UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JULIO CESAR PISSUTI DAMALIO

**Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais da septina humana SEPT2:
fatores que determinam a formação de agregados**

São Carlos

2011

JULIO CESAR PISSUTI DAMALIO

**Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais da septina humana SEPT2:
fatores que determinam a formação de agregados**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de
Araújo

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2011

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)

Pissuti Damalio, Julio Cesar
Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais da
septina humana SEPT2: fatores que determinam a
formação de agregados / Julio Cesar Pissuti Damalio;
orientadora Ana Paula Ulian de Araujo - versão
corrigida -- São Carlos, 2011.
211 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

1. Septinas. 2. Biofísica. 3. GTPases. 4. Doenças
neurodegenerativas. 5. Duplo híbrido em levedura. I.
Ulian de Araujo, Ana Paula, orient. II. Título.

Aos meus pais Roselene e José, pela oportunidade de viver; pela dedicação e amor; pelo sacrifício na criação e manutenção da família; por acreditarem na educação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Roselene e José, pelo fato de terem se encontrado e tido um filho naquela época. Tenho muito que escrever sobre essas duas pessoas, mas ao mesmo tempo parece difícil expressar toda a gratidão. Muito obrigado pela vida, pela educação, pelo meu caráter. Muito obrigado por me deixarem seguir minha vida, com minhas escolhas, minhas decisões (embora vocês estivessem certos o tempo todo). Obrigado pela confiança, apoio, amor e carinho. Essa tese é de vocês, vocês fizeram o mais difícil, eu só estudei, me dediquei e fiz o que vocês me ensinaram. Obrigado.

Obrigado a meu irmão, o qual às vezes passo semanas sem falar, mas quando conversamos parece que continuamos a dividir o mesmo quarto. O que seria de mim se fosse filho único? Quem eu iria atormentar? De quem eu iria ganhar no vídeo game (mesmo que eu perdesse, não aceitava, afinal eu sou o mais velho). Enfim, várias histórias. Irmão, amigo, companheiro. Obrigado.

Agradeço a pessoa que me agüenta diariamente, que tem uma paciência sem precedentes, que suporta minhas manias, que está do meu lado nos momentos felizes (foram vários aliás), me dá suporte nas horas ruins, me escuta, me ensina...te amo Bel! Agradeço também a sua família, seus pais Paulo e Marli, suas irmãs Ângela e Márcia, seus cunhados Dio e Evandro, e os sobrinhos Kauet, Isabela, Inaiá e Henry. Sempre nos proporcionaram ótimos momentos de descontração e alegria.

Queria agradecer imensamente aos meus avôs, João e Ivone, pais da minha mãe, que infelizmente não estão mais entre nós. Que infelizmente não me viram entrar na Universidade, um sonho da minha avó, que ficava até tarde acordada no domingo à noite, já que eu queria ver os gols da rodada no Fantástico. Ela dormia no sofá, mas não me deixava só. Meu avô, que me carregava nos ombros até o bar da esquina, para comprarmos uma “caçulinha”... com um prego ele furava a tampa e colocava um canudinho...impossível esquecer. E vô, calma que não vai chover não...

Agradeço também aos pais do meu pai, Romildo e Helena, os quais ainda me agüentam. Eu posso dizer que fui meio que criado pela avó, mas sempre fugindo pra tomar um café na vizinha. Grande Romildo, me ensinou a alegria de ser Santista, motivo de muita alegria, afinal

“nascer, viver e no Santos morrer, é um orgulho que nem todos podem ter”. Obrigado a vocês quatro pela minha infância, por esse tempo precioso que tive a oportunidade de viver...fica a saudade de muitas coisas, porém a esperança de um futuro cada vez melhor.

Agradeço a todos meus tios e tias: Claudinei, Miriam, Roseli, Randal, Regina, Osvaldo, Maria Helena, Ronaldo, Alice, Carlos, Rosângela, João, Rosane, Rosemary; aos meus primos e primas: Elaine, seu marido Marquinho e filho Caio, Douglas, Rafael, Letícia, Diego, Giovana, Leonardo, Bruno, Gabriele, Natália, Joice, Gabriel, Jean e Catarina. De alguma forma todos vocês me ensinaram sobre família, amizade e respeito. Obrigado por fazerem parte dessa família maravilhosa.

Obrigado a todos meus amigos de infância, são meus irmãos de rua. Aqui é TNT malandro! Juntos passamos pela dura transição infância-adolescência-maturidade. Quantas coisas aprontamos, quantas festas, quantas histórias...valeu muito a pena. E aos sócios e amigos do ap. 32: “Felicidade é o fim de tarde olhando o mar...” Obrigado “mulecada”.

Agradeço a todos os amigos de república, nossos familiares longe de casa. Todo mundo deveria viver algum tempo em uma república estudantil, com pessoas diferentes, hábitos diferentes, histórias diferentes. Foi a maior de todas as lições da minha vida. Obrigado a cada um de vocês que passou pela minha vida e, tenho certeza, contribuiu de alguma forma para o meu crescimento. E viva a quarta-feira na Rep. Do Cogu!!!!

E o pessoal do laboratório, o que dizer dessa galera? Conheci muita gente, muita gente boa no que faz, muita gente apaixonada pelo que faz (mas claro que sempre estamos reclamando do que escolhemos...hehehe...mas adoramos). Quantas conversas no café, de mais de uma hora, aquela preguiça de centrifugar a cultura de células. Quantos congressos, quantos churrascos no fundo da cozinha. Muito obrigado a todos pelos ensinamentos, pela companhia, por serem parte da minha história. E obrigado por me ensinar a pipetar, Leandro!

Agradeço imensamente a todos os professores que passaram pela minha vida, desde o século passado até os dias atuais. Devemos respeitar esses profissionais, com a árdua missão de ensinar, transmitir conhecimento, ser a principal engrenagem do sistema. Não desistam nunca.

Agradeço também à Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pela oportunidade, orientação, discussões e liberdade de pensamento. Foram 7 anos de muito trabalho, muito aprendizado...o início de tudo. Obrigado.

Obrigado aos professores:

Prof. Dr. Richard Charles Garrat – IFSC – USP, pela ajuda ao longo do Doutorado.

Prof. Dr. Wânus Garcia – CCNH – UFABC, pela ajuda no “estranho” mundo da espectroscopia.

Prof. Dr. José Manoel Andreu Morales e Prof. Dr. Rafael Giraldo – CSIC – Madri, pelo auxílio nos experimentos de UCA e MET.

Dra. Thatyane Morimoto Nobre – IFSC – USP, por fazer companhia e ser a tutora na “temida” sala limpa.

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior – IFSC – USP, pelos experimentos de PM-IRRAS.

Profa. Dra. Rosângela Itri – IF – USP e Prof. Dr. Leandro Barbosa – IF – USP, pelos experimentos de SAXS.

Prof. Dr. Jörg Kobarg – UNICAMP, idealizador e coordenador do “septinoma” usando a técnica de Duplo Híbrido em levedura.

Aos “super técnicos” e amigos do Grupo de Biofísica do IFSC: Bel (a mãezona do lab.), Andressa, Fernando e João, vocês são fundamentais para nosso aprendizado e na organização e funcionamento do grupo.

A Ester secretária do grupo e a todos os funcionários da secretaria de pós-graduação e da biblioteca do IFSC que estão sempre nos auxiliando.

A todos os docentes do grupo de Biofísica e Cristalografia, pela participação na minha formação profissional.

A todas as pessoas, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização do meu trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

A CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro necessário para realização deste trabalho.

“O cético prefere viver com a dúvida a aceitar respostas que não podem ser comprovadas, que são aceitas apenas pela fé. Para ele, o não saber não gera insegurança, mas sim mais apetite pelo saber. Essa talvez seja a lição mais importante da ciência, nos ensinar a viver com a dúvida, a idolatrá-la. Pois, sem ela, o conhecimento não avança”.

Marcelo Gleiser

“Se você quiser ser bem sucedido, duplique sua taxa de fracassos”.

Thomas Watson, pioneiro da IBM.

"Our deepest fear is not that we are inadequate. Our deepest fear is that we are powerful beyond measure. It is our light, not our darkness that most frightens us. We ask ourselves, who am I to be brilliant, gorgeous, talented, fabulous? Actually, who are you *not* to be? Your playing small does not serve the world. There's nothing enlightened about shrinking so that other people won't feel insecure around you. We are all meant to shine, as children do. It's not just in some of us; it's in everyone. And as we let our own light shine, we unconsciously give other people permission to do the same. As we're liberated from our own fear, our presence automatically liberates others."

Marianne Williamson

"Eu odeio citações. Me diga o que você sabe."

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

DAMALIO, J. C. P. **Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais da septina humana SEPT2: fatores que determinam a formação de agregados.** 2011. 211p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

As septinas fazem parte de uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina. As septinas têm mostrado ter um papel importante na citocinese e outros processos celulares, incluindo a determinação da polaridade celular e reorganização do citoesqueleto. Todos os membros da família de septinas são compostos por três domínios: um N-terminal variável, um domínio central GTPase e uma região C-terminal que inclui sequências de *coiled-coil*. Septinas possuem uma característica de polimerizarem para formar complexos hetero-oligoméricos altamente organizados, *in vivo* e *in vitro*. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas, embora sua função ainda não esteja bem estabelecida. A Septina 2 humana (SEPT2) se acumula no sulco de clivagem de células em divisão, desde a anáfase até a telófase, além de interagir com a actina, e também está envolvida em doenças neurodegenerativas, como mal de Alzheimer. Nesse estudo, a ORF que codifica SEPT2, bem como os fragmentos que codificam seus domínios, foram clonados, expressos em *E.coli* e purificados por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Os produtos foram analisados por espectroscopia de dicroísmo circular, espalhamento de luz a ângulo fixo e espectroscopia de fluorescência extrínseca, usando Tioflavina-T, que é um marcador clássico para fibras amilóides. Em todos os casos, os produtos formaram homodímeros *in vitro*, e também agregaram em temperaturas fisiológicas. O desenovelamento térmico das proteínas recombinantes revelou a presença de uma população intermediária de desenovelamento, rica em folhas- β , e que ligam Tioflavina-T, sugerindo uma estrutura amiloidogênica para essa proteína, confirmada pelos programas de predição TANGO e WALTZ. Imagens dessas fibras foram obtidas usando Microscopia eletrônica de Transmissão, evidenciando uma agregação organizada das proteínas. Além disso, usando monocamadas de Langmuir, foi possível confirmar a ligação específica de SEPT2 ao fosfolípídeo fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂). Essa ligação específica mantém a estrutura secundária de SEPT2, observada pela técnica PM-IRRAS, algo que não ocorre caso o lipídio seja inespecífico, sugerindo uma associação de SEPT2 com a membrana plasmática e podendo ter um papel na regulação das septinas. Por meio da técnica de duplo híbrido em levedura, identificamos proteínas que interagem com a SEPT2, como a MPBI e a DCTN2, auxiliando na elucidação de processos em que a SEPT2 possa participar. O conjunto dos resultados sobre a estabilidade, os processos de agregação de SEPT2 e a identificação de novos parceiros protéicos de interação, obtidos nesse trabalho, contribuíram para o melhor entendimento da função da SEPT2 e de seu envolvimento em desordens neurodegenerativas.

Palavras chaves: Septinas, ligação a GTP, homodímeros, agregação, amilóide, doenças neurodegenerativas, fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato, duplo híbrido em levedura.

