UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

SINARA TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS

Estudos estruturais da SEPT8 e análise de suas interações com SEPT5 e SEPT7

São Carlos

2014

SINARA TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS

Estudos estruturais da SEPT8 e análise de suas interações com SEPT5 e SEPT7

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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Biomolecular

Orientadora: Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo

Versão Original

São Carlos

2014

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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Morais, Sinara Teixeira do Brasil

Estudos estruturais da SEPT8 e análise de suas interações com SEPT5 e SEPT7 / Sinara Teixeira do Brasil Moraes; orientadora Ana Paula Ulian Araújo -- São Carlos, 2014.

83 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Septinas. 2. Estudos estruturais. 3. Co-expressão. I. Araújo, Ana Paula Ulian, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sinara Teixeira do Brasil Moraes

Dissertação apresentada ao 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.

Aprovado(a) em: 29/05/2014

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Ana Paula Ulian de Araujo

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique da Silva

Instituição: UFSCar/São Carlos

Prof(a). Dr(a). Richard John Ward

Instituição: FFCLRP/USP

Dedico esse trabalho aos meus pais, Mara e Jefferson (sempre presente), que por uma vida inteira se dedicaram à minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela constante presença em minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Ana Paula Ulian Araújo pela orientação, oportunidade de aprendizado e rapidez nas correções.

Às técnicas, Bel e Andressa, pela organização e manutenção do laboratório tornando a rotina de trabalho mais fácil. Agradeço em especial à Andressa por toda a ajuda com os protocolos e manuseio de equipamentos ao longo desses dois anos, muito obrigada.

Ao grupo de septinólogos pelas discussões e trocas de idéias, especialmente a Dr^a. Joci Neuby pela ajuda direta na realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz no grupo de Biofísica, Helô, Raíssa, Heline, Débora e Natália pela descontração tornando o dia-a-dia no laboratório mais prazeroso e pela amizade.

Aos meus pais, Mara e Jefferson (*in memoriam*), por me servirem de exemplo todos os dias; e aos meus irmãos, Jefferson e Aline, por todo o incentivo, suporte e amor incondicional. Vocês são tudo na minha vida!

Ao meu então noivo, Altieris, que muitas vezes perdeu as tardes de domingo me acompanhando no laboratório. Amo você!

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos e à Universidade de São Paulo pela oportunidade.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

MORAIS, S. T. B. **Estudos estruturais da SEPT8 e análise de suas interações com SEPT5 e SEPT7**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Septinas são proteínas que ligam GTP e interagem entre si formando heterocomplexos, os quais formam filamentos e estruturas de maior nível de organização. Tais filamentos, além de se mostrarem importantes durante a citocinese também podem estar envolvidos em outros processos celulares tais como determinação da polaridade celular e reorganização do citoesqueleto. As septinas, inicialmente descobertas em *Saccharomyces cerevisiae*, já foram identificadas também em fungos, algas-verdes, mamíferos, porém nunca em plantas. Tipicamente, septinas apresentam três domínios estruturais compostos por um domínio central de ligação ao GTP flanqueado por um N-terminal variável e um C-terminal que pode conter sequências do tipo *coiled-coil*. Este trabalho teve como objetivo a caracterização do domínio de ligação a GTP da septina 8 humana (SEPT8G) por meio de estudos biofísicos. Nesse sentido, SEPT8G foi eficientemente produzida em *E. coli*, tendo seu estado dimérico em solução confirmado por cromatografia de exclusão molecular. Diferentemente das outras septinas já reportadas, mesmo dimérica a SEPT8G apresentou-se na forma apo. Ensaio de atividade GTPásica foram realizados, confirmando a incapacidade dessa septina em hidrolisar o GTP. Ainda, análises de estabilidade térmica por Dicroísmo Circular revelaram que a presença do íon magnésio leva à diminuição de sua estabilidade estrutural. Baseando-se em resultados prévios de interação obtidos pela técnica do duplo-híbrido em leveduras, estudos voltados à análise da interação entre as septinas 7 e 8 e, posteriormente, entre as septinas 5, 7 e 8 foram realizados. A co-purificação do complexo formado pelas septinas 7 e 8 mostrou-se dependente da região C-terminal completa de SEPT7 de modo que, quando ausente, a interação mostrou-se expressivamente prejudicada. Já o complexo formado pelas septinas 5/7/8 foi obtido contendo as três proteínas em frações equimolares e solúveis, disponibilizando assim um novo heterocomplexo de septinas para ensaios funcionais e estruturais.

Palavras-chave: Septinas. Estudos estruturais. Co-expressão.

ABSTRACT

MORAIS, S. T. B. **Structural studies of SEPT8 and analysis of its interaction with SEPT5 and SEPT7.** 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Septins are GTP-binding proteins that interact with each other to form heterocomplexes, which form filaments and higher order structures. These filaments are important for cytokinesis and may be involved in other cellular processes such as the determination of cell polarity and cytoskeleton reorganization. The septins, initially discovered in *Saccharomyces cerevisiae*, have also been identified in fungi, green algae, mammals but not in plants. Typically, septins have three structural domains comprising a central GTP binding domain flanked by a variable N-terminal and a C-terminal which can contain coiled-coil structures. This work sought to characterize the GTP-binding domain of the human septin 8 (SEPT8G) through biophysical studies. Accordingly, SEPT8G was efficiently produced in *E. coli*, and its dimeric state in solution was confirmed by size exclusion chromatography. Compared to other septins previously reported, the dimeric SEPT8G presented itself as an apo-protein. GTPase activity assays were performed, confirming the inability of this septin to hydrolyse GTP. Additionally, thermal stability analyses by Circular Dichroism showed that the presence of the magnesium ion leads to a decrease of structural stability. Considering previous results of septins interactions from yeast two-hybrid experiments, we have analyzed the interaction between the septins 7, 8 and subsequently among septins 5, 7 and 8. Co-purification of the complex formed by the septins 7 and 8 showed to be dependent on the complete SEPT7 C-terminal region so that, when absent, the interaction was significantly impaired. The obtained complex formed by septins 5/7/8 contained the three proteins in soluble and equimolar fractions, providing a new septin heterocomplex for functional and structural studies.

Keywords: Septins. Structural studies. Co-expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Septinas durante o processo de divisão celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 2 - Classificação das septinas de mamíferos em grupos considerando seus domínios estruturais	24
Figura 3 - Estrutura primária de septinas.....	25
Figura 4- Sítio de ligação ao nucleotídeo	26
Figura 5 - Alinhamento das sequências de septinas humanas	27
Figura 6 - Comparação dos aminoácidos envolvidos na coordenação do íon magnésio com base na estrutura cristalográfica de <i>Sm</i> SEPT10 e SEPT2	27
Figura 7 - Formação de homofilamentos de septinas	30
Figura 8 - Representação da superfície da unidade hexamérica básica.....	31
Figura 9 - Análise dos produtos de amplificação para as diferentes construções de SEPT8 e do padrão de restrição dos clones contendo as septinas 7 e 8	55
Figura 10 - Análise da expressão de SEPT8G e co-expressão das diferentes construções contendo SEPT7 e 8 e SEPT5, 7 e 8	56
Figura 11 - Cromatografia de Exclusão Molecular de SEPT8G	57
Figura 12 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo de SEPT8G	58
Figura 13 - Teste de atividade GTPásica.....	59
Figura 14 - Espectro de CD de SEPT8G a 25°C	60
Figura 15 - Curvas de desnaturação térmica de SEPT8G	62
Figura 16 - Espectros de fluorescência de SEPT8G na presença e ausência de magnésio a 25°C.....	63
Figura 17 - Espectros de fluorescência extrínseca utilizando como sonda o ANS a 25°C	64
Figura 18 - Análise da co-purificação comparando as diferentes construções contendo as septinas 7 e 8	66
Figura 19 - Análise da co-purificação das septinas humanas 5/7/8 utilizando apenas um <i>tag</i>	68
Figura 20 - Análise do cromatograma do complexo das septinas humanas 5/7/8 expresso utilizando apenas o <i>tag</i> de histidina.	69
Figura 21 - Identificação das septinas por Espectrometria de Massas	70
Figura 22 - Análise da co-purificação das septinas que compõem o complexo 5/7/8 utilizando dois <i>tags</i>	71
Figura 23 - Análise do perfil cromatográfico das septinas 5/7/8 expressas na linhagem <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para as construções referentes à SEPT8.....	35
Tabela 2 - Dados das construções utilizadas para co-expressão de SEPT7/SEPT8.....	41
Tabela3 - Dados das construções utilizadas para a co-expressão das septinas humanas 5, 7 e 8.....	43
Tabela 4 - Tampões de lise utilizados para as diferentes construções.....	44
Tabela 5 - Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica	50
Tabela 6 - Tampões utilizados no <i>screening</i> de solubilidade.....	52
Tabela 7 - Dados do espalhamento de luz de SEPT8G	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Septinas, a descoberta.....	21
1.2 Septinas em outros organismos	21
1.3 Septinas humanas	23
1.4 Domínios estruturais das septinas	24
1.4.1 Domínio N-terminal	25
1.4.2 Domínio GTPásico	25
1.4.3 Domínio C-terminal.....	28
1.4.4 Formação de filamentos em septinas.....	28
1.5 Complexo das septinas humanas 2/6/7	30
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Subclonagem das construções referentes à SEPT8	35
3.1.1 Ligação dos produtos de PCR no vetor de clonagem pGEM T- <i>easy</i>	36
3.1.2 Digestão do vetor pGEM T- <i>easy</i> para extração dos insertos.....	37
3.1.3 Digestão do vetor de expressão para receber os insertos.....	38
3.1.4 Subclonagem dos fragmentos de DNA codificando SEPT8NGC, SEPT8α0GC em vetor de expressão pETDuet.....	38
3.2 Linhagens de células utilizadas para expressão.....	38
3.2.1 <i>E. coli</i> Rosetta (DE3).....	39
3.2.2 <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	39
3.3. Descrição das construções	39
3.3.1 SEPT8G.....	39
3.3.2 Co-expressão SEPT7/SEPT8.....	40
3.3.3 Co-expressão SEPT5/7/8.....	41
3.3.3.1 Construção para purificação do heterocomplexo utilizando apenas His- <i>tag</i>	42
3.3.3.2 Construção para purificação do heterocomplexo utilizando os <i>tags</i> de histidina e MBP	42
3.4 Expressão heteróloga das proteínas recombinantes.....	43
3.5 Purificação das proteínas recombinantes.....	44
3.5.1 Purificação da proteína SEPT8G	44
3.5.2 Purificação das diferentes construções expressando as septinas 7 e 8	45
3.5.3 Purificação das proteínas co-expressas SEPT5/7/8.....	45

3.5.3.1 Construção utilizando apenas um <i>tag</i> expressa em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	45
3.5.3.2 Construção utilizando dois <i>tags</i> expressa em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	46
3.6 Espectrometria de massas para confirmação da identidade das proteínas co-purificadas SEPT5/7/8.....	47
3.7 Estimativa da massa molecular da proteína SEPT8G	48
3.8 Análise do conteúdo de nucleotídeo e análise da atividade GTPásica de SEPT8G	49
3.9 Análises estruturais de SEPT8G	50
3.9.1 Dicroísmo Circular.....	50
3.9.1.1 Comportamento de SEPT8G frente a adição de nucleotídeos e magnésio	50
3.9.1.2 Estabilidade térmica de SEPT8G	51
3.9.2 Emissão de fluorescência intrínseca	51
3.9.3 Emissão de fluorescência extrínseca.....	51
3.9.4 Seleção de tampões para ensaios de cristalização de SEPT8G.....	52
3.10 Ensaios de cristalização de SEPT8G	53
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Clonagem e subclonagem das sequências SEPT8 α 0GC e SEPT8NGC	55
4.2 Expressão das proteínas recombinantes	55
4.2.1 SEPT8G	57
4.2.1.1 Estimativa da massa molecular de SEPT8G	57
4.2.1.2 Conteúdo de nucleotídeo e atividade GTPásica.....	58
4.2.1.3 Dicroísmo Circular (CD)	59
4.2.1.4 Emissão de fluorescência	63
4.2.1.5 Seleção de tampões para ensaios de cristalização.....	65
4.2.1.6 Ensaios de cristalização	65
4.2.2 Co-Expressão e co-purificação do complexo SEPT7/SEPT8.....	66
4.2.3 Expressão, purificação e identificação do complexo SEPT5/SEPT7/SEPT8.....	67
5. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas, a descoberta

A história das septinas teve início em 1971 quando Hartwell, realizando uma varredura genética em linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* identificou quatro mutantes sensíveis à temperatura deficientes na conclusão do ciclo celular. (1 – 3) Tais mutações resultavam em células multinucleadas levando à morte celular. Hartwell observou que tais mutações encontravam-se nos genes que codificavam as proteínas CDC3 ou CDC10 ou CDCD11 ou CDC12, estas responsáveis pela formação de estruturas filamentosas presentes no septo que separa a célula-mãe da célula-filha, surgindo então o nome “septinas”.

