08344-5
- 80 BRIDGES, A. A. et al. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 1, p. 23–32, 2016.

81 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2012..

82 DEHAL, P. et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2157–2167, 2002.

83 **Understanding Multi-Angle Static Light Scattering**. Disponível em: <<https://www.wyatt.com/library/theory/understanding-multi-angle-static-light-scattering.html>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

84 LEES, J. G. et al. CDtool - An integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004.

85 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.

86 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289–298, 2006.

87 JERABEK-WILLEMSSEN, M. et al. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p. 101–113, 2014. doi: 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.

88 AMARO, M. et al. Fluorescence of nitrobenzoxadiazole (NBD)-labeled lipids in model membranes is connected not to lipid mobility but to probe location. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 10, p. 7042–7054, 2016.

89 HUBBELL, W. L.; CAFISO, D. S.; ALTENBACH, C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 9, p. 735–739, 2000.

90 TODD, A. P. et al. Site-directed mutagenesis of colicin E1 provides specific attachment sites for spin labels whose spectra are sensitive to local conformation. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 6, n. 3, p. 294–305, 1989.

91 FANUCCI, G. E.; CAFISO, D. S. Recent advances and applications of site-directed spin labeling. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 5, p. 644–653, 2006.

92 MIHÁLY TAKÁCS, I. et al. Site directed spin labeling of hemerythrin and hemoglobin. **Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia**, v. 58, n. 2, p. 61–69, 2013.

93 GREENFIELD, N. J.; HITCHCOCK-DEGREGORI, S. E. Conformational intermediates in the folding of a coiled-coil model peptide of the N-terminus of tropomyosin and α -tropomyosin. **Protein Science**, v. 2, n. 8, p. 1263–1273, 1993.

94 KWOK, S. C.; HODGES, R. S. Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two-stranded α -helical coiled-coils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21576–21588, 2004.

95 YANCEY, P. H. et al. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, n. 4566, p. 1214–1222, 1982.

96 KHAN, S. H. et al. Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention. **IUBMB Life**, v. 62, n. 12, p. 891–895, 2010.

97 TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? - **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, n. 1, p. 67–97, 1993.

98 CABREJOS, D. A. L. **Especificidade na montagem de filamentos de Septinas: o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8**. 2016. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

99 NANOTEMPER. **Applications**. Disponível em: <<https://nanotempertech.com/monolith/>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

100 GIMÉNEZ-ANDRÉS, M.; ČOPIČ, A.; ANTONNY, B. The many faces of amphipathic helices. **Biomolecules**, v. 8, n. 3, 2018. doi: 10.3390/biom8030045.

101 GAUTIER, R. et al. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101–2102, 2008.