ABSTRACT

DAMALIO, J. C. P. **Functional and structural studies of human SEPT2: determinant factors triggering the self-assembly into amyloid fibrils.** 2011. 211p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Septins are members of a conserved group of GTP-binding and filament-forming proteins. They are involved in a variety of cellular processes, such as microtubule regulation, vesicle trafficking, the formation of scaffolding platforms and actin dynamics. Human Septin 2 (SEPT2) has an N-terminal polybasic region responsible for lipid binding, a GTPase domain, and a C-terminal domain. SEPT2 is essential for cytokinesis and it is found in many tissues, mainly in the brain. Together with SEPT1 and SEPT4, it is accumulated in deposits known as neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, which is evidence that SEPT2 may be involved in this process. In this study, the human SEPT2, and its domains, were cloned, expressed in *E. coli* and purified by affinity and size-exclusion chromatographies. The proteins form homodimers *in vitro*, suggesting that the GTPase domain is enough to promote the oligomerization. Thermal unfolding revealed the formation of aggregates under physiological conditions, which have the ability to bind a specific amyloid dye, Thioflavin-T, suggesting them to be an amyloid fiber. Besides, *in silico* prediction programs, TANGO and WALTZ, corroborate that SEPT2 contain regions with high probability of aggregation and amyloidogenic formation, respectively. Moreover, we observed 20-50 nm thick filamentous structures by electron microscopy of negatively stained. Using Langmuir monolayers at the cell membrane lipid packing, SEPT2 and SEPT2NG bound to the phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂). Results from *in situ* PM-IRRAS experiments indicated that the secondary structure of SEPT2 is preserved upon interacting with PtdIns(4,5)P₂, but not when interacting with DPPC – which is not specific for SEPT2 – at the air/water interface suggesting an association with the plasma membrane and a role in septin regulation. Furthermore, we also identified protein partners of SEPT2, from both human leukocyte and brain fetal cDNA libraries, using the yeast two-hybrid system. SEPT2 was shown to interact with: septins 6 and 4; a serine-protease and a MAP inhibitory protein; an ubiquitin-conjugating enzyme; and proteins related to cellular division. Thus, taken together this study contributed for the knowledge of the stability and the aggregation kinetic of the SEPT2, leading to a better understanding of this protein and their role in neurodegenerative disorders.

Key words: Septin, GTP-binding, neurofibrillary tangles, amyloid, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, yeast two-hybrid system and neurodegenerative diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Septinas durante o processo de divisão celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 1.2 -	Domínios estruturais das septinas humanas	35
Figura 1.3 -	Estrutura do filamento formado pelas septinas humanas 2, 6 e 7	37
Figura 1.4 -	Homofilamentos de septinas	39
Figura 1.5 -	Representação da estrutura tridimensional de SEPT2 humana	40
Figura 1.6 -	Função de SEPT2 na citocinese	44
Figura 1.7 -	Agregados protéicos	
Figura 1.8 -	Representação esquemática dos vários estados conformacionais que podem ser adotados por proteínas	46
Figura 1.9 -	Histopatologia da doença de Alzheimer	47
Figura 2.1 -	Marcador clássico para fibras amilóides	65
Figura 2.2 -	Detalhe das interfaces de dimerização de SEPT2 e posição das mutações propostas	70
Figura 2.3 -	Esquema dos experimentos de Ultracentrifugação Analítica	72
Figura 2.4 -	Amplificação do cDNA codificante da SEPT2 e das sequências parciais correspondentes aos domínios	75
Figura 2.5 -	Purificação por cromatografia de exclusão molecular	78
Figura 2.6 -	Espetro de CD de SEPT2 e de seus domínios a 10°C	80
Figura 2.7 -	Desenovelamento parcial e reenovelamento de SEPT2 e seus domínios	81
Figura 2.8 -	Espetro de Fluorescência de SEPT2 e de seus domínios a 10°C	84
Figura 2.9 -	Hidrólise de GTP pela SEPT2	85
Figura 2.10 -	Programas de predição de agregação e de regiões amiloidogênicas	88
Figura 2.11 -	Alinhamento das 13 septinas humanas	90
Figura 2.12 -	Desnaturação térmica de SEPT2 e SEPT2G	93
Figura 2.13 -	Análise da presença de nucleotídeo em SEPT2G	95
Figura 2.14 -	Espalhamento de luz a ângulo fixo de SEPT2 e SEPT2G, em função da temperatura	96
Figura 2.15 -	Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT2 e SEPT2G, em	98

	função da temperatura	
Figura 2.16 -	Eletromicrografias dos filamentos formadas por SEPT2	101
Figura 2.17 -	Esquema da Monocamada de Langmuir	103
Figura 2.18 -	Adsorção de SEPT2, SEPT2NG e SEPT2G na monocamada de Langmuir	104
Figura 2.19 -	Espectro de PM-IRRAS de SEPT2 a 20°C	107
Figura 2.20 -	Espectro de PM-IRRAS de SEPT2 a 37°C	109
Figura 2.21 -	Cromatografia de exclusão molecular para SEPT2 e seus mutantes	112
Figura 3.1 -	Esquema ilustrativo do sistema duplo híbrido em leveduras	137
Figura 3.2 -	Análise de restrição de SEPT2-pBTM116	138
Figura 3.3 -	Teste da β -galactosidase	140
Figura 3.4 -	Teste da β -galactosidase para validação das interações	141
Figura 3.5 -	Amplificação do cDNA de MBIP e DCTN2	146
Figura 3.6 -	Análise de restrição dos vetores de expressão	147
Figura 3.7 -	Purificação por cromatografia de exclusão molecular	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Funções das septinas de mamíferos e suas interações com outras proteínas	32
Tabela 1.2 -	Localização cromossômica dos genes que codificam septinas e associação das septinas a diversas doenças	43
Tabela 2.1 -	Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação do cDNA de SEPT2 e de seus domínios	55
Tabela 2.2 -	Reagentes utilizados na reação de amplificação	56
Tabela 2.3 -	Bandas de absorção de IR para proteínas	68
Tabela 2.4 -	Bandas de absorção de IR para proteínas na região de Amida I	69
Tabela 2.5 -	Parâmetros relativos à estrutura primária de SEPT2 e seus domínios	77
Tabela 2.6 -	Variações na pressão superficial (mN m^{-1})	110
Tabela 2.7 -	Bandas de absorção na região de amida I a 30 mN m^{-1}	111
Tabela 2.8 -	Velocidade de Sedimentação	115
Tabela 2.9 -	Equilíbrio de Sedimentação	116
Tabela 3.1 -	Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação de SEPT2	123
Tabela 3.2 -	Reagentes utilizados na reação de amplificação de SEPT2	123
Tabela 3.3 -	Meios de Cultura utilizados no experimento de Duplo Híbrido em Levedura	126
Tabela 3.4 -	Soluções usadas na transformação das leveduras	128
Tabela 3.5 -	Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação de MBIP e DCTN2	132
Tabela 3.6 -	Reagentes utilizados na reação de amplificação de MBIP e DCTN2	132
Tabela 3.7 -	Genes identificados na biblioteca de cérebro fetal humano	142
Tabela 3.8 -	Genes identificados na biblioteca de leucócitos	143

LISTA DE ABREVIATURAS

3-AT	3-amino-1, 2, 4-triazol
AD	Domínio de ativação da transcrição
ADGAL4	Domínio de ativação da transcrição GAL4
AD-presca	Domínio de ativação da transcrição fundido a uma proteína recuperada por meio do ensaio do duplo híbrido
Amp	Amplicilina
BD	Domínio de ligação ao DNA
BD-isca	Domínio de ligação ao DNA fusionado a uma proteína utilizada como isca no ensaio do duplo híbrido
BDLexA	Domínio de ligação ao DNA LexA
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	<i>Circular Dichroism</i> – Dicroísmo Circular
cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
D.O.	Densidade optica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
GDP	Guanosina-5-difosfato
GTP	Guanosina-5-trifosfato
HPLC	High-performance liquid chromatograph, cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kana	Cloranfenicol
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MET	Microscopia Eletronica de Transmissão
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NI-NTA	Resina de afinidade de níquel
NMR	Ressonância magnética nuclear
ORF	<i>Open reading frame</i> , janela aberta de leitura
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da

	Polimerase
pET 28a (+)	Vetor de expressão bacteriano
PI(4,5)P2	fosfatidilinositol (4,5) bifosfato
<i>P-loop</i>	<i>Loop</i> de interação com o fosfato
PM-IRRAS	<i>Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy</i>
RALS	<i>Right Angle Light Scattering</i> – Espalhamento de luz em Ângulo Reto
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> – Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
ThT	Tioflavina-T
TM	Temperatura média de Transição
TRIS	Tris (hidroximetil aminometano
U	Unidades
u.a.	Unidades Arbitrárias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

LISTA DE AMINOÁCIDOS

NOME	SÍMBOLO	ABREVIÇÃO	CARACTERÍSTICA
Glicina	Gly, Gli	G	Polar não Carregado
Alanina	Ala	A	Apolar
Leucina	Leu	L	Apolar
Valina	Val	V	Apolar
Isoleucina	Ile	I	Apolar
Prolina	Pro	P	Apolar
Fenilalanina	Phe, Fen	F	Apolar
Serina	Ser	S	Polar não Carregado
Treonina	Thr, The	T	Polar não Carregado
Cisteína	Cys, Cis	C	Polar não Carregado
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Polar não Carregado
Asparagina	Asn	N	Polar não Carregado
Glutamina	Gln	Q	Polar não Carregado
Ácido Aspártico	Asp	D	Negativo
Ácido Glutâmico	Glu	E	Negativo
Arginina	Arg	R	Positivo
Lisina	Lys, Lis	K	Positiva
Histidina	His	H	Positiva
Triptofano	Trp, Tri	W	Apolar
Metionina	Met	M	Apolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	33
1.1 SEPTINAS - CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	33
1.2 DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE SEPTINAS	36
1.3 SEPTINAS E FORMAÇÃO DE FILAMENTOS	38
1.4 SEPTINA HUMANA SEPT2 - ESTRUTURA, FUNÇÃO E PATOLOGIAS RELACIONADAS	42
1.5 FORMAÇÃO DE AGREGADOS PROTÉICOS E DOENÇAS RELACIONADAS.....	46
CAPÍTULO 2 ESTUDOS BIOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS DA SEPTINA HUMANA SEPT2: FATORES QUE DETERMINAM A FORMAÇÃO DE AGREGADOS	55
2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	55
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.2.1 Clonagem de SEPT2 e de seus domínios	57
2.2.1.1 Amplificação e clonagem em vetor de propagação.....	57
2.2.1.2 Sequenciamento.....	59
2.2.1.3 Construção dos vetores de expressão	59
2.2.2 Expressão e purificação de SEPT2 e de seus domínios.....	60
2.2.3 Caracterização estrutural e funcional	61
2.2.3.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	61
2.2.3.2 Fluorescência intrínseca	62
2.2.3.4 Ensaio de hidrólise de GTP.....	63
2.2.4 Formação de estruturas amiloidogênicas.....	64
2.2.4.1 Programas de predição in silico.....	64
2.2.4.2 Desnaturação térmica	65
2.2.4.3 Análise do conteúdo de nucleotídeo.....	65
2.2.4.4 Espalhamento de luz a ângulo fixo.....	66
2.2.4.5 Espectroscopia de Fluorescência: Emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavina-T (ThT)	66
2.2.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	67
2.2.5 Estudos de interação de SEPT2 com lipídeos	68
2.2.5.1 Monocamadas de Langmuir	69
2.2.5.2 PM-IRRAS	69
2.2.6 Investigação da região de dimerização de SEPT2.....	71
2.2.6.1 Produção de proteínas mutantes de SEPT2 e Cromatografia de exclusão molecular	71
2.2.6.2 Ultracentrifugação Analítica.....	73
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
2.3.1 Amplificação e clonagem do cDNA de SEPT2 e seus domínios	75
2.3.2 Análise de sequências.....	76
2.3.4 Expressão recombinante e purificação	77
2.3.5 Caracterização estrutural e funcional	80
2.3.5.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	80
2.3.5.2 Fluorescência intrínseca	84
2.3.5.3 Ensaio de hidrólise de GTP.....	85
2.3.6 Formação de estruturas amiloidogênicas.....	87
2.3.6.1 Programas de predição in silico.....	87
2.3.6.2 Desnaturação térmica	93
2.3.6.3 Análise do conteúdo de nucleotídeo.....	95