Posteriormente os mesmos filamentos foram identificados por microscopia eletrônica como sendo estruturas filamentosas de 10 nm de diâmetro. (4) Mais tarde, os produtos desses genes foram identificados por microscopia de fluorescência na estrutura filamentosa formada no septo entre as células mãe e filha, confirmando assim a participação de tais proteínas na formação do septo (Figura 1). (5–9)

Figura 1 - Septinas durante o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*. A) Localização das septinas durante a citocinese, identificada por microscopia de fluorescência. B) Complexo em forma de anel formado pelas septinas 2, 6 e 7 identificado por microscopia eletrônica. A escala representa 100 nm

Fonte: a) GLADFELTER et al. (6) b) KINOSHITA. (10)

1.2 Septinas em outros organismos

Tempos mais tarde, as septinas foram identificadas em outros organismos eucariotos tais como fungos, nemátodos, moscas e mamíferos, não tendo sido reportada até o momento em nenhum representante do Reino Plantae. (11 – 17) O número de genes que codificam

septinas é bastante variável entre as espécies, podendo ser apenas um, como é o caso da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, até treze em humanos. (18, 19)

No fungo *Aspergillus nidulans* foram encontrados cinco genes codificando septinas, enquanto em *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram encontrados sete genes. Em *S. cerevisiae*, das sete septinas encontradas, quatro mostraram-se indispensáveis para a viabilidade celular, sendo elas CDC3, CDC10, CDCD11 e CDC12. (20) A denominação CDC é uma abreviação da expressão em inglês *Cell Division Cycle* devido a participação dessas proteínas na conclusão do ciclo celular.(2)

O nemátodo *Caenorhabditis elegans*, por sua vez, possui apenas dois genes que codificam septinas, sendo o produto de tais genes denominados UNC-59 e UNC-61. Embora não tenha sido observado que a ausência de tais proteínas seja crucial para a conclusão da divisão celular, vermes mutantes para cada um dos loci apresentaram locomoção desordenada, indicando que na ausência dessas septinas a citocinese se torna menos efetiva. (21 – 23) O termo UNC utilizado para denominar os produtos gênicos deve-se ao termo em inglês *uncoordinated* (que em português significa descoordenado), devido a anormalidade na locomoção desses vermes na ausência dessas proteínas.

A primeira descrição para septinas em eucariotos multicelulares ocorreu em 1994, por Neufeld e Rubin, na mosca *Drosophila melanogaster*. Foram identificados cinco genes codificando septinas, sendo o produto destes denominados Pnut, Sep1, Sep2, Sep4 e Sep5. Tais pesquisadores observaram que mutações em *pnut* levavam a interrupção da citocinese resultando em células multinucleadas e consequente morte do organismo. A denominação *pnut*, palavra que em inglês significa “amendoim”, se deve ao fenótipo resultante das células que, quando da depleção da proteína correspondente, apresentava vários núcleos assemelhando-se a um amendoim na casca.(24)

Mais recentemente, um estudo utilizando a sequência de nucleotídeos da proteína Cdc3 de *S. cerevisiae* na busca por sequências homólogas nos bancos de dados disponíveis revelou a presença de septinas também nas algas verdes, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloris bacillaris*, *Volvox carteri* e *Chlorella variabilis*; na alga marrom *Ectocarpus siliculosus*; e nos protozoários ciliados *Tetrahymena thermophila* e *Paramecium tetraurelia*. (18, 25)

Embora esteja ausente em plantas, a identificação de tais proteínas em grupos evolutivamente distintos sugere a existência de um ancestral comum que possivelmente ocupava um nível basal no processo evolutivo dos eucariotos. A partir deste ancestral, ao longo da evolução, alguns grupos perderam os genes de septinas, como no caso das plantas,

outros mantiveram apenas um gene, como é o caso da alga *Chlamydomonas reinhardtii*, enquanto outras linhagens os proliferaram, como ocorreu, por exemplo, nos humanos. (18)

1.3 Septinas humanas

Atualmente são descritos treze genes codificando septinas em humanos, sendo que o número de proteínas pode ser ainda maior devido a possibilidade de ocorrer *splicing* alternativo ou, ainda, por haver múltiplos sítios de início de tradução. (26) Os treze produtos gênicos descritos até então são subdivididos em quatro subgrupos, denominados de I a IV, com base na similaridade da sequência primária, particularmente de seu domínio C-terminal.

A classificação das septinas considerando seus domínios estruturais pode ser observada na Figura 2. (27 – 29) Os grupos II e IV são caracterizados por apresentarem uma sequência longa no C-terminal predita como *coiled-coil*. O grupo III, por sua vez, é caracterizado por um C-terminal contendo uma sequência curta de *coiled-coil* e, por fim, as septinas classificadas no grupo I não apresentam sequência que corresponde a esse tipo de estrutura.

Inicialmente, a nomenclatura para septinas de mamíferos era bastante diversificada. Por isso, em 2002, a *Human Genome Organization* (HUGO) e *Mouse Genome Nomenclature* (MGN) tomaram a iniciativa de padronizar a nomenclatura das septinas de mamíferos. (30, 31) A partir de então, cada septina humana recebeu a nomenclatura SEPT1, SEPT2, etc e os respectivos genes codificantes receberam o mesmo nome, também com letras maiúsculas, porém em itálico (*SEPT1*, *SEPT2*, etc). Devido a possibilidade de existir *splicing* alternativo, o número de isoformas expressas ultrapassa consideravelmente os 13 genes descritos até então. Como um exemplo, a septina 9 apresenta 17 éxons que, teoricamente, pode levar a 18 diferentes transcritos. (32) Sendo assim, de modo a evitar que um mesmo transcrito possa ter diferentes denominações, para as isoformas convencionou-se adicionar a letra v e o número da isoforma.

Figura 2 - Classificação das septinas de mamíferos em grupos considerando seus domínios estruturais. As septinas do grupo I possuem o C-terminal mais curto, sem características de *coiled-coil*, enquanto as septinas 9, 8 e 4 possuem os maiores N-terminais, ricos em prolina. (28)

Fonte: MACEDO (33)

Vários estudos vem sendo realizados com o intuito de entender os papéis celulares das septinas. O que se têm se observado é que essas proteínas atuam como um andaime no recrutamento de outras proteínas para o desempenho de suas funções. Muitas funções foram atribuídas às septinas após a identificação de seus parceiros proteicos, ampliando a atuação dessas moléculas na célula e comprovando que seu papel não está restrito ao processo de divisão celular, como se pensava no início. Dentre as funções relacionadas às septinas em humanos estão: a citocinese e a segregação dos cromossomos durante a mitose (34), a reorganização do citoesqueleto, o tráfego de vesículas, a dinâmica de membranas, a exocitose e a apoptose. (10, 35 – 42)

1.4 Domínios estruturais das septinas

Septinas apresentam o domínio conservado de ligação ao nucleotídeo guanina o que as classifica como parte da família das GTPases. Tipicamente, as septinas apresentam três domínios estruturais (Figura 3), sendo eles: um N-terminal variável, que pode incluir uma região polibásica; um domínio central GTPásico responsável pela ligação e, em muitos casos, pela hidrólise do nucleotídeo de guanina; e ainda, uma região C-terminal que pode incluir sequências características do tipo *coiled-coil*, as quais podem estar relacionadas com interações entre diferentes septinas. (43, 9)

Figura 3 - Estrutura primária de septinas. Em evidência estão as porções N- e C-terminais flanqueando o domínio GTPásico. Além disso estão ilustradas as posições da região polibásica no domínio N-terminal bem como o motivo que contém os elementos únicos de septinas (SUE).

Fonte: adaptada de PAN et al (32)

1.4.1 Domínio N-terminal

Dados na literatura apontam para uma possível associação com membranas celulares por meio da interação entre a região polibásica (existente entre os domínios N-terminal e GTPásico) e o fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂). Foi observado que SEPT4 foi capaz de ligar-se especificamente aos fosfolipídeos de membrana, PtdIns(4,5)P₂ e fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃), sendo que quando a região polibásica foi mutada a interação não pôde mais ser observada, o que pode estar associado à algum tipo de função regulatória. (44, 38) Mais recentemente foi demonstrado ainda que a presença de PtdIns (4,5)P₂ promove a polimerização e organização dos filamentos de septinas em leveduras. (45)

1.4.2 Domínio GTPásico

O domínio central de ligação ao GTP apresenta o mínimo de 75% de similaridade entre septinas da mesma espécie, sendo este o domínio mais conservado. (38) Neste domínio encontra-se o motivo *P-loop*, o qual é caracterizado pelo consenso G1 (GxxGxGKST) (46), levando à classificação das septinas na superclasse das *P-loop* GTPases. (8, 47, 48) Por não apresentarem os motivos G2 e G5, as septinas estão mais relacionadas ao grupo das Ras GTPases do que de outros membros dessa superclasse. (46, 47) A estrutura de ΔNSEPT2 de camundongo complexada a um nucleotídeo análogo ao GTP, GppNHp, resolvida à resolução de 2.9 Å (PDB ID: 3FTQ) permitiu observar com mais detalhes como se dão as interações em torno desse nucleotídeo (Figura 4).

Figura 5 - Alinhamento das sequências de septinas humanas. Em evidência estão as regiões conservadas nas septinas que no subgrupo II apresentam substituição.

Fonte: SIRAJJUDIN (49)

Ainda no que diz respeito à participação deste resíduo conservado de treonina na atividade GTPásica, Sirajjudin et al mostraram que a taxa de hidrólise do GTP pela septina 2 foi significativamente reduzida quando este resíduo foi substituído por uma glicina, o que levou também à diminuição em 21 vezes a afinidade a esse nucleotídeo evidenciando o papel deste resíduo na capacidade hidrolítica de tais proteínas. (49)

Adicionalmente, um trabalho recente apresentou a estrutura da septina *SmSEPT10* de *Schistosoma mansoni*, ortóloga à septina 10 humana, a uma resolução de 2,1Å permitindo analisar ainda mais detalhadamente o papel do resíduo de treonina na estabilização do íon magnésio. (50) Nessa estrutura pôde-se observar que tanto o íon magnésio quanto o fosfato γ não são coordenados pelo switch I, como mostra a Figura 6. (50)

Figura 6 - Comparação dos aminoácidos envolvidos na coordenação do íon magnésio com base na estrutura cristalográfica de *SmSEPT10* e SEPT2. A) *SmSEPT10*. B) SEPT2. Em verde está representado o íon magnésio; em vermelho as moléculas de água coordenadas por esse íon.

Fonte: ZERAIK (50)

Assim como ocorre nas demais septinas do subgrupo II, *SmSEPT10* também mostrou-se incapaz de hidrolisar o nucleotídeo. Tal deficiência é atribuída, agora com embasamento nos dados obtidos através da estrutura cristalográfica, à ausência do aminoácido conservado

de treonina equivalente à Thr78 que, como observado na estrutura, leva à não participação do *switch* I na ligação do nucleotídeo. (50)

Sendo *Sm*SEPT10 ortóloga à SEPT10 humana e, ainda, sabendo que esta última assim como os demais membros do subgrupo II, septinas 6, 8, e 11, não apresentam esse resíduo conservado, essa parece ser a explicação para o fato de apenas SEPT6 se apresentar ligada ao GTP no complexo SEPT2/6/7.

Na extremidade do domínio GTPásico, precedendo o domínio C-terminal, existe uma região de 53 aminoácidos que consiste em uma região altamente conservada entre as septinas denominada SUE (*Septin Unique Element*) (Figura 3). (51) Uma análise de 162 septinas mostrou que cerca de metade dos resíduos desta região são conservados em 50-93% das septinas. Embora altamente conservada entre as septinas, ainda não foi descrita uma função específica para tal região. (43)

1.4.3 Domínio C-terminal

O domínio C-terminal comumente apresenta sequências preditas como sendo capazes de formar estruturas do tipo *coiled-coil*. Essa estrutura é formada por duas ou mais α -hélices anfipáticas que apresentam um padrão de repetição contendo sete resíduos, *abcdefg*, caracterizados pela presença de resíduos hidrofóbicos, como leucinas nas posições *a* e *d*, as quais são intercaladas por resíduos carregados nas posições *e* e *g*. (52) O *coiled-coil* pode estar relacionado com a interação da septina com ela mesma ou com outras proteínas. (38) Com exceção das septinas humanas 3, 9 e 12 que não apresentam *coiled-coil*, essa região exibe cerca de 60% de identidade entre as septinas de mamíferos. (31)

1.4.4 Formação de filamentos em septinas

As septinas possuem a característica de se polimerizarem formando complexos altamente organizados. Complexos hetero-oligoméricos foram isolados em levedura, mosca, camundongo e humano tendo sido obtidos também *in vitro*. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas, embora sua função ainda não esteja bem estabelecida. (8, 10, 14, 53, 54)

Na levedura *S. cerevisiae* o complexo hetero-oligomérico formado pelas quatro proteínas tidas como essenciais para a viabilidade celular (Cdc11, Cdc12, Cdc3 e Cdc10) foi

obtido por cromatografia de imuno afinidade. (53, 55, 56) Tal complexo organiza-se na forma de um octâmero contendo duas cópias de cada septina, levando a formação de um filamento com a seguinte organização: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. *In vitro*, a formação do filamento também pôde ser observada com a estequiometria de 2:2:2:2, inferida com base na massa molecular aparente. O filamento de tais septinas em *S. cerevisiae* foi associado a diversos processos celulares tais como divisão celular, controle do ciclo celular e compartimentalização de organelas. (20, 57)

No nemátodo *C. elegans* foi observado que as duas únicas septinas organizam-se em heterodímeros e heterotetrâmeros dispostos da seguinte forma: UNC-59/UNC-61/UNC-61/UNC-59. Tais complexos apresentam quantidades equimolares de cada septina não tendo sido observada a presença de nenhum nucleotídeo ligado. (58)

Em *Drosophila melanogaster* o complexo formado pelas septinas Pnut, Sep1 e Sep2 foi obtido de embriões na proporção de 1:1:1. Este complexo também foi observado *in vitro* formando filamentos que ligavam e hidrolisavam GTP. (14) As proteínas desse complexo foram observadas concentradas no sulco de clivagem durante a citocinese, indicando sua importância nesse processo. Adicionalmente, tais septinas foram encontradas em altas concentrações em células do sistema nervoso central de *D. melanogaster* indicando um possível papel no tráfego de vesículas. (14, 24)

A primeira descrição de um heterocomplexo em platelmintos foi reportada recentemente no verme *Schistosoma mansoni*. O complexo recombinante foi identificado por espectroscopia de massas e é formado pelas septinas SmSEPT5/10/7.2. Foi observado que este complexo forma filamentos com alto grau de organização estando possivelmente envolvido em funções motoras, uma vez que estudos de imunolocalização revelaram a colocalização de septinas e actina em fibras musculares. (59, 60) Curiosamente, em *S. mansoni* não há representantes de septinas do grupo I (SEPT3, 9 ou 12), porém há uma duplicação da septina 7 (denominadas 7.1 e 7.2). (59, 60)

Contrastando com os complexos formados por mais de uma septina, existem evidências de estruturas formadas por homofilamentos. A primeira evidência de homofilamentos foi descrita em um trabalho em que se observou que a Sept2 recombinante de *Xenopus laevis* formava filamentos apenas na presença de GTP *in vitro*. (61) Em contrapartida, para a septina humana 2 foram observados homofilamentos *in vitro* tanto na presença de GTP quanto de GDP. (62)

Homofilamentos caracterizados como amilóides também foram observados para septina 4 de humano em condições *in vitro*. (63) Neste trabalho, os autores sugerem que a

formação de homofilamentos pode estar relacionada com um processo patológico possivelmente associado à Alzheimer, Parkinson e outras doenças degenerativas, uma vez que a septina 4 foi identificada em cérebro de pacientes com Alzheimer. (64) Filamentos similares foram também observados *in vitro* para SEPT2. (65)

Figura 7 - Formação de homofilamentos de septinas. A) Homofilamentos formados por Sept2 de *Xenopus*. Escala representa 100nm. B) Homofilamentos formados por SEPT2 humana. Escala representa 100nm. C) Homofilamentos formados por SEPT4 humana. Escala representa 1000nm.

Fonte: A) MENDONZA (61), B) HUANG (62) e, C) GARCIA (63)

Enquanto que para os heterofilamentos são atribuídas várias funções, para os homofilamentos ainda não está claro se essas estruturas são fisiológicas ou patológicas. Se esta é um fenômeno geral ou quais septinas são capazes de formar tais estruturas e como sua organização é regulada são questões que ainda necessitam ser investigadas.

1.5 Complexo das septinas humanas 2/6/7

O complexo de septinas humanas formado pelas septinas 2, 6 e 7 é o melhor caracterizado até o momento, sendo este o único complexo de septinas com estrutura tridimensional resolvida. (54, 66) Tal complexo tem como subunidade básica um hexâmero, o qual se dispõe da seguinte forma para a formação do filamento: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Figura 8).

Com a resolução da estrutura deste complexo, ainda que a baixa resolução (4Å), foi possível verificar que a interação entre as septinas ocorre por duas interfaces distintas: uma interface composta pelos N e C-terminais (interface N-C) e outra pelo domínio GTPásico

(interface G). No complexo, SEPT2 forma um homodímero pela interface N-C, deixando livre o domínio GTPásico para interagir com a SEPT6. Esta última está ligada à SEPT7 pela sua região N-C de modo que a interface G de SEPT7 fica exposta em ambas as extremidades do complexo permitindo o alongamento do filamento por meio da associação a outra SEPT7. (66)

Figura 8 - Representação da superfície da unidade hexamérica básica. As proteínas e a natureza dos nucleotídeos estão mostradas. A suposta orientação dos C-terminais estão esquematizados pelas setas.

Fonte: SIRAJJUDIN. (66)

Uma fração deste mesmo complexo foi identificada na forma de um octâmero, contendo a SEPT9 em cada uma das extremidades. (67) Posteriormente, dados obtidos por meio da técnica do duplo híbrido em levedura validaram a possibilidade de um octâmero incluindo a septina 9. (68) Nesse estudo a septina 7, usada como isca, apresentou preferência de mais de 70% pela septina 9.

Outros complexos de septinas humanas foram descritos porém com menos detalhes, como por exemplo, os complexos formados por SEPT3-SEPT5-SEPT7 e SEPT7-SEPT9-SEPT11 caracterizados por imunofluorescência em cérebro e fibroblastos embrionários de ratos. (69 – 71)

Com base no complexo 2/6/7, Kinoshita propôs que as septinas desse complexo poderiam ser substituídas por outra do mesmo grupo para a formação do filamento. (26) Isto, somado aos dados de interação obtidos pela técnica do duplo híbrido em leveduras utilizando as septinas 1, 5 e 7 como isca na busca de parceiros de interação, leva a muitas combinações possíveis de septinas para a formação de hexâmeros. (33)

Embora muitas combinações deferentes de septinas sejam possíveis, poucas destas estão descritas ou caracterizadas.

Neste trabalho, procuramos contribuir com estudos estruturais focados na SEPT8, mais especificamente em seu domínio GTPase (SEPT8G) e suas interações com as septinas 5 (SEPT5) e 7 (SEPT7) na tentativa de validá-las.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral estudos estruturais da septina 8 humana individualmente, utilizando técnicas biofísicas, bem como do complexo formado pelas septinas humanas 7 e 8 e 5, 7 e 8.

Especificamente buscou-se:

- a clonagem, expressão heteróloga de tais genes e posterior purificação dos produtos das construções contendo os genes em questão;
- a avaliação estrutural da septina 8 por meio de dicroísmo circular, emissão de fluorescência e ensaios de cristalização;
- ensaios de atividade GTPásica e avaliação do teor de nucleotídeo de SEPT8;
- co-expressão e co-purificação das septinas 7 e 8 para confirmação desta interação e avaliação da dependência do domínio C-terminal para tal;
- co-expressão e co-purificação das septinas 5, 7 e 8 para validação dessa interação, visando ensaios de cristalização e avaliação da formação de filamentos funcionais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos na subclonagem foram conduzidos de acordo com as técnicas padrão de clonagem molecular descritas por Sambrook et al. (72)

3.1 Subclonagem das construções referentes à SEPT8

Os cDNAs codificando as proteínas SEPT5NGC, SEPT7NGC, SEPT7NGc e SEPT8G já haviam sido clonadas, a partir de uma biblioteca comercial de cDNA de cérebro fetal humano, e subclonadas em vetores de expressão em nosso grupo. Assim, tais construções foram gentilmente cedidas pela Dra. Joci Neuby A. Macedo. Porém, fez-se necessário ainda a amplificação dos genes codificando as proteínas SEPT8NGC e SEPT8 α 0GC. Para tanto, foi desenhado um par de *primers* específicos para cada sequência a ser amplificada, utilizando como molde um plasmídeo contendo o cDNA correspondente à SEPT8NGC utilizado nas demais construções (Tabela 1).

Tabela 1 - *Primers* utilizados para as construções referentes à SEPT8. Em negrito estão destacados os sítios de restrição inseridos nos *primers*, de modo a possibilitar a clonagem nos vetores de expressão apropriados.

<i>Primers</i>	Enzimas de Restrição	Sequências 5'-3'
SEPT8NGC_Fw	<i>NdeI</i>	G <u>CATATG</u> GGCTTCAGCTTCAACATCC
SEPT8NGC_Rv	<i>XhoI</i>	CCTCGAG TTAGTTCTTCTTGTCTTGTCTTCCTC AGGGGCTGCTGCGAGG
SEPT8 α 0GC_Fw	<i>NdeI</i>	G <u>CATATG</u> GGTTTCGACAGCCTCCC
SEPT8 α 0GC_Rv	<i>XhoI</i>	CCTCGAG TTAGTTCTTCTTGTCTTGTCTTCCTC AGGGGCTGCTGCGAGG

Fonte: Elaborada pela autora.

Cada reação foi montada como segue:

Taq <i>High Fidelity</i> [5u/uL] (Fermentas)	2 unidades
Tampão [10x] (Fermentas)	5µL
<i>Primer Rv</i> [10mM]	1µL
<i>Primer Fw</i> [10mM]	1µL
DNA molde	30ng
dNTPs [10mM]	1µL
Água	q.s.p.
Volume final	50µL

As reações foram realizadas em um termociclador programado da seguinte forma:

Primeira desnaturação	94°C	5'	1x
Desnaturação	94°C	30"	} 35x
Anelamento	64,5°C	30"	
Extensão	72°C	1'	
Terminação	72°C	7'	1x

A amplificação dos fragmentos de DNA dos genes de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e, a banda correspondente ao produto da amplificação de cada sequência foi isolada para purificação por meio do kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega) de acordo com protocolo cedido pelo fabricante.

3.1.1 Ligação dos produtos de PCR no vetor de clonagem pGEM T-*easy*

Os genes amplificados foram inseridos em vetor de propagação pGEM T – *easy* (Promega) por meio de uma reação de ligação empregando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Cada reação foi preparada utilizando 50ng de produto de PCR e 50ng do vetor em um volume final de 14µL. Em seguida, as reações foram incubadas por 16 horas a 4°C.

O produto da reação de ligação foi usado para transformar, por choque térmico, células competentes por tratamento com cloreto de cálcio da linhagem DH5- α de *E. coli*.

Para a transformação, 50µL de células competentes foram adicionados à todo o volume de cada reação e essa mistura foi então homogeneizada e mantida no gelo por 30 minutos. A seguir, transferiu-se a mistura para o banho-maria a 42°C sendo mantida a essa temperatura por 2 minutos e em seguida retornou-se a mistura para o gelo por mais 2 minutos. Logo após adicionou-se 200µL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) à reação, que em seguida foi mantida sob agitação de 250 rpm a 37°C por 90 minutos.

Após incubação, a suspensão de células foi plaqueada em placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina 0,1mg/mL, X-Gal 0,1mg/mL e IPTG 0,5mM e, em seguida, incubada a 37°C.

Após 16 horas de incubação, observou-se o crescimento de colônias azuis e colônias brancas isoladas na placa. Seis colônias brancas de cada placa foram selecionadas aleatoriamente para confirmação da presença do plasmídeo recombinante, desse modo, montou-se separadamente para o DNA plasmidial de cada colônia isolada, uma reação de análise de restrição partindo de 500ng de DNA, utilizando-se as endonucleases *NdeI* e *XhoI* para verificação da liberação dos insertos. As reações foram mantidas por 4 horas a 37°C e em seguida analisadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Visando verificar a fidelidade das sequências, os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático do DNA no equipamento ABI 3130xl (*Applied Biosystems*). Os *primers* utilizados foram, SP6 (*Reverse*) e T73G (*Foward*), específicos para o vetor de clonagem pGEM T – *easy* (Promega).

3.1.2 Digestão do vetor pGEM T- *easy* para extração dos insertos

Visando recuperar maior quantidade de DNA recombinante para posterior ligação nos vetores de expressão, os clones positivos foram submetidos a reação de digestão em maior escala, partindo de 2µg de DNA recombinante e 1U de cada endonuclease, num volume final de reação de 50µL.

As reações foram mantidas a 37°C por 4 horas e então, o produto da reação foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e as bandas correspondentes aos insertos foram isoladas do gel e purificadas utilizando-se o kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega).

3.1.3 Digestão do vetor de expressão para receber os insertos

Do mesmo modo, 2µg do vetor de expressão pETDuet, já contendo os genes SEPT7NGC ou SEPT7NGc, foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (1U de cada enzima) para assim receber os insertos. As reações foram mantidas a 37°C por 4 horas, e então analisadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. As bandas correspondentes ao vetor linearizado foram isoladas e purificadas por meio do kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega) e quantificadas espectrofotometricamente.

3.1.4 Subclonagem dos fragmentos de DNA codificando SEPT8NGC, SEPT8α0GC em vetor de expressão pETDuet

Uma vez que foram digeridos com as mesmas endonucleases, o vetor linearizado e o inserto apresentavam extremidades coesivas, podendo ser facilmente ligadas na presença da enzima T4 DNA Ligase. Desse modo, a reação de ligação foi preparada obedecendo a razão molar de 3:1 (inserto : vetor).

As reações foram mantidas a 4°C por 16 horas e então, todo o volume de reação (10µL) foi usado para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* da linhagem DH5-α para propagação plasmidial como descrito no item 3.3.2. As células transformadas foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina 0,1mg/mL para seleção dos transformantes positivos.

Cinco colônias foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a análise de restrição para verificação da inserção do gene de interesse utilizando as endonucleases específicas conforme descrito na seção 3.3.3.

3.2 Linhagens de células utilizadas para expressão

A fim de expressar as proteínas heterólogas, o DNA plasmidial dos clones positivos foi usado para transformar, conforme sua compatibilidade, células de expressão competentes por cloreto de cálcio da linhagem Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3) de *E. coli*.

3.2.1 *E. coli* Rosetta (DE3)

Essa linhagem possui um plasmídeo extra, pRARE, que apresenta tRNAs para códons raros podendo levar a um incremento na expressão de proteínas eucariotas. O mesmo plasmídeo confere resistência ao antibiótico cloroanfenicol permitindo assim uma seleção eficiente das células transformantes.

Cerca de 50ng dos plasmídeos recombinantes contendo as construções referentes ao domínio GTPásico da septina 8 e as diferentes versões das septinas 7 e 8, foram usados para transformar células da linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli* por choque térmico conforme descrito no item 3.3.2. Do mesmo modo, os plasmídeos recombinantes pMBPTDuet::SEPT5NGC e pETDuet::SEPT7NGC/SEPT8NGC foram usados para transformar células da mesma linhagem.

3.2.2 *E. coli* BL21 (DE3)

Uma vez que o plasmídeo pACYcDuet (no qual a ORF de SEPT5NGC foi inserida) apresenta resistência à cloroanfenicol, é inviável utilizá-lo para a transformação de células da linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli* já resistentes a esse antibiótico pela presença do pRARE. Desse modo, para a co-expressão das septinas 5, 7 e 8, os plasmídeos recombinantes pACYcDuet::SEPT5NGC e pETDuet::SEPT7NGC/SEPT8NGC foram usados para transformar células de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3), também por choque térmico conforme descrito na seção 3.3.2.

3.3. Descrição das construções

3.3.1 SEPT8G

Para as análises estruturais, foi utilizada uma versão truncada da septina 8 correspondente apenas ao domínio de ligação a GTP (SEPT8G). Tal sequência corresponde aos aminoácidos 42 ao 307 da sequência de referência depositada no *GeneBank* sob o número de acesso NP_055961.1.