2.3.6.4 Espalhamento de luz a ângulo fixo	96
2.3.6.5 Espectroscopia de Fluorescência: Emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavina-T (ThT).....	98
2.3.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	100
2.3.7 Estudos de interação de SEPT2 com lipídeos	103
2.3.7.1 Monocamadas de Langmuir	103
2.3.7.2 PM-IRRAS	106
2.3.8 Investigação da região de dimerização de SEPT2	112
2.3.8.1 Análise da oligomerização das proteínas mutantes de SEPT2 por Cromatografia de Exclusão Molecular	112
2.3.8.2 Ultracentrifugação Analítica	115
2.4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTÉICOS DE SEPT2	123
3.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	123
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	125
3.2.1 Técnica do duplo Híbrido em levedura.....	125
3.2.2 Subclonagem do gene SEPT2 no vetor pBTM 116	126
3.2.2.1 Amplificação e clonagem em vetor de propagação	126
3.2.2.2 Sequenciamento	127
3.2.2.3 Construção do vetor de expressão.....	128
3.2.2.4 Teste de auto-ativação.....	128
3.2.2.5 Transformação de levedura em pequena escala.....	128
3.2.2.6 Ensaio da β -galactosidase em papel de filtro	129
3.2.3 Screening da biblioteca	130
3.2.3.1 Transformação em grande escala.....	130
3.2.3.2 Extração de DNA plasmidial de levedura.....	132
3.2.3.3 Extração de DNA plasmidial de bactéria.....	133
3.2.3.4 Sequenciamento de DNA e análise de sequências.....	133
3.2.3.5 Co-transformação das leveduras para confirmação da interação de SEPT2 com os clones selecionados do screening das bibliotecas	134
3.2.4 Produção heteróloga das proteínas selecionadas que interagem com SEPT2	135
3.2.4.1 Amplificação do cDNA e clonagem dos genes que codificam as proteínas MBIP e DCTN2	135
3.2.4.2 Sequenciamento	137
3.2.4.3 Construção dos vetores de expressão.....	137
3.2.4.4 Teste de solubilidade.....	138
3.2.4.5 Purificação dos produtos recombinantes solúveis	138
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
3.3.1 Duplo Híbrido em levedura.....	141
3.3.1.1 Construção do plasmídeo pBTM_SEPT2 e teste de auto-ativação.....	141
3.3.2 Screening das bibliotecas e teste da β -galactosidase	142
3.3.2.1 Extração plasmidial e análise dos clones	144
3.3.2.2 Co-transformação de L40 com SEPT2 e as presas e teste da β -galactosidase.....	144
3.3.3 Produção heteróloga das proteínas identificadas que interagem com SEPT2	148
3.3.3.1 Amplificação do cDNA e clonagem dos genes que codificam as proteínas MBIP e DCTN2	150
3.3.3.2 Sequenciamento	152
3.3.3.3 Expressão e Purificação dos produtos recombinantes solúveis	153
3.4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	157

REFERÊNCIAS 161
ANEXOS 179

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Capítulo 1 Introdução

1.1 Septinas - Características gerais

As septinas fazem parte de uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina¹, e foram originalmente descobertas por uma análise genética de mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que resultavam em um fenótipo defeituoso na progressão do ciclo celular². Mutantes em qualquer um dos loci gênicos *CDC3*, *CDC10*, *CDC11* ou *CDC12*, comumente formavam células multinucleadas, já que esses mutantes não eram capazes de organizar um “anel de septinas” (Figura 1.1), responsável pela demarcação e separação entre as membranas da célula-mãe e filha^{3; 4; 5; 6}.

Figura 1.1 - Septinas durante o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Localização das septinas durante a citocinese, visualizado por microscopia de fluorescência. Modificado a partir de⁷; (b) Formação, *in vitro*, de um complexo em forma de anel, contendo as septinas 2, 6 e 7. Modificado a partir de⁸. A escala representa 100 nm; (c) Modelos do heterofilamento de septinas no processo de divisão celular. Os heterofilamentos são alinhados ao longo do eixo de divisão e, durante a citocinese, sofrem uma rotação de 90°. Modificado a partir de⁹; (d) Modelo modificado, mostrando os heterofilamentos ligeiramente curvados, que podem deslizar uns sobre os outros, similar a uma íris, para formar uma estrutura na forma de anel⁹.

Até meados de 2000, septinas haviam sido descritas somente nos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, na mosca *Drosophila melanogaster*, no nemátode *Caenorhabditis elegans*, em camundongos e humanos, mas nunca em plantas ⁶. Posteriormente, septinas foram identificadas nos fungos *Candida albicans*, *Eremothecium gossypii*, *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* ^{10; 11}.

Até então, acreditava-se que as septinas estavam presentes somente nos reinos *Fungi* e *Animalia*, e teriam divergido de outras linhagens eucarióticas ao longo da evolução. Porém, um recente estudo utilizou a sequência de nucleotídeos codificantes da proteína Cdc3 de *Saccharomyces cerevisiae* na procura de sequências homólogas, nos bancos de dados disponíveis, expandindo assim, o grupo de organismos que possuem genes codificantes de septinas ¹². Essa busca revelou a presença de septinas: 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*.

A identificação de septinas nesses grupos evolutivamente distintos sugere a existência das septina em um ancestral comum, que ocupava um nível basal no processo evolutivo dos eucariotos. Ao longo da evolução eucariótica, alguns grupos perderam os genes de septinas, enquanto outras linhagens os proliferaram ¹².

As septinas têm mostrado ter um papel importante na citocinese e outros processos celulares, incluindo a determinação da polaridade celular ^{13; 14; 15}, reorganização do citoesqueleto ^{16; 17}, dinâmica de membranas ¹⁸, tráfego de vesículas ¹⁹, exocitose ²⁰, apoptose ²¹, reparo de DNA ²² e estabilidade estrutural ^{23; 24; 25} (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Funções das septinas de mamíferos e suas interações com outras proteínas. Modificado a partir de ²⁶.

Complexos	Possíveis funções	Domínio da Septina envolvido
SEPT1/Aurora B	Segregação de cromossomos Citocinese	Não determinado
SEPT2/F-actina	Citocinese	Ligação a GTP
SEPT2/5/6/anilina	Citocinese	Não determinado
SEPT2/6/7	Formação de filamento	N e C terminais
SEPT2/GLAST	Liberação de neurotransmissor	Não determinado
SEPT2/miosina II	Citocinese	Não determinado
SEPT2/6/CENP-E	Segregação de cromossomo	Não determinado
SEPT2/6/7MAP4	Estabilidade do microtúbulo	Não determinado
SEPT2/4/7Sec6/8	Tráfego de vesícula	Não determinado

Continua

Continuação

SEPT3/5/7	Biologia dos neurônios	Não determinado
SEPT4/5/8	Exocitose/endereçamento de vesículas	N e C terminais
SEPT4/8	Biologia das plaquetas	Não determinado
SEPT5/Parkin	Patogênese de Parkinson	Não determinado
SEPT5/11	Exocitose em células endotelial	Ligação a GTP e C-terminal
SEPT5/complexo SNARE	Exocitose/ endereçamento de vesículas	Ligação a GTP e C-terminal
SEPT6/12	Formação de filamento	Não determinado
SEPT7/9/11/actina	Formação de filamento	N-terminal
SEPT7/CENP-E	Segregação de cromossomo	Não determinado
SEPT8/Vamp2	Formação do complexo SNARE/ Liberação de neurotransmissor	Não determinado
SEPT9/actina	<i>Stress fiber</i>	Não determinado
SEPT9/AS-RhoGEF/ actina	Sinalização Rho	N-terminal
SEPT9/HIF-1	Proliferação celular/angiogênese /câncer de próstata	Ligação a GTP e N-terminal
SEPT9/JNK	Proliferação celular/ câncer de mama	Ligação a GTP
SEPT9/tubulina	Formação de filamento/ microtúbulos /formação do fuso	Ligação a GTP
SEPT11/12	Formação de filamento	Não determinado
SEPT14/SEPT1-7/9/11-12	Biologia testicular	Não determinado

Embora atualmente sejam conhecidas diversas funções para as septinas, nos mais diversos grupos animais (principalmente em mamíferos), a função precisa dessas proteínas não é totalmente compreendida. Inicialmente, as septinas foram identificadas como participantes do processo de divisão celular, atuando na forma de heterofilamentos (Figura 1.1) e também interagindo com outras proteínas, nas mais diversas funções (Tabela 1.1). Porém, alguns organismos possuem apenas uma septina, como *Chlamydomonas reinhardtii*, o que impede a formação de heterofilamentos composto por septinas ¹². O fato das septinas interagirem com microtúbulos, com a actina e com a membrana plasmática, sugere um importante papel na reorganização do citoesqueleto, o que poderia ser uma função primordial das septinas ancestrais ⁹. Talvez o estudo de organismos modelos, com apenas uma septina, possam revelar qual a função primordial dessas moléculas.

1.2 Domínios estruturais de septinas

Todos os membros da família de septinas são compostos por três domínios: um N-terminal variável, um domínio central GTPase, e uma região C-terminal que inclui geralmente sequências características de *coiled-coil* (Figura 1.2 A) ²⁷.

As septinas pertencem a superclasse das *P-loop* GTPases ²⁸. O domínio central de ligação a GTP possui três motivos: G1 (GxxGxGKST), G3 (DxxG) e G4 (xKxD). O motivo G1, também conhecido como *P-loop* ou Walker Box, é o mais conservado em septinas, sendo que Glicinas são sempre encontradas na primeira e na sexta posição da sequência de aminoácidos. Esse motivo é responsável por se ligar aos fosfatos α e β , posicionando-os no sítio ativo da enzima. O motivo G3 é responsável pela coordenação do íon de magnésio e pela interação com o fosfato γ , enquanto o motivo G4 reconhece o anel de guanina, proporcionando especificidade ao nucleotídeo. Os motivos G2, que contém um íon de magnésio coordenando os fosfatos β e γ , e G5, que interage indiretamente com o anel de guanina, são menos conservados em GTPases e são ausentes em septinas ^{29; 30}.

As septinas possuem, geralmente, o C-terminal predito como sendo um *coiled-coil*, caracterizado pela presença de leucinas, ou outros aminoácidos hidrofóbicos, a cada sete resíduos. O *coiled-coil* pode estar relacionado com a interação da proteína com ela mesma, ou com outras proteínas ²⁷. As septinas de mamíferos apresentam cerca de 60 % de identidade no domínio C-terminal, com exceção das septinas 3, 9 e 12, que não apresentam o coiled-coil ³¹. Precedendo o C-terminal, há uma sequência conservada de 53 aminoácidos (50 a 93% de resíduos conservados entre as septinas estudadas) conhecida como elemento único de septinas, ³².

Historicamente, várias septinas foram descritas com outros nomes, e até as mesmas septinas possuíam nomes diferentes. Tal confusão foi resolvida em 2002, quando a nomenclatura das septinas de mamíferos foi unificada ³³. A partir de então, convencionou-se que as septinas humanas receberiam as denominações de SEPT1, SEPT2, SEPT3, e assim por diante, até a última septina conhecida, enquanto os genes codificantes receberiam a mesma denominação, porém em itálico (*SEPT1*, *SEPT2*, *SEPT3*) ³³.

Atualmente são conhecidas 13 septinas em humanos (SEPT1 a SEPT12, e SEPT14, sendo que SEPT13 foi recentemente considerada um pseudogene ³⁴), embora várias isorformas sejam encontradas, devido ao *splicing* alternativo. A estrutura primária dessas proteínas de 40-60 kDa é bem conservada entre diferentes espécies. O domínio central

GTPase é razoavelmente bem conservado (>35% de identidade sequencial entre septinas homólogas de levedura e mamíferos), porém os domínios N- e C- terminais apresentam grande variação³¹. A identidade sequencial entre os domínios GTPase de septinas da mesma espécie é consideravelmente alto, com uma similaridade mínima de 75%²⁷. A classificação das septinas considerando seus domínios estruturais pode ser observada na Figura 1.2 B³⁵.

Em adição, as septinas contêm uma região polibásica conservada, que, em alguns casos, é responsável pela ligação de fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) (Figura 1.2 A)³⁶. A ligação de PtdIns(4,5)P₂ ou GTP foi mostrada ser mutuamente exclusiva para Septina 4³⁶, o que pode conferir a algumas septinas uma função regulatória³¹, porém há poucos estudos presentes na literatura, sendo necessária uma maior atenção nesse ponto específico.

Continua

Continuação

Figura 1.2 - Domínios estruturais das septinas humanas. (A) O domínio central é composto por três motivos de interação com o nucleotídeo guanina, G1, G3 e G4 ²⁷. (B) Classificação das septinas de mamíferos em grupos, considerando seus domínios estruturais ^{35; 37; 38}. 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 ³⁷. Cedido gentilmente pela Dra. Joci Neuby Alves Macedo.

1.3 Septinas e formação de filamentos

Septinas possuem uma característica de se polimerizarem para formar complexos hetero-oligoméricos altamente organizados, *in vivo* e *in vitro*. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas, embora sua função ainda não esteja bem estabelecida.

Complexos de septinas 2, 6 e 7 foram isolados de *Drosophila* ³⁹ e fungos ⁴⁰ e mostraram a possibilidade de polimerização em filamentos de aproximadamente 7-9 nm de

espessura. Heterofilamentos também foram identificados em *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*. No caso de *C. elegans*, as septinas UNC-59 e UNC-61 se organizam na forma de um tetrâmero ⁴¹. Já em *S. cerevisiae*, o complexo recombinante das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 formam um octâmero linear, composto de duas cópias de cada septina individual ⁴².

O complexo das proteínas recombinantes SEPT2, SEPT6 e SEPT7 pode ser co-purificado em uma proporção de 1:1:1, a partir de extratos cerebrais e de células HeLa ^{8; 43}. Sheffield e colaboradores também verificaram a interação entre SEPT2, SEPT6 e SEPT7 em células de mamíferos, e seus estudos indicam que essas três septinas formam um heterotrímero ou, em pares, heterodímeros ^{44; 45}.

Recentemente, Sirajuddin e colaboradores ⁴⁶ publicaram a primeira estrutura resolvida de uma septina humana (SEPT2), e também do complexo formado pelas septinas 2, 6 e 7 (Figura 1.3), co-expressas em *E. coli*.

No complexo, SEPT2 forma um homodímero pela região NC (N-terminal e C-terminal), deixando livre o domínio GTPase. SEPT6 está ligada a SEPT2 pelo domínio GTPase, e à SEPT7 pela região NC. SEPT7 também forma homodímeros pelo domínio GTPase, o que faz o hexâmero crescer longitudinalmente, formando os filamentos ⁴⁶.

(A)

(B)

Continua

Continuação

(C)

Figura 1.3 - Estrutura do filamento formado pelas septinas humanas 2, 6 e 7. (A) Heterofilamento formado pelas septinas 2, 6 e 7 em alta concentração de sal, visualizado por Microscopia eletrônica; (B) A região trimérica superior adota várias orientações, mostrando um alto grau de flexibilidade do hexâmero; (C) 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 ⁴⁶.

Outros complexos de septinas humanas foram descritos, porém com menos detalhes. Por meio da técnica de duplo híbrido em levedura e por estudos de co-localização sub-celular, o complexo formado pelas septinas SEPT4-SEPT5-SEPT8 foi identificado ⁴⁷, assim como o complexo das septinas SEPT7-SEPT11-SEPT9b, caracterizado por imunofluorescência em fibroblastos embrionários de ratos ⁴⁸. Utilizando anticorpos contra as septinas 5, 7 e 11, em uma cultura de neurônios de ratos, foi observada a co-localização dessas proteínas, um indício da formação do complexo SEPT5-SEPT7-SEPT11 ⁴⁹. O complexo formado pelas septinas SEPT3-SEPT5-SEPT7 foi identificado em terminais nervosos, e também isolado partir de extratos de cérebro de ratos ^{50; 51}. Além disso, recentemente alguns trabalhos sugeriram que a SEPT9 pode se associar a SEPT7, no complexo formado pelas septinas 2, 6 e 7, formando assim um octâmero, e não mais um hexâmero, como se acreditava até então ^{52; 53; 54}.

Segundo as regras de Kinoshita, membros do mesmo grupo (Figura 1.2 B) podem substituir as septinas em posições específicas ao longo do heterofilamento ^{48; 52; 55}. Dessa forma, inúmeras combinações são possíveis, o que abre um campo de investigação desafiador.

Em contraste aos complexos formados por mais de uma septina, há evidências de outras estruturas formadas por septinas individuais (Figura 1.4). O primeiro relato da existência de homofilamentos foi descrito para SEPT2 de *Xenopus laevis*, *in vitro* ⁵⁶. Nesse trabalho foram observados filamentos de aproximadamente 20 nm de espessura, formados apenas quando SEPT2 estava ligada ao GTP, e não ao GDP. Em contraste, foi observado que

SEPT2 humana forma homofilamentos, *in vitro*, tanto na presença de GTP quanto de GDP ⁵⁷. Esses homofilamentos formam feixes, de 20-40 nm de espessura.

Homofilamentos de 20-50 nm de espessura também foram observados para SEPT4 humana *in vitro* ⁵⁸.

Figura 1.4 - Homofilamentos de septinas. (A) SEPT2 de *Xenopus* ⁵⁶. A escala representa 100 nm; (B) SEPT2 humana ⁵⁷. A escala representa 100 nm; (C) SEPT4 humana ⁵⁸. A escala representa 1000 nm.

No caso da SEPT2 de *Xenopus laevis* e humanos, os autores dos respectivos trabalhos não atribuem nenhuma função a esses homofilamentos e também não discutem sobre sua importância nas células. Já no caso da SEPT4 de humanos, os autores sugerem que a presença de homofilamentos possa estar relacionada com um processo patológico. Os homofilamentos seriam, na verdade, fibras amilóides, possivelmente associadas à doença de Alzheimer, Parkinson e outras doenças neurodegenerativas, fato suportado pela identificação de SEPT4 em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer ⁵⁹.

Devido ao pequeno número de estudos relacionados à formação dos homofilamentos e sua função, não fica claro se essas estruturas são fisiológicas ou patológicas. Ainda, não se

sabe quais são as septinas que tem essa capacidade e, muito menos, sobre os mecanismos que regulam sua organização.

1.4 Septina humana SEPT2 - Estrutura, função e patologias relacionadas

O gene *SEPT2*, também conhecido como *Nedd5*, *Pnutl3* e *Diff6*⁶⁰, localizado na posição cromossômica 2q37.3, produz um polipeptídeo de 361 aminoácidos, de peso molecular igual a 41,5 kDa⁶¹. A presença do mRNA codificante para SEPT2 foi identificada praticamente em todos os tecidos humanos, mas principalmente em medula espinhal, ovário, rins, pâncreas, tireóide e cérebro⁶².

Sirajuddin e colaboradores⁴⁶ publicaram a primeira estrutura resolvida de uma septina humana e também do complexo de septinas 2, 6 e 7. A estrutura básica de SEPT2 possui o domínio G canônico, com seis fitas- β e cinco α -hélices, como em Ras⁴⁶. Uma característica única de SEPT2 é a presença de quatro elementos adicionais, quando comparada com Ras: as hélices $\alpha 0$ no N-terminal, $\alpha 5'$, entre $\alpha 4$ e $\beta 6$, e $\alpha 6$ no C-terminal, além das duas fitas antiparalelas $\beta 7$ e $\beta 8$ (Figura 1.5 A)

SEPT2 (1-315) possui ainda duas regiões de dimerização em solução, a interface G (pelo domínio GTPase) e a interface NC (pelas regiões N e C terminais) (Figura 1.5 B). No complexo de 2, 6 e 7, a interação entre SEPT2 ocorre pela interface NC, enquanto a interface G é responsável pela interação com SEPT6 (Figura 1.3 C)⁴⁶.

(A)

Continua

Continuação

(B)

Figura 1.5 – Representação da estrutura tridimensional de SEPT2 humana. (A) Sobreposição das estruturas de SEPT2-315 (vermelho) e Ras-GppNHp (azul), indicando um elemento extra de estrutura secundária no domínio GTPase da SEPT2; **(B)** Representação dos três monômeros encontrados no cristal, evidenciando as duas formas possíveis de dimerização. As linhas tracejadas indicam regiões desordenadas. Modificado a partir de ⁴⁶.

Posteriormente, outra estrutura cristalográfica de SEPT2 humana (22-320), complexada com GDP, foi depositada no pdb (código de acesso 2QNR), porém sem novas informações. Dois anos mais tarde, Sirajuddin e colaboradores publicaram a estrutura cristalográfica de SEPT2 de camundongo (33-306), mostrando uma mudança conformacional induzida pelo GTP ⁶³.

A primeira septina com estrutura resolvida (pertencente ao Grupo I) foi a SEPT3 humana, obtida pelo nosso grupo (dados não publicados). Recentemente, a SEPT7 humana (29-297) também teve sua estrutura tridimensional publicada ⁶⁴. Nesse último trabalho, os dados mostraram que SEPT7 se encontra na forma dimérica em solução, com suas subunidades interagindo pela região do domínio GTPase. Porém, a interação pela região NC também foi observada, assim como no caso de SEPT2 ⁶⁴.

A proteína SEPT2 se acumula no sulco de clivagem de células em divisão, desde a anáfase até a telófase, além de interagir com a actina (Figura 1.6) ⁶¹. A citocinese é perturbada pela microinjeção de anticorpos contra SEPT2, gerando células binucleadas ^{20; 21; 61}. A depleção de SEPT2 por RNA de interferência (RNAi) também causa desorganização das fibras de actina, levando a um achatamento na forma celular ⁸.

Kinoshita e colaboradores ⁶⁵ demonstraram que SEPT2, contendo GDP, liga-se a região C terminal do transportador de glutamato em astrócitos, GLAST, regulando assim a

quantidade de glutamato nos astrócitos, o que é importante para a transmissão de sinal apropriada no cerebelo.

A SEPT2, assim como as outras septinas, também está envolvida em vários processos patológicos (Tabela 1.2). O gene *SEPT2* foi identificado como sendo um parceiro fusionado de MLL (mixed lineage leukemia) em leucemia mielóide aguda ⁶⁶, mas pouco se sabe sobre a participação de SEPT2 nesse processo patológico. A sequência codificante do domínio C-terminal de *SEPT2* também foi identificado em pacientes com *systemic lupus erythematosus* (uma doença auto-imune sistêmica), agindo como um auto-antígeno ⁶⁷.