O cDNA correspondente a tal região foi subclonado no vetor de expressão pET 28a(+) nos sítios *NdeI* e *XhoI*. Esta construção permitiu a produção da proteína de interesse fusionada

a um sítio de clivagem para trombina e um *tag* de histidina (His-tag), para posterior retirada do *tag*. Tal vetor apresenta gene de resistência para o antibiótico canamicina e foi construído e cedido pela Dra. Joci Neuby A. Macedo. Essa construção foi usada para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem Rosetta (DE3) para expressão.

3.3.2 Co-expressão SEPT7/SEPT8

Com o intuito de analisar a interação entre as septinas 7 e 8, foram utilizadas diferentes versões de tais proteínas.

Para SEPT7 utilizou-se uma construção correspondente à sequência completa (SEPT7NGC) e uma versão truncada (SEPT7NGc), da qual foram subtraídos 57 aminoácidos de sua porção C-terminal, conforme descrito no trabalho de Sirajuddin et al. (73) As construções de SEPT7 usadas nesse trabalho foram feitas com base na sequência depositada no *GeneBank* sob o número de acesso NP_001779 e os detalhes a clonagem estão descritos na Tabela 1.

Para a septina 8 foram utilizadas duas construções, sendo uma delas também referente à sequência completa (SEPT8NGC) e outra versão contendo os domínios G e C completos e apenas uma parte do domínio N-terminal, a qual incluiu a região polibásica (SEPT8 α 0GC). As diferentes construções da septina 8 utilizadas nesse trabalho foram feitas com base na sequência depositada no *GeneBank* sob o número de acesso NP_055961.1 e estão detalhadas na Tabela 1.

As sequências de DNA de interesse foram subclonadas no vetor de expressão bicistrônico, pETDuet (Novagen), de modo que em todas as construções, apenas a SEPT7 estivesse fusionada ao *tag* de histidinas em sua porção N-terminal. Tal vetor de expressão apresenta o gene de resistência à ampicilina, permitindo assim ser usado para transformação de células de expressão da linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli*.

Tabela 2 - Dados das construções utilizadas para co-expressão de SEPT7/SEPT8

Construção	Sequência de Aminoácidos	Plasmídeo de Expressão	Sítios de Restrição Utilizados	Massa Molecular (kDa)	Linhagem de <i>E. coli</i> usada para Expressão
SEPT7NGC (His-tag) +	1 ao 361	pETDuet (Novagen)	<i>BamHI/PstI</i>	44,09	Rosetta (DE3)
SEPT8NGC	1 ao 429		<i>NdeI/XhoI</i>	49,8	
SEPT7NGC (His-tag) +	1 ao 418	pETDuet (Novagen)	<i>BamHI/PstI</i>	50,3	Rosetta (DE3)
SEPT8NGC	1 ao 429		<i>NdeI/XhoI</i>	49,8	
SEPT7NGC (His-tag) +	1 ao 361	pETDuet (Novagen)	<i>BamHI/PstI</i>	44,09	Rosetta (DE3)
SEPT8α0GC	26 ao 429		<i>NdeI/XhoI</i>	47,2	
SEPT7NGC (His-tag) +	1 ao 418	pETDuet (Novagen)	<i>BamHI/PstI</i>	50,3	Rosetta (DE3)
SEPT8α0GC	26 ao 429		<i>NdeI/XhoI</i>	47,2	

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.3 Co-expressão SEPT5/7/8

Com o intuito de verificar a formação de um heterocomplexo por meio da interação entre as septinas humanas SEPT5NGC, SEPT7NGC e SEPT8NGC foram utilizadas duas construções diferentes sendo que ambas apresentavam a sequência codificante completa para as três proteínas.

Para a primeira construção, foram utilizados dois plasmídeos bicistrônicos, sendo eles, pETDuet e pACYcDuet (Novagen). Ambos os plasmídeos apresentam dois sítios múltiplos de clonagem, permitindo assim a co-expressão de até quatro genes. Por apresentarem genes para resistência aos antibióticos cloroanfenicol e ampicilina, os respectivos vetores pACYc Duet e

pETDuet, são compatíveis para co-transformação em células de expressão da linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*.

Para a segunda construção, foram utilizados os vetores bicistrônicos pETDuet e pMBPTDuet que, por apresentarem resistência respectivamente aos antibióticos ampicilina e canamicina, também permitem a co-expressão em células da linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli*. O vetor pMBPTDuet trata-se da modificação do plasmídeo pRSFDuet (Novagen), no qual a sequência codificante da cauda de histidina foi substituída pela sequência codificante da MBP (*Maltose Binding Protein*), seguida pela sequência codificante do sítio de reconhecimento da protease trombina, para a clivagem desse novo *tag*. O plasmídeo pMBPTDuet com a sequência codificante de SEPT5NGC já inserida foi gentilmente cedido pela Dra. Joci Neuby A. Macedo, responsável pela construção do mesmo.

Nessa segunda construção, a presença dois *tags* auxiliando na cromatografia de afinidade permitem que ao final da purificação obtenha-se uma amostra mais equimolar das proteínas no complexo e com menos contaminantes.

3.3.3.1 Construção para purificação do heterocomplexo utilizando apenas His-*tag*

- pACYcDuet::SEPT5NGC

A ORF completa de SEPT5 foi inserida no sítio múltiplo de clonagem do vetor pACYcDuet nos sítios *BglII* e *XhoI*.

- pET Duet::SEPT7NGC/SEPT8NGC

A ORF codificando SEPT7 foi clonada nos sítios *BamHI* e *PstI* do vetor pETDuet e, em seguida, a ORF completa referente à SEPT8NGC foi inserido no mesmo vetor nos sítios *NdeI* e *XhoI*.

Detalhes das construções estão mostrados na Tabela 2.

3.3.3.2 Construção para purificação do heterocomplexo utilizando os *tags* de histidina e MBP

- pMBPTDuet::SEPT5NGC

A ORF codificando SEPT5 foi clonada no vetor pMBPTDuet, para permitir sua expressão.

- pETDuet::SEPT7NGC/SEPT8NGC

O plasmídeo de expressão contendo as sequências referentes às proteínas 7 e 8 foi o mesmo utilizado na primeira construção (item 3.1.3.1).

Detalhes das duas construções utilizadas para a co-expressão das septinas humanas 5, 7 e 8 estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados das construções utilizadas para a co-expressão das septinas humanas 5, 7 e 8

Construção	Plasmídeos de Expressão	Sítios de Restrição	Massa Molecular	Linhagem de <i>E. coli</i> para Expressão
SEPT7NGC-His/	pETDuet	<i>BamHI/PstI</i>	50,3	BL21 (DE3)
SEPT8NGC	+	<i>NdeI/XhoI</i>	49,3	
+	pACYc Duet	<i>BglII/XhoI</i>	43,2	
SEPT5NGC				
SEPT7NGC-His/	pETDuet	<i>BamHI/PstI</i>	50,3	Rosetta (DE3)
SEPT8NGC	+	<i>NdeI/XhoI</i>	49,3	
+	pMBPTDuet	<i>EcoRI/SalI</i>	85,9	
SEPT5NGC-MBP				

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Expressão heteróloga das proteínas recombinantes

O protocolo de expressão seguido para a verificação da expressão das proteínas recombinantes nas diferentes construções foi o mesmo. Para cada proteína ou complexo foi preparado um pré-inóculo, inoculando-se uma colônia isolada de *E. coli* hospedando o plasmídeo de expressão, em meio LB suplementado com os antibióticos de seleção específicos e este foi incubado sob agitação (250 rpm), a 37°C por 16 horas. Cada pré-inóculo foi então diluído na proporção de 1:50 em meio LB, contendo os mesmos agentes de seleção, sendo este incubado sob agitação de 250 rpm a 37°C por aproximadamente 2 horas, ou até que a cultura atingisse uma absorbância em 600nm (D.O._{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Uma vez atingida tal densidade, a cultura foi induzida à expressão por meio da adição de 0,2mM de

IPTG (Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo) e então incubada a 20°C, por 16 horas, sob agitação a 250 rpm.

Após a incubação a 20°C, cada litro de cultura foi centrifugado por 40 minutos a 11000 x g em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado de células (*pellet*) foram adicionados 15mL do tampão de lise (Tabela 4). As células foram armazenadas a -20°C até o momento da purificação. Alíquotas da amostra antes e depois da indução foram coletadas para verificação da expressão em SDS-PAGE 15%.

Tabela 4 - Tampões de lise utilizados para as diferentes construções

SEPT5-			
SEPT8G	SEPT7/SEPT8	SEPT5/SEPT7/SEPT8	MBP/SEPT7/SEPT8
25mM Hepes, pH 7,8,	25mM Tris – pH, pH 7,8,	25mM Tris – HCl, pH 7,8,	25mM Tris – HCl, pH 7,8,
800mM NaCl,	300mM NaCl,	800mM NaCl,	500mM NaCl,
5mM MgCl ₂ ,	5mM MgCl ₂ ,	5mM MgCl ₂ ,	5mM MgCl ₂ ,
12% glicerol e	8% glicerol e	8% glicerol e	5% glicerol e
5mM β - Mercaptoetanol	5mM β - Mercaptoetanol	5mM β -Mercaptoetanol	5mM β -Mercaptoetanol

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Purificação das proteínas recombinantes

As células provenientes de um litro de cultura foram descongeladas, divididas em três alíquotas e então lisadas por sonicação por 8 pulsos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o produto da sonicação foi centrifugado a 11000 x g por 30 minutos a 4°C a fim de separar a fração solúvel (extrato bruto contendo as proteínas solúveis) da fração insolúvel (composta por restos celulares e proteínas insolúveis).

3.5.1 Purificação da proteína SEPT8G

O extrato bruto foi aplicado em coluna de afinidade contendo 2 mL de resina Ni – NTA (Qiagen), previamente equilibrada com 3 volumes do tampão de lavagem (tampão de lise, Tabela 4, acrescido de 2mM de imidazol). O eluato foi coletado e a coluna passou por 3 séries de lavagens sendo que a primeira de 15 volumes do tampão de lise acrescido de 12mM

imidazol. Essa lavagem foi repetida mais uma vez e, por fim, uma terceira lavagem foi feita com o tampão B (25mM Hepes - pH 7,8, 300mM NaCl, 12% Glicerol, 5mM β -mercaptoetanol) acrescido de 12mM de imidazol. A eluição da proteína foi feita com 8 mL do tampão B contendo 500mM imidazol. Após essa etapa de purificação as frações da lavagem e da eluição foram analisadas em SDS-PAGE 15% para avaliar o grau de pureza das amostras.

A amostra contendo a proteína eluída foi concentrada em concentrador *Millipore* de 30kDa até um volume de aproximadamente 1,5mL e, em seguida, foi centrifugada 10 minutos a 15000 x g a 4°C de forma a descartar potenciais agregados proteicos. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/300 GL (*GE Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com tampão 25mM Tris – pH 7,8, contendo 300mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 5% glicerol e 5mM β -mercaptoetanol. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 0,5mL/min., monitorado pela absorbância em 280nm. Frações de 1mL foram coletadas e alíquotas analisadas em SDS-PAGE 15%. As amostras da proteína purificada foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até sua utilização.

3.5.2 Purificação das diferentes construções expressando as septinas 7 e 8

O extrato bruto foi aplicado em coluna de afinidade contendo 2mL de resina de afinidade Talon (*BD Biosciences*), previamente equilibrada com tampão o tampão de lavagem (tampão de lise (Tabela 4) acrescido de 2mM de imidazol).

A seguir, a coluna passou por uma série de 3 lavagens sendo a primeira com 25 volumes de tampão de lise acrescido de 0,1% de Triton X-100; seguida de 25 volumes de tampão de lise adicionado de 5mM de imidazol e, por fim, a terceira lavagem foi realizada com 10 volumes do tampão de lise. A eluição foi feita em alíquotas de 2 mL do tampão de lise com adição de 500mM de imidazol. Alíquotas das lavagens e das eluições foram analisadas em SDS-PAGE 15%. As amostras da proteína purificada foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até sua utilização.

3.5.3 Purificação das proteínas co-expressas SEPT5/7/8

3.5.3.1 Construção utilizando apenas um tag expressa em *E. coli* BL21 (DE3)

O extrato bruto foi aplicado a uma coluna de afinidade contendo 2 mL de resina Talon (*BD Biosciences*) previamente equilibrada com 3 volumes do tampão de lise acrescido de 2mM de imidazol (Tabela 4). Buscando maior rendimento o extrato bruto foi coletado e reaplicado à coluna de afinidade.

Para os passos seguintes de lavagem seguiu-se o mesmo protocolo utilizado para as construções contendo as septinas 7 e 8, como descrito no item 3.5.2.

A eluição foi feita em 5 alíquotas de 10mL do mesmo tampão adicionado de 200mM de imidazol. As frações correspondentes às lavagens e eluições foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

A segunda etapa de purificação foi realizada por meio de cromatografia de exclusão molecular, utilizando a coluna Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com tampão 20mM Hepes, pH 7,8, contendo 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5% glicerol e 5mM Dithiothreitol (DTT). Frações de 250µL foram coletadas sob o fluxo de 0,5mL/min.

As amostras coletadas dentro do pico de interesse foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

3.5.3.2 Construção utilizando dois *tags* expressa em *E. coli* Rosetta (DE3)

O extrato bruto foi aplicado primeiramente em coluna de afinidade contendo 15mL de resina Talon (*BD Biosciences*), previamente equilibrada com 3 volumes do tampão de lise (Tabela 4). Buscando maior rendimento, o extrato bruto eluído foi coletado e reaplicado à coluna de afinidade.

Os passos de lavagem foram realizados aplicando-se 3 volumes de tampão de lise adicionado de 0,1% de Triton X-100 seguido de mais 3 volumes do mesmo tampão. As eluições do complexo foram realizadas utilizando 1 volume do tampão de lise adicionado de 500mM de imidazol, coletando o eluato em 6 frações.