Figura 1.6 – Função de SEPT2 na citocinese. (A) Microscopia de fluorescência de células SiHa em divisão, com Tubulina marcada em vermelho, DNA em azul e SEPT2 em verde. (a) Organização do aparato mitótico no início da telófase. (b) SEPT2 é encontrada próxima ao anel contrátil. (c) Superposição das imagens a e b. (d) Microtúbulos e os núcleos no final da telófase. (e) SEPT2 fica concentrada na região central. (f) Superposição das imagens d e e; (B) Microscopia de fluorescência de células HeLa, desde a anáfase até a intérfase, com DNA marcado em vermelho e SEPT2 em verde. Na anáfase, SEPT2 se acumula na região equatorial da célula e, com a evolução da divisão celular, na intérfase, se dispersa pela célula. Os números indicam o tempo decorrido, em minutos; (C) Regresso da citocinese devido a injeção de anticorpos contra SEPT2, gerando células binucleadas. Os números indicam o tempo decorrido, em minutos, após a injeção do anticorpo; (D) Distribuição da actina (a,d,g), SEPT2 (b,e,h), e de ambas (c,f,i), em células HeLa em anáfase (a-c) e telófase (d-f) e formação de células binucleadas após a injeção de anticorpos contra SEPT2 (g-i). As barras representam 10 μ m ⁶¹.

O gene *SEPT2* também tem sua expressão aumentada em vários tipos de tumores cerebrais, como meduloblastoma, meningioma e astrocitoma ⁶⁸. Além disso, o aumento dos níveis de expressão de *SEPT2* é um evento comum em CCR (carcinoma celular renal), o que sugere sua participação em alguma fase do processo ⁶⁹.

Tabela 1.2 - Localização cromossômica dos genes que codificam septinas e associação das septinas a diversas doenças. Modificado a partir de ²⁶.

Septina Humana	Perfil de expressão	Doenças
SEPT1	Cérebro, linfócitos e outros	Doença de Alzheimer, leucemia e linfoma
SEPT2	Cérebro, linfócitos e outros	Cânceres de cérebro, fígado e renal, Doença de Alzheimer, síndrome de Von Hippel-Lindau e infecções de <i>Listeria</i> .
SEPT3	Específica de cérebro	Câncer de cérebro e Doença de Alzheimer
SEPT4	Cérebro, testículo e olhos	Doença de Alzheimer, cânceres de pele, urogenital e de colon; leucemia e infertilidade masculina
SEPT5	Cérebro, olhos e plaquetas	Leucemia, mal de Parkinson, esquizofrenia e câncer pancreático
SEPT6	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, leucemia e hepatite C
SEPT7	Cérebro e testículo	Cânceres do sistema nervoso e infertilidade masculina
SEPT8	Cérebro, retina e outros	Degeneração da retina
SEPT9	Expressa ubiquamente	Amiotrofia neurálgica hereditária, leucemia, cânceres de mama, ovário, colorectal, cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i> .
SEPT10	Expressa ubiquamente	-----
SEPT11	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, desordem bipolar, leucemia e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i>
SEPT12	Linfócitos e testículos	Infertilidade masculina
SEPT13	Expressa ubiquamente	-----
SEPT14	Testículos	-----

1.5 Formação de agregados protéicos e doenças relacionadas

A habilidade das proteínas de se enovelarem em uma conformação funcional é uns dos processos mais fundamentais na biologia. Sob algumas condições, as proteínas podem sofrer uma mudança em sua estrutura, isto é, a perda de sua conformação nativa ⁷⁰. Essa mudança pode ocorrer na estrutura secundária e/ou terciária das proteínas, levando a formação de agregados com vários níveis de organização. Normalmente, esses agregados não são encontrados nas células, já que uma variedade de mecanismos inibe seu aparecimento e/ou levam a degradação. Porém, em alguns casos, esses agregados se organizam em fibras altamente definidas estruturalmente, formando os depósitos amilóides ⁷¹ (Figura 1.7).

Figura 1.7 – Agregados proteicos. (a) Micrografia eletrônica de agregados amorfos da proteína NusA ⁷². (b) Microscopia eletrônica de transmissão de fibras de lisozima; Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de: (c) e (e) fibras de lisozima (relacionadas com amiloidose sistêmica); (d) Aβ 1-40 (presente em agregados em células de pacientes com doença de Alzheimer); (f) SAA 1-12 (peptídeo N-terminal da proteína amilóide A, relacionada com amiloidose sistêmica); Crio Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de (g) Aβ 1-40; (h) e (i) SAA 1-12 ⁷³. Enquanto os agregados amorfos não possuem nenhum padrão distinguível, as fibras amilóides são altamente organizadas, variando de diâmetro, dependendo do número de protofilamentos constituintes.

O termo amilóide surgiu em 1854, quando Rudolph Virchow usou iodo como marcador de corpos amiláceos (polímeros de glicose) cerebrais, que tinham uma aparência anormal. Quando Virchow percebeu que os corpos amiláceos ficavam azuis, quando tratados com iodo, e violetas, quando tratados com ácido sulfúrico, ele concluiu que a substância anormal em questão tratava-se de celulose e a nomeou de amilóide, derivado do latim *amylum*, que significa amido (naquela época, a distinção entre amido e celulose não existia). Em 1859, Friedreich e Kekule demonstraram a existência de proteínas na massa de amilóides e, a partir de então, esse nome passou a ser usado ⁷⁴.

Apenas em 1968 estruturas amiloidogênicas foram descritas, por Eanes and Glenner, por meio de estudos de difração de raios-X. Nesse estudo, os autores mostraram que essas estruturas correspondiam a filamentos ricos em folhas- β , sendo que essas se dispunham perpendicularmente ao longo do eixo do filamento ⁷⁵. A partir de então, os depósitos amilóides passaram a ser tratados como estruturas altamente organizadas e não mais como agregados amorfos ⁷⁶.

Imagens de Microscopia eletrônica e de Força atômica revelaram que normalmente as fibras são compostas de 2 a 6 protofilamentos, de 2 a 5 nm cada. Esses protofilamentos podem se “enrolar” entre si ou se associarem lateralmente ^{77; 78}. Porém, essas técnicas não permitem uma caracterização em nível molecular que, quando presente (com estudos de peptídios geradores de fibras amilóides e análises de difração de raios-X, EPR, NMR, entre outras), revela variações morfológicas e estruturais das fibras amilóides ^{76; 79}.

A característica crucial das proteínas amiloidogênicas é sua instabilidade estrutural, que pode ser induzida por mutações pontuais ou modificações pós-traducionais e ainda devido a condições locais, como temperatura, pH, co-solutos, entre outras. A mudança conformacional pode promover o aparecimento da doença devido à perda de função das proteínas ou a toxicidade gerada pelos agregados ⁷¹ (Figura 1.8).

Atualmente sabe-se da existência dos amilóides funcionais, isto é, várias proteínas que, em sua conformação nativa, se organizam em fibras amilóides e são funcionais ^{76; 80}. Como exemplo, a proteína TasA, de *Bacillus subtilis* ⁸¹, organiza-se em fibras amilóides como componente do biofilme bacteriano, assim como a proteína Curli de *E. coli* ⁸² e a FapC de *Pseudomonas fluorescens* ⁸³, entre outras funções ^{76; 80}. Além da funcionalidade das fibras amilóides em bactérias, em mamíferos a proteína Pmel17 foi dita como capaz de organizar-se em fibras semelhantes às amilóides, funcionais na produção de melanina ⁸⁴.

Apesar da existência dos amilóides funcionais, várias doenças estão relacionadas com o depósito de agregados protéicos, intra e/ou extracelularmente, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Huntington e algumas doenças de príons (como a encefalopatia espongiforme) ⁸⁰. As doenças causadas pela deposição de proteínas amilóides podem ser classificadas como doenças neurodegenerativas, caso as células afetadas sejam cerebrais; doenças não-neuropáticas, caso as células afetadas não sejam cerebrais; e amiloidose sistêmica, quando a agregação ocorre em diversos tecidos ⁸⁰. Uma tabela contendo as doenças causadas por depósito de proteínas amilóides, assim como as principais proteínas responsáveis e a origem (hereditária ou esporádica), é mostrada na revisão feita por Chiti e Dobson ⁸⁰.

Figura 1.8 – Representação esquemática dos vários estados conformacionais que podem ser adotados por proteínas. A partir do momento em que a proteína é produzida no citoplasma, normalmente ela se encontra ativa e passa a desempenhar sua função normalmente. Para isso, a proteína pode se associar em oligômeros ou até em filamentos funcionais. Porém, a proteína pode ser produzida sem sua conformação definida, devido a algum problema. Essas proteínas podem ser degradadas e eliminadas pela célula e podem ainda ser enoveladas corretamente. As proteínas também podem ter uma conformação parcialmente desenovelada, isto é, possuindo modificações estruturais, quando comparada a proteína nativa. Nesse caso, podem ser renovadas ou degradadas, dependendo de seu estado conformacional. Porém essas proteínas podem se organizar em filamentos amilóides, isto é, formando estruturas ricas em folhas- β , perpendiculares ao eixo das fibras. São essas estruturas que levam ao aparecimento de várias doenças. Todas essas interconversões entre os vários estados conformacionais são regulados por diversas enzimas e mecanismos celulares. Modificado a partir de Chitti⁸⁰.

Apesar do processo de formação das fibras amilóides não ser totalmente compreendido, além de diferir entre diferentes proteínas, algumas fases já foram estabelecidas. O processo geral inclui, inicialmente, uma fase *lag*, na qual ocorre o processo de nucleação, responsável pela formação de pequenos oligômeros. Esses oligômeros são solúveis e resultado da interação entre monômeros total ou parcialmente desenovelados. A associação dos oligômeros dá origem às protofibrilas, que são presursoras dos protofilamentos. Por sua vez, os protofilamentos se associam, dando origem as fibras amilóides ^{80; 85; 86; 87; 88; 89}. Atualmente acredita-se que os agregados não fibrilares são mais tóxicos que as fibras maduras ⁸⁷.

A doença de Alzheimer (AD) é o tipo mais comum e conhecido de doença neurodegenerativa. A doença afeta mundialmente mais de 26,6 milhões de pessoas, com uma tendência de aumento (106,8 milhões em 2050) ⁹⁰. A prevenção, assim como uma terapia satisfatória, ainda não estão disponíveis ⁹¹.

A histopatologia da doença de Alzheimer faz parte de um grupo de desordens neurodegenerativas e é caracterizada por uma profunda perda neuronal e por duas características patológicas: formação de placas senis, no meio extracelular, as quais possuem a proteína A β como maior constituinte. A proteína A β amilóide são derivadas do precursor da proteína amilóide (PPA), cujo gene localiza-se no cromossomo 21. A PPA é uma proteína transmembrana encontrada preferencialmente nas terminações nervosas e sua clivagem anormal produz fragmentos peptídeos que se agregam ^{59; 67; 91} (Figura 1.9 A e C); e os emaranhados neurofibrilares (NTFs), que consistem de uma variedade de estruturas filamentosas anormais no citoplasma celular ^{92; 93} (Figura 1.9 B e C). Esses NTFs possuem como maior componente uma proteína associada à microtúbulos, TAU (que se apresenta hiperfosforilada nessas condições). A presença dessa proteína nos NTFs foi estabelecida pela análise de tecidos cerebrais ^{72; 80; 94}, entretanto, as causas que levam a formação dos NTFs ainda não são estabelecidas.

Continuação

Figura 1.9 – Histopatologia da doença de Alzheimer. Imagens do córtex cerebral de paciente com a doença de Alzheimer, mostrando (A) Placas senis formadas pela proteína A β ; (B) Depósitos da proteína TAU no citoplasma de neurônios, formando os emaranhados neurofibrilares. As barras de aumento representam 100 μm ⁹⁵; (C) Ilustração mostrando as diferenças entre um tecido cerebral normal e outro com placas senis e neurônios contendo emaranhados neurofibrilares; (D) Comparação entre um cérebro saudável e outro afetado pela doença de Alzheimer em estágio avançado. Retirado em 31/08/2011 e modificado a partir de: <http://www.alz.org/brain/11.asp> (autor desconhecido).

Depósitos anormais de septinas têm sido encontrados em emaranhados de neurofibrilas em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer, em corpos de inclusão na doença de Parkinson e em patologias relacionadas do cérebro humano^{59; 96; 97}. Foi identificado também que a SEPT2 é comumente depositada em emaranhados de neurofibrilas no cérebro de doentes com doença de Alzheimer e pode formar complexos heteropoliméricos, interagindo direta ou indiretamente, com a proteína TAU⁵⁹.

O estudo da interação entre proteínas e lipídeos vem sendo usado como alternativa para se entender o processo de formação de estruturas amiloidogênicas. Vários estudos mostraram que a bicamada lipídica pode alterar a cinética de formação das fibras amilóides^{95; 98; 99; 100}, como é o caso das fibras compostas pela proteína A β , cuja nucleação é facilitada pela presença de uma membrana com uma composição específica de lipídeos¹⁰¹. Outros exemplos também foram descritos na literatura: (1) Lipossomos específicos aceleram a formação de fibras de um mutante da proteína huntingtina, envolvida na doença de Huntington¹⁰²; (2) A ligação a membrana é necessária para a cinética de crescimento exponencial de agregados de príons, levando a doenças causadas por príons infecciosos¹⁰³; (3) Em condições normais, a proteína α -sinucleína se encontra predominantemente ligada à membrana plasmática de neurônios dopaminérgicos, o que minimiza sua chance de agregação, mas alguns fatores podem levar a redução dessas proteínas ligadas a membrana, resultando na agregação da α -sinucleína, causando um efeito patológico¹⁰⁴.

A existência de amilóides tanto funcionais quanto patogênicos abre um grande campo para discussão a respeito das diferenças estruturais entre esses. Além disso, os processos regulatórios de formação (e prevenção da formação) das fibras amilóides pode ser a chave para entendermos melhor os processos em que essas estruturas aparecem e, se essas são estruturas funcionais ou patogênicas, dependendo da condição em que se encontram ^{76; 80}. O fato das fibras amilóides apresentarem diversas variações morfológicas, dependendo da estrutura primária em questão (ou até de diferenças na morfologia das fibras produzidas por uma mesma proteína, mas em condições diferentes ¹⁰⁵) revela que, apesar de características comuns, os processos de formação das fibras amilóides podem diferir.

Apesar de haver uma quantidade de informações consideráveis a respeito de SEPT2, seu mecanismo de agregação e/ou a importância da interação com lipídeos, no processo de desenvolvimento das desordens neurodegenerativas ainda permanecem incertos.

CAPÍTULO 2: Estudos bioquímicos e estruturais da septina humana SEPT2: fatores que determinam a formação de agregados

Capítulo 2 Estudos bioquímicos e estruturais da septina humana SEPT2: fatores que determinam a formação de agregados

2.1 Justificativa e Objetivos

Sabe-se que as septinas estão envolvidas em vários processos biológicos essenciais. Em particular, a SEPT2 mostra-se envolvida em alguns casos de câncer e em algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Assim, estudos estruturais poderão ajudar na compreensão dos mecanismos de agregação e/ou formação de filamentos, processo que pode estar associado ao seu papel em doenças neurodegenerativas, assim como em outras patologias relacionadas.

Neste contexto, a proposta desse trabalho foi a realização de um estudo estrutural e bioquímico da septina humana SEPT2 (proteína completa), bem como de seus domínios isolados: o domínio GTPase (SEPT2G), o domínio GTPase juntamente com o N-terminal (SEPT2NG), o domínio GTPase juntamente com o C-terminal (SEPT2GC), e somente o domínio C-terminal (SEPT2C). Assim, considerando todos os pontos abordados, os objetivos específicos deste projeto foram:

- I. Clonagem da ORF de SEPT2 a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano fetal e subclonagem de SEPT2 e de versões truncadas, correspondentes a seus domínios (SEPT2NC, SEPT2GC, SEPT2G e SEPT2C) em vetor de expressão;
- II. Expressão e purificação de SEPT2 e seus domínios em *E. coli*;
- III. Avaliação da estabilidade estrutural das proteínas recombinantes por meio de espectroscopias de dicroísmo circular e emissão de fluorescência, em função de diferentes condições físico-químicas como temperatura e agentes caotrópicos;
- IV. Análises da propensão de SEPT2 e seus domínios a formar agregados e/ou amilóides pela utilização da sonda fluorescente Tioflavina-T (ThT);

- V. Realização de estudos da interação da SEPT2 com outras proteínas, pela técnica de Duplo Híbrido em levedura;
- VI. Investigação da interação de SEPT2 com modelos de membrana.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Clonagem de SEPT2 e de seus domínios

2.2.1.1 Amplificação e clonagem em vetor de propagação

Para a amplificação do cDNA que codifica a SEPT2, assim como de seus domínios separadamente, utilizou-se a técnica da *Reação em Cadeia da Polimerase* - PCR, em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) tendo como molde uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano. Para isso foram sintetizados *primers* (GIBCO-BRL) baseados na sequência (Número de acesso no *GenBank*: NM_004404), que flanqueavam as regiões codificantes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação do cDNA de SEPT2 e de seus domínios.

Oligonucleotídeos	Seqüência de nucleotídeos
1 SEPT2-Forward- <i>Nde</i> I	5'CCC <u>ATATGT</u> CTAAGCAACAGCCAACTCAG 3'
2 SEPT2- Reverse- <i>Xho</i> I	5'CCCTCGAGTCATTACACGTGGTGCCCGAGAGC 3'
3 SEPT2-GTPase-Forward- <i>Nde</i> I	5'CCC <u>ATATGGG</u> TTTTGAGT TCACACTGATGG 3'
4 SEPT2-GTPase-Reverse- <i>Xho</i> I	5'CCCTCGAGTCATTAGCCGCCTCTCTTGAGTCTCTC 3'
5 SEPT2C-Forward- <i>Nde</i> I	5'AGC <u>ATATGT</u> GGGGCAGGAAAGTGGAGAATG AG 3'

*Os nucleotídeos grifados fazem parte do sítio de reconhecimento da enzima.

A determinação dos domínios da SEPT2 foi realizada como descrito anteriormente para a SEPT4 (44). Com os oligonucleotídeos descritos acima foi possível clonar as sequências correspondentes a SEPT2 1-361 (oligonucleotídeos 1 e 2), SEPT2NG 1-308 (oligonucleotídeos 1 e 4), SEPT2GC 35-361 (oligonucleotídeos 2 e 3), SEPT2G 35-308 (oligonucleotídeos 3 e 4) e SEPT2C 309-361 (oligonucleotídeos 2 e 5). Nas reações de PCR foram usados os seguintes reagentes (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Reagentes utilizados na reação de amplificação.

Reagentes	Concentração final
Molde	50 ng
Primer <i>forward</i>	100 pmol
Primer <i>reverse</i>	100 pmol
dNTP's (Desoxinucleotídeos tri-fosfato)	0,2 mM
<i>High Fidelity PCR Enzyme Mix</i> (Fermentas)	1 unidade
Tampão da enzima	[1X]
MgSO ₄	2,5 mM
Água Milli Q	q.s.p. 50 µl
Volume final	50 µl

Para a amplificação de SEPT2, foram usados 500 ng da biblioteca de cérebro fetal humano (Clontech) como molde. Os domínios foram amplificados tendo como molde um vetor contendo SEPT2.

Para as reações, o ciclo de amplificação foi realizado aquecendo as amostras a 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida de 25 ciclos: 94°C por 1 minuto (desnaturação das fitas), 60°C por 0,5 minuto (hibridização dos oligonucleotídeos) e 68°C por 1,5 minutos (extensão das fitas). Por fim, foi feita uma extensão final por 5 minutos a 68°C.

As temperaturas de hibridização variaram de acordo com a temperatura de fusão (T_m) dos oligonucleotídeos.

Os produtos amplificados foram fracionados em gel de agarose 1%, seguidos de purificação utilizando o *kit Wizard SV gel and pCR clean-up system* (Promega®). Em seguida foi feita uma reação que promovesse a ligação das sequências nucleotídicas de interesse ao vetor de propagação pGEMT-Easy. As reações de ligação foram compostas de 50 ng de produto de PCR, 20 ng do plasmídeo pGEMT-Easy, 1X de tampão de ligação e 3 unidades de T4 DNA Ligase. A mistura foi incubada por 16 horas a 4 °C.

Aos plasmídeos recombinantes foram dados os seguintes nomes: pGEM_SEPT2, pGEM_SEPT2NG, pGEM_SEPT2GC, pGEM_SEPT2G e pGEM_SEPT2C.

Após o tempo de ligação todo o volume da reação anterior foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com Cloreto de Cálcio¹⁰⁶. As células se dividiram durante 1 hora, em meio LB (Meio de cultura Luria-Bertani) a 37°C, antes de serem plaqueadas em meio LB Agar, contendo o antibiótico Ampicilina [100 µg/mL], IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) [0,4mM] e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-

indolil-beta-D-galactopiranosídeo) [100 µg/mL]. As placas foram incubadas na estufa a 37°C *overnight*.

As colônias positivas obtidas (cor branca) foram crescidas em meio LB sob seleção. Foi então extraído o DNA plasmidial dessas colônias por lise alcalina ¹⁰⁶, o qual foi submetido à análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, para verificar a presença do inserto.

2.2.1.2 Sequenciamento

Dentre os clones positivos, cinco deles de cada construção, foram escolhidos aleatoriamente para terem suas sequências determinadas. Para o sequenciamento foi utilizada a técnica de didesoxinucleotídeo marcado ¹⁰⁷ em um sequenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer). Os oligonucleotídeos, SP6 e T7, próprios para o vetor pGEMT-Easy foram utilizados.

2.2.1.3 Construção dos vetores de expressão

Após a confirmação das clonagens, 2 µg de DNA plasmidial dos clones em pGEMT-Easy foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Os fragmentos de DNA liberados foram purificados com o kit *Wizard SV gel* e *PCR clean-up system* (Promega®). Os fragmentos purificados foram inseridos no plasmídeo de expressão procarioto pET-TEV previamente linearizado com as mesmas endonucleases. O vetor escolhido para a construção dos plasmídeos de expressão, pET-TEV, é uma versão modificada do pET28a (Novagen), que possibilita a produção da proteína fusionada com cauda de histidina no N-terminal, seguida por um sítio de reconhecimento da protease viral *Tev*. O plasmídeo escolhido carrega a região promotora do bacteriófago T7, designada para a expressão de altos níveis de proteína.

A proporção molar de 1:3 (plasmídeo: fragmento) foi utilizada na reação de ligação em tampão de ligação [1X] (Fermentas) e 1 U de T4 DNA ligase (Fermentas), sendo a mistura incubada a 4 °C, por 16 horas. As reações de ligação foram usadas para transformar a

linhagem de *E. coli* DH5 α e as possíveis colônias positivas foram selecionadas em meio de cultura LB contendo 30 μ g/mL de canamicina. Os clones positivos foram confirmados após extração do DNA plasmidial das colônias seguida de análise de restrição (com as enzimas já citadas) em eletroforese em gel de agarose 1%.