Em seguida, o eluato obtido na etapa anterior foi reunido e aplicado numa coluna de afinidade contendo 15mL de resina de amilose (*Biolabs*). O eluato foi coletado e reaplicado na coluna. Em seguida, foram realizados os passos de lavagem aplicando-se 6 volumes do tampão de lise para a retirada de possíveis contaminantes. A eluição do complexo foi realizada em 10 alíquotas de 10mL utilizando o mesmo tampão adicionado de 15mM de maltose. Amostras das frações de lavagem e eluição das duas cromatografias de afinidade foram analisadas em SDS-PAGE 12%.

As frações do eluato contendo o complexo foram reunidas, quantificadas e incubadas com trombina bovina (*Sigma*) na proporção 1U : 160µg (protease : proteínas recombinantes). As amostras foram incubadas *overnight* na geladeira. Alíquotas das amostras pré e pós-clivagem foram coletadas para posterior análise em SDS-PAGE 12%.

Por fim, a amostra digerida foi concentrada até um volume de 2mL e, em seguida, centrifugada 10 minutos a 15000 x g a 4°C. Como último passo de purificação, a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE *Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado nos passos anteriores, porém sem a adição de glicerol. O fluxo da coluna foi mantido em 0,5mL/min. e monitorado pela absorbância em 280nm. Frações de 1 mL foram coletadas e alíquotas dessas frações foram analisadas em SDS-PAGE 12% para avaliar a pureza e equimolaridade das diferentes proteínas no complexo.

3.6 Espectrometria de massas para confirmação da identidade das proteínas co-purificadas SEPSEPT5/7/8

Amostras contendo as proteínas SEPT5NGC, SEPT7NGC e SEPT8NGC foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 12% para melhor separação das bandas e em seguida, as bandas correspondentes a tais proteínas foram excisadas do gel, fragmentadas em pedaços menores, tratadas para remoção do corante e do SDS e então digeridas com tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade* - Promega). Todos os materiais utilizados na preparação foram previamente tratados com metanol para remoção de qualquer contaminante e, além disso, para a preparação das soluções foram utilizados reagentes com elevado grau de pureza.

Primeiramente foram realizadas lavagens sucessivas para remoção do corante *Comassie Blue* e do SDS, adicionando-se solução contendo 100mM de bicarbonato de amônio e 50% de acetonitrila (ACN). Após ter descorado os fragmentos de gel, foi adicionado ACN 100% para desidratação completa dos fragmentos de gel. O sobrenadante foi descartado e as amostras desidratadas foram submetidas à evaporação para completa remoção da ACN. Em seguida, o gel foi reidratado adicionando-se solução contendo 50mM de bicarbonato de amônio acrescida de 500ng de tripsina e incubado no gelo por 30 minutos. Logo após, foi adicionado bicarbonato de amônio 50mM e então, a digestão foi incubada a 37°C por 16 horas.

Passado o tempo de incubação, a digestão foi interrompida pela adição de solução de ácido fórmico 5% e então, as amostras foram centrifugadas para a coleta do sobrenadante contendo os peptídeos. Em seguida foi adicionada solução contendo 50% ACN e 5% ácido fórmico seguida de nova centrifugação para máxima remoção de peptídeos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e então concentrado até restar volume de aproximadamente 100µL e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e então o sobrenadante foi transferido para outro microtubo.

A análise das amostras foi realizada no espectrômetro de massas micrOTOF QII (Bruker). A análise e a identificação dos peptídeos foram feitas por meio do programa MASCOT com o auxílio do Dr. Edson Crusca.

3.7 Estimativa da massa molecular da proteína SEPT8G

Utilizando os padrões de massa molecular disponíveis no kit *Gel Filtration LMW Calibration* (GE Healthcare Life Sciences) foi realizada a curva de calibração da coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). O kit contém as proteínas Aprotinina (6500 Da), Ribonuclease (13700 Da), Anidrase Carbônica (29 KDa), Ovoalbumina (43 KDa) e Conalbumina (75 KDa), além de *Blue Dextran* 2000 utilizado para determinar o volume de exclusão da coluna. Todos os padrões foram preparados no mesmo tampão utilizado anteriormente na cromatografia de exclusão molecular de SEPT8G, como descrito no item 3.5.1.

Foram realizadas três corridas: uma contendo os padrões de massa molecular; outra contendo a proteína de interesse e a terceira contendo apenas o *Blue Dextran* 2000. Os volumes de eluição foram usados para o cálculo do K_{av} a partir da seguinte equação:

$$K_{av} = V_e - V_0 / V_c - V_0$$

- V_e = volume de eluição de cada proteína;
- V_0 = volume da exclusão;
- V_c = volume de permeação total da coluna.

Os valores obtidos foram usados para construir um gráfico de K_{av} x log da massa molecular.

Vale ressaltar que esta é uma técnica que considera as proteínas em conformação globular. Sabendo que não necessariamente todas as proteínas assumem essa conformação, e ainda, que existem proteínas assimétricas, essa técnica apresenta um erro intrínseco de 10%, para mais ou para menos, no cálculo da massa molecular de uma dada proteína.

3.8 Análise do conteúdo de nucleotídeo e análise da atividade GTPásica de SEPT8G

Buscando verificar a presença e a natureza de nucleotídeos ligados ao domínio GTPásico de SEPT8G, uma amostra foi submetida à análise da liberação de nucleotídeo por meio da desnaturação com ácido perclórico, segundo o método descrito por Seckler et al. (74)

Desse modo, 500µL de amostra contendo 20µM de proteína recém eluída da coluna de afinidade foi incubada com 250µL de HClO₄ 1,5M gelado por 10 minutos no gelo para desnaturação da proteína e consequente liberação de nucleotídeos. Passado o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 13000 x g por 10 minutos a 4°C para separar as proteínas desnaturadas da fração solúvel contendo os possíveis nucleotídeos. Em seguida foram coletados 600µL da fração solúvel e transferidos para outro microtubo onde foram adicionados 100µL de K₂HPO₄ 1M, 100µL de KOH 3M e 80µL de ácido acético 5M para precipitação do sal KClO₄ e neutralização do pH. Uma vez tamponada, a amostra foi mantida a -20°C por 1 hora e então descongelada e centrifugada por 10 minutos à velocidade de 13000 x g a 4°C.

Para o teste de atividade GTPásica, uma amostra contendo 20µM de proteína foi incubada, no gelo, com GTP em excesso seguindo a razão molar de 10:1 (GTP : proteína). Aliquotas de 500µL foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após o início da incubação e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para parar a possível reação de hidrólise do GTP.

De cada amostra, uma alíquota de 200µL foi retirada e aplicada à coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 7,5 x 7,5mm (*Waters*) acoplada a um cromatógrafo *Alliance 2695*, sob o monitoramento do comprimento de onda de 253nm. Foram utilizados como padrão 20µM de GTP e GDP diluídos no mesmo tampão da proteína e submetidos ao mesmo tratamento de desnaturação com ácido perclórico. Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão A (Tris-HCl 25mM, pH 8) e tampão B (Tris-HCl 25mM, pH 8, acrescido de 1M de NaCl). As condições do gradiente de NaCl estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica

Tempo (minutos)	% Tampão A	%Tampão B
0	90	10
1	90	10
10	55	45
11	0	100
14	0	100
15	90	10
17	90	10

Fonte: Elaborada pela autora.

3.9 Análises estruturais de SEPT8G

3.9.1 Dicroísmo Circular

3.9.1.1 Comportamento de SEPT8G frente a adição de nucleotídeos e magnésio

A fim de investigar a estrutura secundária de SEPT8G, análises de CD convencional foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco modelo J – 815 *CD Spectrometer* (Tóquio, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura (*Peltier*), em uma cubeta de quartzo retangular de 1 mm de caminho óptico, utilizando alíquotas de 5µM de SEPT8G a 25°C.

Para observar a influência dos nucleotídeos GTP e GDP na estrutura secundária de SEPT8G, a proteína foi incubada com GTP ou GDP na proporção de 1:5 (proteína : nucleotídeo), em 10mM de fosfato de sódio – pH 7,8, contendo 100mM de NaCl e 5% de glicerol, na presença e na ausência de 5mM de cloreto de magnésio. Os espectros foram coletados na faixa de 190 a 280nm, em intervalos de 1 nm, num total de 3 acumulações, e posteriormente comparados ao espectro de SEPT8G apo. Espectros de CD do tampão com e sem cloreto de magnésio, GTP e GDP foram subtraídos dos espectros originais da proteína. A média das acumulações, subtração da linha de base e alisamento com o filtro de Savitzky-Golay foi realizado com o *software CDTool*. (75)

Os espectros finais foram analisados utilizando o pacote de desconvolução CDPRO (76) com os programas Selcon3, Contill e CDSSTR (77 – 79) para estimar o conteúdo de estrutura secundária de SEPT8G em cada uma destas condições.

3.9.1.2 Estabilidade térmica de SEPT8G

A fim de verificar o efeito da temperatura sobre o desenovelamento de SEPT8G, amostras nas mesmas condições do experimento anterior foram submetidas a um gradiente de temperatura de 10°C a 85°C, com incrementos de 5°C e equilíbrio de 5 minutos antes de cada medida. Após atingir a temperatura de 85°C, para verificar se o processo era reversível, a amostra foi novamente resfriada à temperatura inicial e então, seu espectro de CD foi medido. Para a construção das curvas de desnaturação o mínimo situado em $\theta = 222\text{nm}$ foi monitorado e as curvas foram expressas em termos de fração de proteína desnaturada (f_D), de acordo com a seguinte equação:

$$f_D = \frac{\theta_{\text{obs}} - \theta_0}{\theta - \theta_0}$$

em que:

- θ_{obs} = valor da elipsidade medida ao longo da variação
- θ = valor da elipsidade em 85°C
- θ_0 = valor da elipsidade em 15°C

3.9.2 Emissão de fluorescência intrínseca

Para verificar se o íon magnésio, bem como os nucleotídeos GDP e GTP interagem com a SEPT8G levando a alguma mudança na conformação de sua estrutura terciária, empregou-se o uso desta técnica que permite, através do monitoramento da emissão de fluorescência do aminoácido triptofano (W), a análise local da região em torno desse resíduo.

Para tanto, as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro, modelo ISS – K2 (ISS, IL, USA) em cubetas retangulares de quartzo com amostras contendo 5 μM de SEPT8G, a 25°C e variando as mesmas condições descritas no item 3.9.1.1. As amostras foram excitadas em 295nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 310nm a 450nm.

3.9.3 Emissão de fluorescência extrínseca

Os experimentos foram realizados seguindo as mesmas condições do experimento anterior, porém utilizando um polarizador na emissão. As medidas foram realizadas em

cubetas retangulares de quartzo utilizando 250 μ M de ANS e 5 μ M de SEPT8G, novamente variando as condições descritas no item 3.9.1.1. As amostras foram excitadas em 360nm e a emissão foi monitorada no intervalo entre 450 e 650nm.

3.9.4 Seleção de tampões para ensaios de cristalização de SEPT8G

Visando identificar uma condição em que a proteína estivesse solúvel, homogênea e monodispersa, empregou-se o uso do DLS (*Dynamic Light Scattering*). Esta ferramenta permite avaliar a estabilidade da proteína frente a diferentes parâmetros, nesse caso o pH, fazendo-se importante na triagem de solventes suscetíveis ou não a conduzir a formação de cristais. Nesse sentido, 15 condições foram testadas (Tabela 6).

Para as medidas, alíquotas de SEPT8G a 13mg/mL foram diluídas nos diferentes tampões seguindo a proporção de 10:1 (tampão : SEPT8G) e então incubadas por 3 horas na geladeira. Em seguida as amostras, previamente centrifugadas, foram aplicadas em uma cubeta de 2 μ L e as medidas foram realizadas no equipamento *Zetasizer Nano Series* (Zetasizer μ V) da Malvern.

Tabela 6 - Tampões utilizados no *screening* de solubilidade

Tampões (100mM)	pHs
Glicina	3
Ácido Cítrico	3,25
Ácido Cítrico	4
Acetato de Sódio	4,5
Fosfato de Sódio	5
Citrato de Sódio	5,5
Fosfato de Sódio	6
MES	6,2
Fosfato de Sódio	7
Tris	7,5
Imidazol	7,9
Tris	8,5
Glicina	9

Fonte: Elaborada pela autora.

3.10 Ensaios de cristalização de SEPT8G

Visando a obtenção de cristais para difração de raios-X e consequente resolução da estrutura de SEPT8G, foram realizados ensaios de cristalização de forma automatizada por meio do robô *Honeybee 931* (*Genomic Solutions Inc*), com placas de 96 poços, utilizando a técnica de difusão de vapor por gota depositada. Cada poço permite o uso de três amostras diferentes, acelerando o *screening* pela melhor condição para formação do cristal.

Os experimentos foram realizados a 18°C, utilizando-se diferentes concentrações da proteína, variando de 2mg/mL a 8mg/mL, em três diferentes condições, sendo elas SEPT8G na forma apo e SEPT8G com adição de 1mM de GTP ou GDP. O tampão utilizado continha Tris 25mM, NaCl 300mM, MgCl₂ 5mM, 5% glicerol e 5mM β-mercaptoetanol. Foram testadas as condições fornecidas pelos *kits* Classic II suíte, PEG II suíte, da *Qiagen*, Index HT, proveniente da *Hampton Research* e o *kit* Morpheus adquirido da *MRC Laboratory of Molecular Biology*.

Todos os experimentos de cristalização foram realizados em colaboração com o Dr. Humberto D'Muniz Pereira do grupo de Cristalografia de Proteínas do IFSC.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem e subclonagem das sequências SEPT8 α 0GC e SEPT8NGC

Como esperado, os produtos das amplificações dos genes SEPT8 α 0GC e SEPT8NGC apresentaram tamanhos de aproximadamente 1,2 kb indicando que a amplificação de tais sequências foi realizada com sucesso (Figura 9A).

Os produtos foram clonados em plasmídeo de propagação pGEM T – *easy* e, em seguida, os genes foram subclonados no vetor de expressão pETDuet já contendo a sequência codificante de SEPT7NGc ou SEPT7NGC, tendo essas a sequência codificante de His-*tag* no N-terminal. Os clones transformantes foram submetidos à análise de restrição usando as endonucleases *NdeI* e *XhoI* para confirmação da presença do inserto (Figura 9B).

Figura 9 - Análise dos produtos de amplificação para as diferentes construções de SEPT8 e do padrão de restrição dos clones contendo as septinas 7 e 8. A) Confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA correspondente a SEPT8GC α 0 (a) e SEPT8NGC (b); B) Em a. e c. e em b. e d. estão documentados o padrão de restrição dos clones de SEPT8 α 0GC e SEPT8NGC respectivamente. M corresponde ao padrão de massas moleculares em pares de base.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas foi realizada a 20°C por aproximadamente 16 horas após a indução pela adição de 0,2mM de IPTG. A confirmação da expressão, bem como a solubilidade dos produtos expressos foram verificadas por SDS-PAGE (Figura 10).

Figura 10 - Análise da expressão de SEPT8G e co-expressão das diferentes construções contendo SEPT7 e 8 e SEPT5, 7 e 8. Amostras correspondentes às proteínas totais. Na figura, as siglas *ni* indicam a fração da cultura não induzida, *i* indica a fração após a indução e *M* indica o marcador de peso molecular em kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 SEPT8G

4.2.1.1 Estimativa da massa molecular de SEPT8G

O volume de eluição verificado na cromatografia de exclusão molecular apresentou um pico bem definido, com seu máximo sugerindo massa de aproximadamente 50 kDa (Figura 11A), o que corresponderia a SEPT8G dimérica. Para confirmação desta hipótese, a coluna Superdex 75 foi calibrada com cinco proteínas globulares de massas moleculares conhecidas que foram preparadas em solução tampão idêntica a da proteína SEPT8G. Os volumes de eluição obtidos foram utilizados para montar uma curva de calibração que permite calcular a massa molecular aparente de SEPT8G a partir dos perfis cromatográficos. O resultado apontou para uma massa molecular de 55,7 kDa (Figura 11B), o que equivale a uma massa 69% maior quando comparada a massa molecular calculada para um monômero a partir de sua estrutura primária, que apresenta 32,9 kDa.

O resultado obtido é compatível com a massa de um dímero e traz à tona o conceito de promiscuidade no qual, na ausência de seus parceiros proteicos preferenciais, as septinas podem realizar interações promíscuas a despeito do padrão de interação. (26, 49) Esse fato foi observado para muitas das septinas humanas quando expressas isoladamente, como para a SEPT2 por exemplo. (65)

Figura 11 - Cromatografia de Exclusão Molecular de SEPT8G. A) Perfil cromatográfico de SEPT8G em coluna Superdex 75. B) Regressão linear utilizando como parâmetro as massas já conhecidas das proteínas globulares Aprotinina (6,5 KDa), Ribonuclease (13,7 KDa), Anidrase Carbônica (29 KDa), Ovalbumina (43 KDa) e Conalbumina (75 KDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1.2 Conteúdo de nucleotídeo e atividade GTPásica

Com o intuito de avaliar se SEPT8G encontra-se ligada a algum nucleotídeo, empregou-se o método baseado na liberação do nucleotídeo por desnaturação química com ácido perclórico, como descrito no item 3.7 na seção de Metodologia.

Como pode-se observar no cromatograma da Figura 12, SEPT8G não apresenta-se ligada a nenhum nucleotídeo. Na mesma figura estão apresentados o perfil de eluição dos nucleotídeos GTP e GDP, através do monitoramento da absorbância sob o comprimento de onda 253nm. Uma amostra do tampão sem a adição de nucleotídeos foi utilizada como controle.

Figura 12 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo de SEPT8G

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação da atividade GTPásica de SEPT8G foi conduzida seguindo o mesmo protocolo de desnaturação, após a amostra ter sido incubada com excesso de GTP. A partir disso, a capacidade de hidrolisar o nucleotídeo pôde ser avaliada também por cromatografia de troca iônica (Figura 13), a qual mostrou ausência de hidrólise do GTP.

Figura 13 - Teste de atividade GTPásica

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora tenha sido relatado que a septina 8 apresenta baixa taxa de hidrólise do GTP (80), os resultados, nas condições em que o ensaio foi realizado, apontam para a ausência de atividade GTPásica (Figura 13). Tal resultado é esperado, tendo em vista dados na literatura de ausência de atividade GTPásica em septinas humanas do grupo II (49), do qual SEPT8 faz parte. Além disso, verificou-se que em *S. cerevisiae* as septinas Cdc3 e Cdc11 também não são capazes de hidrolisar GTP. (81) E ainda, recentemente, observou-se que *SmSEPT10*, uma septina de *S. mansoni* ortóloga à septina humana 10, que por sua vez também pertence ao grupo II, não apresenta atividade hidrolítica de GTP detectável. (59, 60) Sendo assim, sabendo que a septina 8 pertence ao grupo II e, baseado nos resultados obtidos nesse trabalho, a ausência de atividade GTPásica de SEPT8G deve ser uma condição intrínseca da proteína.

4.2.1.3 Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD de SEPT8G exibe um perfil de proteína ordenada (Figura 14), apresentando mínimos negativos em 222nm e 208nm, que são típicos de proteínas que contêm elementos de estrutura secundária do tipo α -hélice. (82)

A adição de íons magnésio e/ou dos nucleotídeos GDP ou GTP em SEPT8G não alterou o seu espectro de CD (dados não mostrados), o que sugere a preservação do conteúdo de estruturas secundárias na presença desses compostos.

Figura 14 - Espectro de CD de SEPT8G a 25°C. Os espectros foram obtidos com amostras contendo 5 μ M de SEPT8G em solução tampão 10mM de fosfato de sódio – pH 7,8, contendo 100mM de NaCl e 5% de glicerol com e sem a adição de 5mM de cloreto de magnésio, GTP e GDP.

Fonte: Elaborada pela autora.

A desconvolução dos espectros para estimar o conteúdo de estruturas secundárias presentes no arranjo global de SEPT8G foi realizada por meio do pacote de programas CDPro (76), que contém os programas Selcon3, Continll e CDSSTR. A média dos valores dos três programas indicou que o espectro de CD de SEPT8G corresponde a um conteúdo de 50% de α -hélice, 6% de folhas- β e 43% de outras estruturas.

Os dados observados por meio da desconvolução, juntamente com os espectros obtidos experimentalmente para SEPT8G nas diferentes condições, estão de acordo com os resultados já relatados para SEPT2, SEPT3 e SEPT4 (68, 83, 84), nos quais observou-se um perfil de estrutura secundária com predominância de estruturas do tipo α -hélice.

A reversibilidade do processo de desenovelamento térmico de SEPT8G também foi analisada por dicroísmo circular. No entanto, em nenhuma das condições experimentais a que a proteína recombinante foi submetida observou-se a recuperação do conteúdo de estrutura secundária, indicando a irreversibilidade do processo.

Experimentos de estabilidade térmica de SEPT8G para avaliar a influência dos nucleotídeos GDP e GTP, bem como do íon magnésio, foram também realizados. A figura 15 apresenta as curvas de transição, indicando as temperaturas nas quais SEPT8G na presença ou não dos nucleotídeos GDP, GTP e magnésio começam a perder sua estrutura secundária.

Pode-se observar que a adição de nucleotídeos, seja GTP ou GDP, não interferiu na estabilidade de SEPT8G, uma vez que o T_m apresentado em ambas condições gira em torno do mesmo valor médio observado para a proteína na forma apo, sendo este de 44°C. No entanto, na presença do íon magnésio, independente da presença de nucleotídeos, o T_m apresenta uma queda para 39°C (Figura 15), o que implica em diminuição da estabilidade térmica nesta condição.

Foi relatado que a ausência do resíduo conservado de treonina na posição 78 (Thr - 78) compromete a coordenação do magnésio para a hidrólise do GTP. (46) Sendo assim, seria possível pensar que a diminuição da estabilidade térmica na presença de magnésio poderia estar relacionada à coordenação do íon. A mesma interferência do magnésio na estabilidade foi observada ainda nas septinas humanas 3 e 9 (comunicação pessoal), porém tais septinas são membros do grupo I, no qual não há tal deficiência na coordenação do magnésio, enfraquecendo a hipótese levantada. De qualquer forma, esses resultados mostram que o íon magnésio interfere de alguma forma na estabilidade térmica das septinas, abrindo espaço para uma nova linha de investigação buscando elucidar tal influência.

Figura 15 - Curvas de desnaturação térmica de SEPT8G. As curvas foram feitas a partir da variação no valor da elipicidade em 208nm, expressa em termos de fração de proteína desnaturada em função da temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1.4 Emissão de fluorescência

As medidas de emissão de fluorescência do triptofano apresentaram para todas as condições testadas um mesmo perfil espectral, com máximos de emissão em 330nm indicando que o único triptofano da sequência de SEPT8G encontra-se enterrado na estrutura terciária, a assim protegido de interações com o solvente. (85)

Tendo como parâmetro a proteína em sua forma apo, nota-se que nas demais condições ensaiadas houve supressão da fluorescência do triptofano. Tal supressão mostrou-se mais acentuada nas amostras com a adição dos nucleotídeos, indicando que o ambiente em torno do triptofano encontra-se de alguma forma sob influência de tais moléculas (Figura 16).

Figura 16 - Espectros de fluorescência de SEPT8G na presença e ausência de magnésio a 25°C. Em todas as condições testadas os espectros apresentaram máximo de emissão em 330nm indicando que o único triptofano encontra-se internalizado na estrutura da proteína, estando assim protegido de interações com o solvente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Buscando investigar como se dá a influência destas moléculas na estrutura terciária de SEPT8G, uma nova abordagem foi empregada utilizando a sonda extrínseca ANS. Tal composto, por ligar-se à regiões hidrofóbicas, permite detectar a acessibilidade do solvente às superfícies hidrofóbicas da proteína, por meio do monitoramento da exposição destas regiões. (86)

Como resultado, pode-se observar um deslocamento do máximo de emissão e aumento da intensidade na fluorescência do ANS, indicando que ele interage com a SEPT8G em todas as condições ensaiadas, mas principalmente na forma apo. Isso mostra que tal forma apresenta relativamente mais regiões hidrofóbicas expostas ao solvente.

Para as amostras de SEPT8G em que foram adicionados nucleotídeos e/ou magnésio observou-se diminuição na intensidade de emissão do ANS em relação a forma apo, porém não foi possível fazer uma relação direta como tipo de ligante. Para amostras contendo GDP mais magnésio tal supressão foi ainda mais intensa, indicando que as regiões hidrofóbicas estão mais internalizadas na estrutura terciária de SEPT8G nesta condição (Figura 17).

Embora não haja uma correlação clara entre os resultados de emissão de fluorescência intrínseca e extrínseca, ambos mostram que a estrutura terciária de SEPT8G é influenciada, de alguma maneira, pela presença dos nucleotídeos e de Mg^{2+} .

Figura 17 - Espectros de fluorescência extrínseca utilizando como sonda o ANS a 25°C

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando que a estabilidade térmica monitorada por CD indicou que o íon magnésio influi negativamente na estabilidade, seria interessante realizar tal monitoramento também por emissão de fluorescência. Isto, porém, não foi possível devido a problemas de precipitação da proteína durante o experimento.

4.2.1.5 Seleção de tampões para ensaios de cristalização

Dados na literatura mostram que amostras monodispersas, ou seja, que apresentam um único estado oligomérico, apresentam índice de polidispersividade menor que 20% (87) e devido a tal homogeneidade têm-se o favorecimento no crescimento de cristais. (88) Diante disso, antes da realização dos ensaios cristalográficos realizou-se um *screening* de tampões a fim de identificar uma condição em que a proteína se encontrasse estável e monodispersa.

Dentre as diferentes condições de pH testadas, apenas duas mostraram-se promissoras, como segue (Tabela 7):

Tabela 7 - Dados do espalhamento de luz de SEPT8G

Tampões (100mM)	Raio Hidrodinâmico	Massa Molecular (kDa)	Massa	Índice de Polidispersividade
Tris – pH 7,5	21.19±11.44	27,2±5,1	100%	17,1%
Tris – pH 7,8	3.529±1.904	64,3±34,7	98,8%	9%

Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo visto que SEPT8G mostrou-se mais estável na condição do tampão que já estava sendo usado anteriormente, avaliada pelo baixo índice de polidispersividade e raio hidrodinâmico, seguimos para os ensaios de cristalização com o tampão Tris – pH 7,8, em diferentes concentrações de proteína (2mg/mL, 4mg/mL e 8mg/mL).

4.2.1.6 Ensaios de cristalização

Após 24 horas de incubação a 18°C, as caixinhas contendo SEPT8G nas diferentes condições de cristalização foram analisadas. Dois cristais foram observados na condição A-10 do kit PEG II (*Qiagen*) que continha 100mM MgCl₂, 100mM MES – pH 6,5 e 30% (m/v) PEG 400. Foi realizado então um refinamento dessa condição variando o pH e a concentração de PEG 400, porém não foi observada a formação de nenhum cristal.

Os dois cristais iniciais foram então congelados em nitrogênio líquido e submetidos à coleta de dados por meio da difração de raios-X no Síncrotron Diamond (UK) pelo Dr. Humberto M. Pereira, porém o padrão de difração era condizente com cristais de sal. Novas condições de cristalização podem ser testadas, além de novas construções do domínio GTPase, as quais poderão produzir uma proteína mais adequada à cristalização.