A fim de expressar as proteínas em *E. coli*, células competentes por tratamento com cloreto de cálcio da linhagem Rosetta(DE3) (mutante para a lactose permease – *lacY* - ;deficiente em proteases *lon* e *ompT*; contendo plasmídeo que codifica genes *argU*, *argW*, *glyT*, *IleX*, *leuW*, *metT*, *proL*, *thrT*, *thrU*, and *tyrU*) foram transformadas com 30 ng dos plasmídeos recombinantes.

Os plasmídeos de expressão receberam as seguintes denominações: pTEV_SEPT2, pTEV_SEPT2NG, pTEV_SEPT2GC, pTEV_SEPT2G e pTEV_SEPT2C

2.2.2 Expressão e purificação de SEPT2 e de seus domínios

Foi feito um pré-inóculo em LB, contendo o antibiótico 30 μ g/mL de canamicina, para cada construção. Esse pré-inóculo foi incubado a 37°C, *overnight*, sob agitação de 250 rpm e a seguir diluído (1:50) em meio LB contendo 30 μ g/mL canamicina. As células foram crescidas, em constante agitação a 37°C, até atingir uma D.O._{600 nm} entre 0,4 e 0,6. Depois de atingida essa densidade óptica, a cultura foi induzida pela a adição de 0,4 mM de IPTG. Após a indução as culturas foram incubadas a 18°C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm. A seguir, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 10.000g e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 5ml de Tris 25mM, glicerol 10%, pH 7,8 (Tampão A), acrescido de 0,1mM GTP e 0,1mg/ml de Lisozima. A suspensão foi incubada por 30 minutos em gelo e em seguida as células foram lisadas por sonicação em 10 ciclos (15 segundos de pulso ultra-som intercalados com 15 segundos de descanso) em banho de gelo. As células lisadas foram centrifugadas por 30 minutos a 20.000xg, separando assim a fração sobrenadante (solúvel) e a precipitada. A fração solúvel foi usada para a purificação das proteínas recombinantes. Alíquotas foram retiradas ao longo do processo e então submetidas à SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli¹⁰⁸, para análise.

Inicialmente foi feita uma purificação por cromatografia de afinidade, usando uma coluna de Ni-NTA (2ml, Qiagen), já que as proteínas recombinantes foram produzidas como

proteínas de fusão a um hexapeptídeo de histidina na porção N-terminal. A coluna foi equilibrada com 10 volumes do Tampão A e, em seguida, as frações solúveis dos extratos celulares contendo as proteínas SEPT2, SET2NG, SEPT2GC, SEPT2G e SEPT2C foram aplicadas em colunas, individualmente para cada proteína. Em todos os casos, a coluna foi então lavada com 10 volumes do Tampão A e, a seguir, foram aplicados mais 10 volumes do Tampão A contendo 10 mM de Imidazol, para retirar contaminantes ligados com baixa afinidade. Finalmente, as proteínas de interesse foram eluídas em 10 volumes do Tampão A contendo 300 mM de Imidazol.

O eluato foi concentrado e aplicado numa coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 (no caso de SEPT2C foi usada a Superdex 75) (Amersham-Pharmacia), previamente equilibrada com o Tampão A. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, monitorado pela absorbância em 280 nm. O material eluído foi coletado em frações de 0,5 mL. Alíquotas do eluato foram retiradas e então submetidas à SDS-PAGE 15%.

Todas as medidas subseqüentes foram realizadas com as proteínas diluídas no Tampão A, exceto quando especificado um tampão diferente.

2.2.3 Caracterização estrutural e funcional

2.2.3.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica sensível para estimar a porcentagem dos elementos de estrutura secundária de proteínas, podendo também ser utilizada no monitoramento de mudanças conformacionais na estrutura secundária, interação com ligantes, cinética de “*folding/unfolding*” de proteínas, entre outros¹⁰⁹.

Os espectros de CD de proteínas podem ser medidos na região do ultravioleta próximo e distante. No primeiro caso ($\lambda = 250\text{-}300\text{ nm}$) essa região é sensível a estrutura terciária da proteína, tendo contribuição das cadeias laterais aromáticas e das pontes dissulfeto. Já a região do ultravioleta distante ($\lambda = 190\text{-}250\text{ nm}$) fornece informações a respeito da estrutura secundária, sendo o grupo amida o cromóforo¹⁰⁹. Proteínas com grupos prostéticos, como o

grupo heme, possuem banda de CD próximo aos 300 nm, a qual reflete a conformação e o meio onde estão esses grupos ¹⁰⁹.

As análises de CD foram realizadas em uma concentração de 5 μ M, utilizando um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Japão), utilizando uma cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 200-250 nm, e uma média foi obtida a partir de 16 varreduras, para cada espectro.

Foi analisada também a reversibilidade do processo de desenovelamento parcial de SEPT2 e de seus domínios, quando expostos ao aumento de temperatura. Inicialmente, as proteínas tiveram seu conteúdo de estrutura secundária mensurado a 10 °C e, após as medidas, foram aquecidas a 37 °C e a 45 °C durante 60 minutos. Após aquecimento, as amostras foram medidas novamente, e então incubadas em gelo por 60 minutos, antes de terem seu conteúdo de estrutura secundária verificado novamente.

2.2.3.2 Fluorescência intrínseca

O fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por elétrons na camada de valência do átomo, passando do seu estado fundamental para o estado excitado (de maior energia). O estado excitado não é estável para o elétron e, ao retornar ao estado fundamental, há liberação de energia por meio de emissão de radiação. A radiação emitida possui menor energia (devido à perda de energia por conversões internas) e, consequentemente, um maior comprimento de onda ¹¹⁰.

A técnica de espectroscopia de fluorescência é utilizada para obtermos informações a respeito da estrutura terciária de proteínas. Nas proteínas, três aminoácidos absorvem luz de forma significativa na região do UV próximo (340 – 255 nm), Triptofano (W), Tirosina (Y) e Fenilalanina (F), permitindo uma análise local do ambiente desses aminoácidos baseado na emissão intrínseca de fluorescência ¹¹⁰.

Utilizando um espectrofluorímetro modelo K2 ISS, soluções de 5 μ M SEPT2, SEPT2NG, SEPT2GC, SEPT2G e SEPT2C foram medidas, em uma cubeta de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico. As amostras foram excitadas em 295 nm e a intensidade da luz emitida foi monitorada entre 300 e 450 nm. A excitação em 295 nm corresponde ao monitoramento

do Triptofano (que possui um máximo de absorção em 280 nm), evitando uma sobreposição com a absorção da Tirosina (que também absorve em 280 nm). Dessa forma, somente os Triptofanos foram investigados.

Todas as amostras foram medidas três vezes, e uma média dessas medidas foi feita. As medidas foram feitas a 10 °C e os dados foram analisados com o *software* Origin 7.0.

2.2.3.4 Ensaios de hidrólise de GTP

Atividades de ligação e hidrólise do GTP têm sido demonstradas *in vitro* a partir de septinas recombinantes purificadas^{6; 55; 57; 111}. Com o intuito de validar a atividade da proteína recombinante, foi usado um método não-radioativo, que se baseia na liberação do nucleotídeo por desnaturação química com ácido perclórico, baseado naquele descrito por Seckler e colaboradores¹¹².

Inicialmente, a cultura de bactérias expressando SEPT2 foi lisada em um tampão contendo excesso de GTP (150 µM) e purificada de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

De acordo com o método, SEPT2 foi incubada com ácido perclórico gelado (concentração final 0,5 M) por 10 minutos a 0°C. A proteína desnaturada foi removida por centrifugação (10 min., 14000xg, 4°C). Uma alíquota do sobrenadante foi neutralizada com a adição de 1/6 do volume de 1 M K₂HPO₄, 0,5 M de ácido acético e 1/6 do volume de 3 M de KOH a 0°C. Formou-se um precipitado e a amostra foi novamente centrifugada (10 min., 14000xg, 4°C) para retirada do precipitado. O sobrenadante foi removido e armazenado a 20°C por 1h. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada (10 min., 14000xg, 4°C) e o conteúdo de nucleotídeo (GDP ou GTP) liberado foi determinado utilizando uma coluna de troca aniônica Protein Pak DEAE 5 PW (Waters). A análise foi realizada em um cromatógrafo Alliance 2695 (Waters). Controles com GTP (10 µM), GDP (10 µM), mix de GTP/GDP (10 µM) e apenas o ácido perclórico (0,5 M), foram usados.

2.2.4 Formação de estruturas amiloidogênicas

Essencialmente, a agregação de proteínas é uma associação de moléculas idênticas⁷², agregados esses que podem ser classificados como ordenados e desordenados, com base em suas características⁹⁴.

Inúmeras patologias humanas estão relacionadas com o desenovelamento de proteínas, levando a conversão de cadeias polipeptídicas nativas a um estado fibrilar altamente organizado, ricos em folhas- β ^{92; 93}. A formação desses amilóides é uma característica marcante dessas disordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Atualmente são descritas mais de 40 doenças relacionadas à presença de amilóides, cada qual tendo um padrão clínico distinto e associada à agregação predominante de um tipo específico de proteína⁸⁰.

Como foi identificada a presença de SEPT2 em emaranhados de neurofibrilas no cérebro com doença de Alzheimer⁵⁹, torna-se importante avaliar a propensão de SEPT2 para se organizar em estruturas amiloidogênicas, assim como realizar estudos estruturais para determinar as condições em que essas estruturas aparecem.

2.2.4.1 Programas de predição *in silico*

Atualmente existem alguns programas de predição da agregação de proteínas e de formação de estruturas amilóides, como TANGO, WALTZ e Zygggregator. TANGO é um algoritmo mecânico estatístico que faz predição da agregação de proteínas por suas folhas- β , com base nos princípios físico-químicos da formação de folhas- β ^{113; 114}. WALTZ é um algoritmo que prediz regiões com alta probabilidade de formar filamentos amilóides, baseado na sequência de aminoácidos, propriedades físicas e parâmetros estruturais¹¹⁵. O Zygggregator, assim como o WALTZ, é utilizado para a predição de formação de amilóides em regiões específicas de uma proteína¹¹⁶.

Assim, em uma análise preliminar, a sequência de aminoácidos de SEPT2 foi submetida a esses programas de predição, a fim de analisar a propensão de SEPT2 para

formar agregados em folhas β ou filamentos amiloidogênicos (<http://tango.crg.es/>, <http://waltz.vub.ac.be/> and <http://www-vendruscolo.ch.cam.ac.uk/zyggregator.php>).

2.2.4.2 Desnaturação térmica

Como dito anteriormente, as estruturas amilóides são ricas em folhas- β , e apenas o desenovelamento parcial de uma região da proteína pode levar a formação dessas estruturas altamente organizadas^{92; 93}.

SEPT2 e SEPT2G (3 μ M) foram incubadas nas temperaturas de 15°C, 30°C, 45°C e 60°C, durante 30 minutos. Após esse período de incubação, as proteínas foram acondicionadas em gelo e, então medidas. As análises de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Japão), utilizando uma cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 200-250 nm e uma média foi obtida a partir de 16 varreduras para cada espectro.

2.2.4.3 Análise do conteúdo de nucleotídeo

As septinas são proteínas ligantes de GTP e essa ligação confere estabilidade a essas proteínas^{57; 117}. No caso de SEPT4G, durante o desenovelamento térmico há a formação de um intermediário estrutural, responsável pela formação de estruturas amilóides, que não retém o nucleotídeo⁵⁸.