4.2.2 Co-Expressão e co-purificação do complexo SEPT7/SEPT8

A co-expressão das septinas 7 e 8 foi observada em todas as construções testadas, como apresentado anteriormente na Figura 10. No entanto, se observa claramente que a interação entre essas proteínas, e consequente co-purificação através do His-tag, foi dependente da presença do C-terminal completo na septina 7 (Figura 18).

Figura 18 - Análise da co-purificação comparando as diferentes construções contendo as septinas 7 e 8. Nas imagens, as letras *a* representam SEPT8NGC; *b* representam SEPT7NGC; *c* correspondem a SEPT7NGC; *d* corresponde a SEPT7 degradada e *e* representa SEPT8α0GC.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas construções em que a septina 7 encontra-se truncada no C-terminal (SEPT7NGC), nota-se que quase não há recuperação da septina 8, indicando que a interação entre tais proteínas foi prejudicada.

Sabe-se que na porção C-terminal dessas proteínas é predita a existência de regiões que adotam a conformação de *coiled-coil* (26, 38, 84) e muito tem-se especulado sobre envolvimento dessas estruturas em interações entre septinas ou ainda no reconhecimento de parceiros preferenciais. (54, 89 – 91)

Na estrutura obtida do hexâmero formado pelas septinas humanas 2/6/7, a proximidade entre as regiões C-terminais de SEPT6 e SEPT7 sugere que tais domínios interagem via *coiled-coil*, o que também seria responsável pela estabilização dessa interface. Adicionalmente, uma série de evidências indicam que SEPT6 e SEPT7 interagem através do C-terminal formando heterodímeros. (54) Dados de Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência (FRET) também confirmam que a interação entre as septinas humanas 6 e 7 ocorre por meio do pareamento de suas regiões *coiled-coil*. (91) Além disso, a mesma técnica apontou que as septinas UNC-59 e UNC-61 de *C. elegans* também tem a interação influenciada por seus *coiled-coil*. (58)

Desse modo, o fato da SEPT8 não ter sido co-purificada de forma equimolar à SEPT7NGc (SEPT7 com C-terminal parcial) é um forte indicativo da participação dessa região, composta por estruturas do tipo *coiled-coil*, na formação e possível estabilização das interações septina-septina no caso das septinas 7 e 8. Mais estudos ainda necessitam ser realizados para avaliações mais detalhadas destes dados, particularmente suprimindo o C-terminal da SEPT8 e mantendo-o na SEPT7 para uma contra-prova e validação desse resultado.

4.2.3 Expressão, purificação e identificação do complexo SEPT5/SEPT7/SEPT8

Na construção utilizada na expressão em células da linhagem BL21(DE3), apenas a septina 7 era expressa fusionada à um His-tag. Desse modo a recuperação das três proteínas após a cromatografia de afinidade seria um forte indicativo de interação na forma de um heterocomplexo.

Análises em SDS-PAGE pós cromatografia de afinidade apresentaram 4 bandas com massas moleculares equivalentes às esperadas para as septinas 5, 7, 8, bem como para uma banda de degradação de SEPT7 (Figura 19). Essa banda já havia sido consistentemente observada para o complexo 2/6/7 (73), bem como em outros complexos produzidos em nosso grupo contendo a SEPT7.

Figura 19 - Análise da co-purificação das septinas humanas 5/7/8 utilizando apenas um *tag*. Na imagem, M indica o marcador de massas moleculares; 1 corresponde à fração insolúvel da proteínas totais e 2 à fração solúvel; 3 – 5 correspondem às lavagens (material não ligado); 6 corresponde à fração eluída da afinidade, contendo as proteínas de interesse co-purificadas pelo His-*tag*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a cromatografia de afinidade, empregou-se a cromatografia de exclusão molecular, conforme descrito no item 3.5.3.1, permitindo assim tanto a retirada de contaminantes da amostra como a análise da massa desse complexo.

Mesmo após diversas repetições, o perfil cromatográfico apontava sempre para uma amostra alta massa, composta provavelmente por agregados proteicos, caracterizada pela banda de eluição no volume correspondente ao *void* da coluna (Figura 20A). As amostras coletadas referentes ao pico de absorbância foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 12%. De fato, tais amostras tratavam-se das proteínas do complexo que não foram incluídas na coluna cromatográfica (Figura 20B).

Ainda assim, tais amostras foram analisadas por espectrometria de massas, para a confirmação da identidade das proteínas. Para tanto, analisou-se, a partir de SDS-PAGE, qual fração da eluição apresentava as bandas das septinas de forma mais equimolar e essa amostra foi então submetida ao tratamento com tripsina, conforme descrito no item 3.6, para posterior análise.

Figura 20 - Análise do cromatograma do complexo das septinas humanas 5/7/8 expresso utilizando apenas o *tag* de histidina. A) Perfil cromatográfico do heterocomplexo na coluna Superdex 200 indicando que a amostra apresentava-se na forma de um agregado proteico, já que foi eluído no volume morto da coluna (*void*). B) Frações pós cromatografia de exclusão molecular utilizadas para análise de espectrometria de massas. Na figura estão apresentadas as frações correspondentes às amostras eluídas em 8,25mL (a) e 8,5mL (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

Por estarem muito próximas, as bandas correspondentes às septinas 7 e 8 não puderam ser separadas e, por isso foram tratadas juntas para posterior tripsinização, enquanto a banda correspondente à SEPT5 foi tratada e tripsinizada isoladamente.

Para a análise dos espectros de fragmentação foi utilizado o programa MASCOT que cruza os dados obtidos no experimento com bancos de dados disponíveis na *internet*. Desse modo, foi identificada para o primeiro *pool* de peptídeos a proteína sob o código gi|9945439, que corresponde à SEPT5. Para o segundo *pool* foram identificadas as proteínas depositadas sob os códigos gi|62739409 e gi|45645200 que correspondem à SEPT7 e SEPT8, respectivamente. Os peptídeos identificados apresentaram alto *score* confirmando assim a presença das 3 septinas no complexo co-purificado (Figura 21).

Figura 21 - Identificação das septinas por Espectrometria de Massas. A) Identificação dos peptídeos de SEPT5; B) Identificação dos peptídeos de SEPT7; C) Identificação dos peptídeos de SEPT8.

A.	Match to: gi 9945439 Score: 426 septin 5 [Homo sapiens] Found in search of mascot - sept5_1_01_54.mgf	Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 29%
		Matched peptides shown in Bold Red
		<pre> 1 MSTGLRYKSK LATPEDKQDI DKQYVGFATL PNQVHRKSVK KGFDFTLMAV 51 GESGLGSTL VHSFLFLDLY KDRKLLSABE RISQTVELK HTVDIEEKGV 101 KLKLTIVDTP GFGDAVNTE CWKPTIDYVD QQFQYFRDE SGLNRKNIQD 151 NRVHCCLYFI SPFGHGLRPV DVGFMKALHE KVNIVPLIAK ADCLVPSEIR 201 KLKERIREEI DKFGIHVYQF PECDSDEDED FKQDRELKE SAPFAVIGSN 251 TVVEAKGQRGV RGRLYPWGIV EVENQAHCDF VKLNLMLRT HMHDLKDVTC 301 DVHYENYRAH CIQMTSKLT QDSRMESPIP ILPLPTDAE TEKLIIRMKDE 351 ELRMQEMLQ RHKQMQDQ </pre>
B.	Match to: gi 62739409 Score: 697 SEPT7 protein [Homo sapiens] Found in search of mascot - sept7-8 1 01 55.mgf	Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 39%
		Matched peptides shown in Bold Red
		<pre> 1 MAATDLERFS NAEPEPRSLS LGGHVGFDSL PDQLVSKSVT QGFSPNLCV 51 GETGIGKSTL MNTLNTTTE TEEASHHEAC VRLRQTYDL QESNVQLKLT 101 IVDAVGFGDQ INKDESYRPI VDYIDAQFEN YLQELKIRR SLFDYHDTRI 151 HVCLYFITPT GHSLSLDLV TMKLDSKVN IPIIAKADT ISKSELHKFK 201 IKIMGELVSN GVQIYQFPTD DEAVAEINAV MNAHLFFAVV GSTEEVKVGN 251 KLVRARQYFW GVQVENENH CDFVKLREML IRVNMEDLRE QTHSRHYELY 301 RRCKLEEMGF QDSGDGSPFP SLQETYEAKR KEFLSELQRK EEEMRQMEVN 351 KVKETELELK EKERELHEKF EHLKRVHQEE KRKVEEKRRR LEETNAFNR 401 RKAVEALQS QALHATSQQP LAKDKDKKNR SDIGAHQPGM SLSSSKVMNT 451 KASVEPLNCS SWNPATQCCS CLVRDATWRE GFL </pre>
C.	Match to: gi 45645200 Score: 756 Septin-8 Found in search of mascot - sept7-8 1 01 55.mgf	Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 36%
		Matched peptides shown in Bold Red
		<pre> 1 ARSAAAEERS VNSSTMVAQQ KNLEGYVGFA NLPNQVYRKS VKRGFEFTLM 51 VVGESGLGKS TLINSLFLTD LYSPEYPGPS HRIKKTQVVR QSKVLIKEGG 101 VQLLLTIVDT PGFGDAVDNS NCWQPVIDYI DSKFEDYLNA ESRVNRQMP 151 DNRVQCCLYF IAPSGHGLKP LDIEFMKRLH EKVNIIPLIA KADTLTPEEC 201 QQFKKQIMKE IQBHKIKIYE FPETDDEEN KLVKKIKDRI PLAVVGSNTI 251 IEVNGKRVRG RQYPWGVAEV ENGEHCDFTI LRNLIRITHM QDLKDVNTNV 301 HYENYRSRKL AAVTYNGVDN NKNKGQLTKS PLAQMEEERR EHVAKMKKME 351 MEMEQVFEMK VKEKVQKLKD SEAELQRHE QMKKNLEAQH KELEEKRRQF 401 EDEKANWEAQ QRILEQQNSS RILEKNKKRG KIF </pre>

Fonte: Elaborada pela autora.

A identificação das septinas 5, 7 e 8 no heterocomplexo purificado corrobora a idéia proposta por Kinoshita que dita que septinas de um mesmo grupo poderiam substituir suas parceiras no clássico complexo formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7. (26, 54, 66) No complexo identificado, SEPT5 substituiria SEPT2 e SEPT8 substituiria SEPT6, enquanto que por ser única em seu grupo, SEPT7 seria mantida, formando assim o heterocomplexo SEPT5-SEPT8-SEPT7. Além disso, a presença de tais proteínas interagindo entre si nesse heterocomplexo confirma os resultados obtidos nos experimentos de duplo-híbrido apresentados por Nakahira et al. (68)

Uma vez confirmada a interação das septinas em questão, um novo sistema de expressão foi construído a fim de realizar a expressão das mesmas proteínas em células da linhagem Rosetta (DE3) e também melhorar a purificação. A purificação das proteínas co-expressas nessa construção contou com duas etapas de cromatografia de afinidade, de modo a se obter uma amostra mais pura e equimolar, no que diz respeito à quantidade de cada uma das proteínas nesse heterocomplexo. Sendo assim, a primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao cobalto e a segunda por cromatografia de afinidade à amilose.

Ao final de cada etapa de purificação por afinidade os produtos finais foram analisados em SDS-PAGE, observando-se a presença de 4 bandas, reafirmando a interação de tais proteínas (Figura 22). As frações contendo as proteínas do complexo foram então quantificadas e foi adicionada a protease trombina na proporção de 1 unidade de enzima para cada 160µg de proteína. As amostras foram incubadas *overnight* na geladeira e então, novamente analisadas em SDS-PAGE 12% para a confirmação da digestão. A digestão pode ser confirmada pela presença de uma banda visualizada no gel de aproximadamente 42KDa correspondente à SEPT5 e à MBP já separadas pela protease (Figura 22C).

Figura 22 - Análise da co-purificação das septinas que compõem o complexo 5/7/8 utilizando dois *tags*. A) Cromatografia de afinidade ao cobalto. Frações das eluições com imidazol; B) Cromatografia de afinidade à amilose. Frações das eluições utilizando maltose; C) Frações pré (a) e pós (b) clivagem com trombina para a retirada do *tag* de maltose.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que, ao final da primeira etapa cromatográfica, por estar fusionada ao His-*tag*, a septina 7 encontra-se em excesso no heterocomplexo co-purificado. Tal inconveniente é

contornado ao final da segunda etapa de purificação, em coluna de afinidade à amilose, da qual as proteínas co-purificadas são eluídas aproximadamente na mesma proporção.

Com o objetivo de excluir contaminantes e ainda analisar se o heterocomplexo encontrava-se em solução (não agregado), a amostra incubada com a trombina para a retirada da *tag* MBP foi submetida a um último passo de purificação por meio da cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico obtido desta etapa está apresentado na Figura 23A. Nesta, pode-se distinguir 3 picos, sendo o primeiro (I) correspondente à fração contendo agregados proteicos, uma vez que foram eluídos no volume morto da coluna (*void*). O segundo pico (II) corresponde ao heterocomplexo, que quando analisado em SDS-PAGE (Fig. 24 B) observa-se 4 bandas com massas moleculares de tamanhos compatíveis com SEPT5 (43,2 kDa), SEPT7(50,3 kDa), SEPT7 degradada (41,6 kDa) e SEPT8 (49,8 kDa). O terceiro pico (III) é correspondente à MBP (42,7 kDa) proveniente da clivagem. O SDS-PAGE contendo as frações dos picos II e III é mostrado na figura 23B:

Figura 23 - Análise do perfil cromatográfico das septinas 5/7/8 expressas na linhagem *E. coli* Rosetta (DE3). A) Perfil cromatográfico do heterocomplexo em coluna Superdex 200 indicando os picos referentes ao *void* (I), às eluições do heterocomplexo (II) e da MBP (III). B) Análise das frações eluídas nos picos II e III. SDS-PAGE das frações de 8mL (a), 9mL (b), 10mL (c) e 11mL (d) todas contendo o as septinas que formam o heterocomplexo e, em e a fração eluída em 17mL (pico III) correspondente à MBP após a clivagem com trombina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora o volume de eluição do heterocomplexo, bem como o volume de exclusão molecular da Superdex 200 (dado pela eluição do *Blue Dextran*), sejam conhecidos, a estimativa da massa molecular por meio do cálculo da regressão linear não é adequada. Isso porque, além do erro intrínseco deste cálculo, espera-se que o heterocomplexo assumira uma

conformação alongada (filamento), o que levaria a uma migração muito diferente da que se observa para proteínas globulares, comprometendo assim a estimativa.

A obtenção de tais proteínas na forma de um heterocomplexo vem a confirmar os resultados de interação obtidos pela técnica do duplo-híbrido em leveduras, realizados por nosso grupo. (33, 68) Embora tais resultados tenham notificado a possível interação entre essas septinas, até então, não existia referência na literatura sobre a identificação deste complexo *in vivo* ou *in vitro*, sendo este, portanto, um complexo inédito. Porém, ainda há muito o que ser investigado, como por exemplo, as posições que estas proteínas ocupam dentro do heterocomplexo e se estas formam filamentos funcionais.

Baseando-se na regra de Kinoshita, as septinas 5, 7 e 8 deveriam ocupar o lugar das septinas 2, 7 e 6, respectivamente, no heterocomplexo, no entanto, essa hipótese deve ser confirmada. Para tanto, análises deste novo heterocomplexo com a MBP fusionada à SEPT5 poderão ser empregadas em ensaios utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitindo assim, investigar tanto a posição de tais proteínas quanto a formação de um hexâmero similar ao observado para as septinas 2, 6 e 7. (73) Se as substituições ocorrerem conforme a regra de Kinoshita, um volume extra no centro do hexâmero (correspondente à MBP) poderá ser observado indicando a posição de SEPT5 nessa região, do mesmo modo, caso haja apenas a formação de um trímero, um volume extra será observado em uma das extremidades. Experimentos similares foram já realizados com septinas de *S. cerevisiae* utilizando dois *tags*, sendo eles MBP e GFP (*Green Fluorescent Protein*), ligados a duas septinas diferentes, possibilitando assim o acesso às posições destas dentro do octâmero formado por elas. (20)

Adicionalmente, experimentos diminuindo a força iônica na solução tampão são necessários para permitir a formação de filamentos que poderão ser verificados por microscopia eletrônica. A partir disso, será ainda necessário verificar se esses filamentos são funcionais por meio, por exemplo, de testes de interação com membranas biomiméticas. Nesse sentido, amostras puras deste novo heterocomplexo já estão sendo empregadas em tais análises com o auxílio da Dra. Joci Neuby A. Macedo.

A identificação de octâmeros apresentando em suas extremidades septinas do subgrupo I (64, 67, 92), tem sido reportada na literatura e, além disso, interações incluindo SEPT3 e SEPT9, como um quarto participante do heterocomplexo, também foram confirmadas em nosso grupo (comunicação pessoal). Dessa forma, um passo adicional seria então a inclusão de SEPT9 ou SEPT3 ao complexo SEPT5/7/8 para a confirmação da interação e análise da possível formação de um octâmero.

5. CONCLUSÕES

Os estudos biofísicos realizados com a SEPT8G indicaram a falta de atividade GTPásica. Como dito anteriormente, esse resultado era esperado devido ao fato das septinas do subgrupo II, ao qual a septina 8 pertence, não apresentarem o resíduo conservado que coordena o íon necessário para a hidrólise do nucleotídeo. SEPT8G foi obtida na forma solúvel como um dímero e, diferente das outras septinas, esta foi obtida sem a presença de nucleotídeo ligado. Através da técnica de Dicroísmo Circular pôde-se observar que SEPT8G a estabilidade de sua estrutura frente à variação de temperatura é afetada pela presença do íon magnésio. Ensaios de cristalização foram realizados porém nenhum cristal foi obtido ainda.

A interação observada entre as septinas 7 e 8 sugere que a região C-terminal da septina 7 está envolvida na estabilização desse complexo, uma vez que na ausência desta região a recuperação da septina 8 é significativamente prejudicada. Estudos mais detalhados ainda necessitam ser realizados para a análise do papel do C-terminal nessa interface. Nesse sentido, como perspectiva, sugere-se como contra-prova desse resultado uma nova construção para co-expressão, produzindo a septina 8 sem o domínio C-terminal, mas mantendo o C-terminal completo na SEPT7. Assim, caso a co-purificação também não resulte em um produto equimolar das septinas 7 e 8, ficará patente a função dessa interface na estabilização do complexo, interagindo através de estruturas do tipo *coiled-coil*.

A co-expressão e a co-purificação das septinas 5/7/8 na forma de um complexo foi confirmada em duas construções diferentes, validando assim os dados iniciais obtidos por meio de duplo-híbrido por nosso grupo. Na primeira construção, contendo apenas o *tag* de histidinas fusionado à SEPT7, as três proteínas foram co-purificadas por cromatografia de afinidade por metal, sendo eluídas juntas e na mesma proporção. Em seguida foram identificadas por espectroscopia de massas, confirmando assim a presença das três septinas interagindo num heterocomplexo. Uma segunda construção, a co-purificação contou com um *His-tag* e com um *tag* adicional (a MBP) fusionado à septina 5. Esta estratégia permitiu a obtenção de um produto final mais puro e com migração, na coluna de exclusão molecular, compatível com o esperado para o heterocomplexo. Assim, através da co-purificação, pela primeira vez foi constatada *in vitro* a interação das septinas 5, 8 e 7, validando algumas das previsões de parceiros proteicos provenientes dos ensaios de duplo-híbrido. Experimentos adicionais para determinar as posições assumidas por cada proteína no complexo, bem como o tamanho dos oligômeros e sua capacidade de se organizar em filamentos precisam agora ser realizados.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast I. detection of mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, n. 2, p. 352-359, 1970.
- 2 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.
- 3 HARTWELL, L. H. et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Science**, v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974.
- 4 BYERS, B; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v.69, n. 3, p. 717-721, 1976.
- 5 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 Cell Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678-3687, 1987.
- 6 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.
- 7 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. **Journal of Cell Biology**, v.112, n. 4, p. 535-544, 1991.
- 8 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.
- 9 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 478-489, 2008.
- 10 KINOSHITA, M. et al. Self and actin template assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 11 DIDOMENICO, B. et al. Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. **Molecular Genomics Genetics**, v. 242, n. 6, p. 689-698, 1994.
- 12 HARRIS, S. D.; MORRELL, J. L.; HAMER, J. E. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. **Genetics**, v. 136, n. 2, p. 517-532, 1994.
- 13 NGUYEN, T. Q. et al. The *C. elegans* septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000.

- 14 FIELD, C. M. et al. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 3, p. 605-616, 1996.
- 15 NAKATSURU, S.; SUDO, K.; NAKAMURA, Y. Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, p. 82-87, 1994.
- 16 MORI, T. et al. Isolation and mapping of a human gene (DIFF6) homologous to yeast CDC3, CDC10, CDC11, and CDC12, and mouse Diff6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 73, n. 3, p. 224-227, 1996.
- 17 KINOSHITA, M. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes and Development**, v. 11, n. 12, p. 1535-1547, 1997.
- 18 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.
- 19 ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. **Current Biology**, v. 21, n. 10, p. R384-R387, 2011.
- 20 BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.
- 21 SULSTON, J. E.; ROBERT HORVITZ, H. Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 82, n. 1, p. 41-55, 1981.
- 22 WHITE, J. G.; HORVITZ, H. R.; SULSTON, J. E. Neurone differentiation in cell lineage mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 297, n. 5867, p. 584-587, 1982.
- 23 MADDOX, A. et al. Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow. **Developmental Cell**, v. 12, n. 5, p. 827-835, 2007.
- 24 NEUFELD, T.; RUBIN, G. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 371-379, 1994.
- 25 WŁOGA, D. et al. Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1373-1386, 2008.
- 26 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.
- 27 MARTÍNEZ, C. et al. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 6, p. 1388-1395, 2006.

- 28 HALL, P. A. et al. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269-278, 2005.
- 29 PETERSON, E. A. et al. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 11, p. 796-807, 2007.
- 30 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4111-4113, 2002.
- 31 MARTINEZ, C.; WARE, J. Mammalian septin function in hemostasis and beyond. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 11, p. 1111-1119, 2004.
- 32 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, n.103, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-103.
- 33 MACEDO, J. N. A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e a hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca por parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7**. 2010. 160p.Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 34 SPILIOTS, E. T. Amitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science**, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.
- 35 SURKA, M. C.; TANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. **Molecular Biology Cell**, v. 13, n. 10, p. 3532-45, 2002.
- 36 NAGATA, K. et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18538-43, 2003.
- 37 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 183-194, 2012. doi:10.1038/nrm3284.
- 38 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 5, p. 839-844, 2001.
- 39 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2006.
- 40 FINGER, F. P.; KOPISH, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.
- 41 BEITES, C. L. et al. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 434-439, 1999.
- 42 LARISCH, S. et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 12, p. 15-21, 2000.

- 43 HALL, P. A.; RUSSEL, S. E. H.; PRINGLE, J. R. **The septins**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2008.
- 44 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.
- 45 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, 2010.
- 46 BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 117 - 127, 1991.
- 47 SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-Loop - a common motif in Atp-Binding and GTP-Binding proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 430-434, 1990.
- 48 LEIPE, D. D. et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41-72, 2002.
- 49 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 39, p. 16592 – 16597, 2009.
- 50 ZERAIK, A. E.; PEREIRA, H. M.; SANTOS, Y. V. 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. 7799-811, 2014.
- 51 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provides the instruction manual. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.
- 52 LUPAS, A., VAN DYKE, M.; STOCK, J. Predicting coiled-coils from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-1164, 1991.
- 53 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.
- 54 SHEFFIELD P. J. et al. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p.3483 – 3488, 2003.
- 55 MORTENSEN, E. M. et al. Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 6, p. 2091-2105, 2002.
- 56 CARROL, C. W. et al. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 709-717, 1998.

- 57 OH, Y.; BI, E. Septin structure and function in yeast and beyond. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 141-148, 2011.
- 58 JOHN, C. M.; et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n.14, p. 3296-3307, 2007.
- 59 ZERAIK, A. E. **Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni***. 2013. 165p.Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 60 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, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002302
- 61 MENDOZA, M.; HYMAN, A.; GLOTZER, M. GTP Binding induces filament assembly of a recombinant septin. **Current Biology**, v. 12, n.21,p. 1858-1863, 2002.
- 62 HUANG, Y. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **FEBS Journal**, v. 273, n.14, p. 3248 - 3260, 2006.
- 63 GARCIA, W. et al. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. **Biochemistry**, v. 46, n.39, p. 11101–11109, 2007.
- 64 KINOSHITA, M. The septins. **Genome Biology**, v. 4, n.236, 2003. doi:10.1186/gb-2003-4-11-236
- 65 DAMALIO, J. C. P. et al. Lipid interactions triggering Septin 2 to assembly into β -sheet structures investigated by Langmuir monolayers and PM-IRRAS. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – biomembranes**, v. 1858, n. 6, p. 1441-1448, 2013.
- 66 SIRAJUDDIN, M. et al. A structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311 – 315, 2007.
- 67 SELLIN, M. E. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n.17, p. 3152-3164, 2011.
- 68 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. **PlosOne**, v. 5, n. 11, p.e13799, 2010.
- 69 NAGATA, K. et al. Biochemical and cell biological analyses of mammalian septin complex, Sept7/9b/11. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p.55895-55904, 2004.
- 70 FUJISHIMA, K. et al. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 77-92, 2007.

- 71 LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A.; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008.
- 72 SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: CSHS Press, 2001.
- 73 SIRAJUDDIN, M. **Structural studies on mammalian septins – new insights into filaments formation**. 2007. p. 123. Ph.D. (Thesis) – Universitat Dortmund, Dortmund, 2007.
- 74 SECKLER, R.; WU, G. M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl – (beta – gamma - methylene) diphosphonate. formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 13, p. 7655 – 7661, 1990.
- 75 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.
- 76 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252 – 260, 2000.
- 77 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, n. 17, p. 370 – 380, 1999.
- 78 YANG, J. T.; WU, C. S.; MARTINEZ, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 130, p. 208 – 269, 1986. doi:10.1016/0076-6879(86)30013-2.
- 79 COMPTON, L. A.; JOHNSON JUNIOR, W. C. Analysis of proteins circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, n. 1, p. 155 – 167, 1986.
- 80 SOUZA, T. A. C. B. **Estudos funcionais e estruturais das septinas humanas 6, 8 e 10**. 2010. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- 81 VERSELE, M. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701-715, 2004.
- 82 WALLACE, B. A. et al. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. **Protein Science**, v. 12, n. 4, p. 875-884, 2003.
- 83 MACEDO, J. N. A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 4, p. 95-105, 2013.
- 84 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.

- 85 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- 86 SEMISOTNOV, G. V. et al. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. **Biopolymers**, v. 31, n. 1, p. 119 – 128, 1991.
- 87 ZULAUF, M.; D’ARCY, A. Light Scattering of proteins as a criterion for crystallization. **Journal Crystal Growth**, v. 122, n. 8, p. 102-106, 1992.
- 88 SHIBA, K. et al. Polydispersity as a parameter for indicating the thermal stability of proteins by dynamic light scattering. **Analytical Science**, v. 26, n. 4, p. 659 – 663, 2010.
- 89 BARTH, P.; SCHOFFLER, A.; ALBER, T. Targeting metastable coiled-coil domains by computational design. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 36, p. 12038-12044, 2008.
- 90 SHINODA, T. et al. Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with septin 4. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 8, p. 1324-1334, 2010.
- 91 LOW, C.; MACARA, I. G. Structural analysis of septin 2, 6 and 7 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697-30706, 2006.
- 92 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.