Para analisar o conteúdo de nucleotídeo ligado a proteína após o aquecimento, SEPT2G foi incubada (3 mL a 5 μ M) a 37°C e a 45°C por 90 minutos. Após esse tempo de incubação, as amostras foram concentradas em um concentrador Millipore (10 kDa), até restar um volume de 200 μ L, que foi posteriormente completado com tampão para 3 mL. As amostras filtradas pelo concentrador foram analisadas em um espectrofotômetro U-2001 Hitachi, em um intervalo de comprimento de onda de 330 a 240 nm, já que o comprimento de

onda de máxima absorção dos nucleotídeos contendo a base guanina é em 254 nm. Como controle negativo, o mesmo procedimento foi utilizado com SEPT2G mantida a 4 °C.

2.2.4.4 Espalhamento de luz a ângulo fixo

Com o intuito de estudar a cinética de agregação em função da temperatura, SEPT2 e SEPT2G (5 μ M) foram centrifugadas (16.000xg por 10 minutos a 4°C) e cada amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico. Utilizando um espectrofluorímetro modelo K2 ISS, equipado com um circulador refrigerado, as amostras foram iluminadas com luz de comprimento de onda de 350 nm e a intensidade do espalhamento foi coletada no mesmo comprimento de onda, em um ângulo fixo de 90°. Medidas foram feitas em 15°C, 30°C, 45°C e 60°C. Todas as medidas de intensidade foram dadas em unidades arbitrárias após subtração da luz espalhada pelo tampão. Os dados foram analisados usando o *software* Origin 7.0.

2.2.4.5 Espectroscopia de Fluorescência: Emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavina-T (ThT)

Cada unidade constituinte da fibra amilóide (protofilamento) está arranjada de maneira que a cadeia polipeptídica forma uma folha- β , perpendicularmente ao eixo da fibra⁷⁸ (Figura 2.1 A). Essas fibras podem ser isoladas de pacientes com doenças neurodegenerativas ou podem ser produzidas *in vitro*, em condições semi desnaturantes⁸⁰. Para monitorar a formação dessa estrutura, utiliza-se a molécula fluorescente Thioflavina T (ThT) (Figura 2.1 B).

O ThT é um marcador clássico utilizado para visualizar placas compostas de β -amilóides encontradas em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. Quando o ThT liga nos oligômeros amilóides ele sofre uma alteração característica em seu espectro de emissão, que quando excitado em 450 nm, resulta em um sinal de fluorescência em 482 nm¹¹⁸ (Figura 2.1 C).

Figura 2.1 - Marcador clássico para fibras amilóides. (A) Estrutura das fibras formadas pelo domínio C-terminal (218-289) da proteína de fungo HET-s. O esquema mostra as 4 folhas- β em laranja, e a longa volta entre $\beta 2$ e $\beta 3$. Moléculas flanqueadoras ao longo do eixo da fibra são mostradas em cinza ⁸⁰; (B) Estrutura da molécula Tioflavina T. As dimensões estão indicadas na figura ¹¹⁹; (C) Representação esquemática de uma folha- β . Os átomos da cadeia principal estão indicados como N, C e $C\alpha$, e as cadeias laterais por R. Ligações de Hidrogênio não são indicadas e o esquema é válido tanto para folhas- β paralelas e antiparalelas. O suposto canal de ligação do ThT está indicado pela flecha de duas pontas ¹¹⁹.

Utilizou-se um espectrofluorímetro modelo K2 ISS para as medidas de fluorescência do ThT. As proteínas SEPT2 e SEPT2G em uma concentração de 5 μM foram usadas nesse experimento. As proteínas foram incubadas com 80 μM ThT e excitadas com um comprimento de onda de 450 nm, sendo a emissão monitorada em 482 nm. As medidas foram feitas em temperaturas de 15°C, 30°C, 45°C e 60°C e a emissão de fluorescência foi coletada em cada temperatura por 90 minutos. Alternativamente, também foram realizadas medidas a 4°C durante 5 dias, apenas para SEPT2G.

2.2.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para caracterizar os agregados formados por SEPT2, a proteína foi incubada a 37°C por 30 minutos e a 4°C por cinco dias (alíquotas foram retiradas diariamente). As amostras

foram aplicadas sobre um filme de carbono em “grades” próprias para a visualização na MET. As “grades”, com as amostras depositadas, foram então fixadas com acetato de uranila 1% filtrado e, conseqüentemente, lavadas para retirar o excesso do reagente. As imagens foram adquiridas com um Microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 120, trabalhando a 80kV, no Laboratório de Caracterizações Estruturais (LCE), do DEMa-UFSCar, São Carlos, Brasil. Imagens adicionais foram feitas utilizando um Microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1230, 120 kV, no Centro de Investigações Biológicas, Madri, Espanha.

2.2.5 Estudos de interação de SEPT2 com lipídeos

Um grande número de reações biológicas ocorre nas membranas, constituídas em sua maior parte por proteínas e lipídios ¹²⁰. SEPT2 possui uma região polibásica conservada, que é predita ser responsável pela ligação a fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) ³⁶, porém não se sabe ao certo qual a função e a importância biológica da ligação de SEPT2 a PtdIns(4,5)P₂, o que torna importante o estudo dessa interação.

Na literatura é escassa a quantidade de informações a respeito da interação de septinas com lipídeos. Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que o lipídeo PtdIns(4,5)P₂ promove a organização dos filamentos de septinas do fungo em questão ¹²¹. Já para as septinas de humanos, há informações a respeito de SEPT4, que interage diretamente com fosfatidil inositol (4,5) bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) e fosfatidil inositol (3,4,5) trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P₃). Pelo fato de SEPT2 possuir a mesma sequência de aminoácidos de SEPT4, na região polibásica, foi predito que os mesmos resultados seriam válidos para SEPT2 ³⁶. Porém, a única evidência experimental a respeito da interação de SEPT2 com lipídeos foi o fato de SEPT2 ser encontrada predominantemente com a fração de membranas, após o fracionamento de fibroblastos ¹²².

Adicionalmente, foi verificada a interação do complexo recombinante SEPT2, SEPT6 e SEPT7 com lipídeos ¹²³. Segundo esse trabalho, o complexo de septinas tem a capacidade de modificar a morfologia de lipossomos gigantes constituídos de PC e PI (Fosfatidilcolina e Fosfatidilinositol), induzindo um processo de tubulação.

2.2.5.1 Monocamadas de Langmuir

Monocamadas fosfolipídicas de Langmuir constituem um modelo bem estabelecido para o estudo de membranas biológicas, já que mimetizam a interface entre o fosfolipídio e sua vizinhança aquosa^{124; 125; 126; 127}. Estas monocamadas são formadas a partir do espalhamento de uma molécula anfifílica insolúvel, como um fosfolipídio, na interface ar-água.

A técnica possibilita ainda um controle da organização da monocamada formada em termos de sua compactação e arquitetura, através de uma barreira móvel, capaz de varrer as moléculas presentes na interface. Dessa forma, constituem um modelo interessante para o estudo biofísico de membranas, uma vez que uma membrana biológica pode ser considerada como formada por duas monocamadas acopladas. A subfase aquosa suporta os filmes mimetiza os meios intra e extracelulares e, sendo assim, moléculas de interesse podem ser dissolvidas para o estudo de interações em nível molecular. Além do elevado controle da composição da monocamada lipídica, as propriedades físico-químicas da subfase, como pH, força iônica e temperatura, também podem ser variados¹²⁰.

SEPT2, SEPT2NG e SEPT2G, de 0,5 a 5 μM , foram utilizadas para esse estudo, sendo esta última o controle negativo, já que não possui a região polibásica necessária para a interação com $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. As monocamadas utilizadas continham 5% de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ e 95% de DPPC (1,2 Dipalmitoil-fosfatidilcolina) que é o fosfolipídio encontrado em maior abundância nas células animais. Anterior à adsorção das proteínas, o filme lipídico foi espalhado de modo a se manter na pressão superficial inicial de 30 mN m^{-1} , visto que este valor é correspondente ao empacotamento lipídico de uma membrana biológica¹²⁴.

Os experimentos foram realizados com o auxílio da pós doutoranda Thatyane Morimoto Nobre, em um tensiômetro MicroTroughX (Kibron- England), utilizando o software Filmware 3,57, junto ao grupo de Polímeros do IFSC.

2.2.5.2 PM-IRRAS

A espectroscopia de Infravermelho (IR) se caracteriza por fornecer informações a respeito das transições vibracionais das ligações químicas nas moléculas, isto é, a interação da

radiação (da ordem de 2 - 20 μm) se dá com as ligações e grupos químicos das moléculas. Como as ligações químicas possuem frequências de oscilação características, e os grupos químicos são diversos, cada molécula possui um espectro característico de IR, possibilitando assim a obtenção de informações estruturais ¹²⁸.

A técnica PM-IRRAS (Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy) é um tipo especial de espectroscopia de infravermelho, que permite a análise de moléculas na interface ar/água. Deslocamentos das bandas de absorção podem ser usados para descrever a estrutura e o comportamento de moléculas em uma monocamada, por exemplo ¹²⁹; ¹³⁰. Além disso, a modulação da polarização possibilita a obtenção de informações sobre a orientação e cada um dos grupos químicos com relação à interface.

Segue abaixo duas tabelas, a primeira (Tabela 2.3) mostrando as características das bandas de infravermelho para as proteínas. Já a segunda (Tabela 2.4) mostra as atribuições para a banda Amida I, dependendo da estrutura secundária da proteína.

Na Tabela 2.3 abaixo são mostradas as bandas de infravermelho, características para proteínas. Já a Tabela 2.4 mostra as atribuições para a banda Amida I, que estão relacionadas ao estiramento da ligação C=O, e que é sensível a estrutura secundária da proteína.

Tabela 2.3 - Bandas de absorção de IR para proteínas ¹²⁸.

Banda	Número de onda (cm^{-1})	Tipo de vibração
A	3300	Estiramento N-H em ressonância com Amida II
B	3110	
I	1653	80% estiramento C=O; 10% estiramento C-N; 10% curvatura N-H
II	1567	60% curvatura N-H; 40% estiramento C-N
III	1299	30% estiramento C-N; 30% curvatura N-H; 10% estiramento; 10% curvatura O=C-N; 20% outros
IV	627	40% curvatura O=C-N; 60% outros
V	725	Curvatura N-H
VI	600	Curvatura C=O
VII	200	Torção C-N

Tabela 2.4 - Bandas de absorção de IR para proteínas na região de Amida I ¹²⁸.

Número de onda (cm⁻¹)	Tipo de vibração
1695-1670	Estruturas β intermolecular
1690-1680	Estruturas β intramolecular
1666-1659	Hélice “3-volta”
1657-1648	α - Hélice
1645-1640	Estruturas desordenadas
1640-1630	Estruturas β intramolecular
1625-1610	Estruturas β intermolecular

As medidas foram feitas com o auxílio da pós-doutoranda Thatyane Morimoto Nobre, utilizando um equipamento PMI550 (KSV Instruments – Finlândia), com uma lâmpada de Carbetto de Silício (Globar). Para cada medida foram coletados 6000 espectros, a uma taxa de 10 varreduras por segundo. O equipamento está acoplado a uma cuba de Langmuir, e espectros a diferentes valores de pressão superficial são obtidos *in situ*.

Foram feitas medidas de SEPT2, a 70 nM, na ausência de monocamada e na presença de monocamada de DPPC e de PtdIns(4,5)P₂, a temperatura ambiente (20 °C) e a 37 °C. Nas medidas a 37 °C, a proteína foi aquecida a 37 °C por 30 minutos e depois resfriada em gelo. Em todos os casos os espectros foram coletados de 5 em 5 mN m⁻¹, até uma compressão máxima de 40 mN m⁻¹. Os dados foram analisados usando o *software* Origin 7.0.

2.2.6 Investigação da região de dimerização de SEPT2

2.2.6.1 Produção de proteínas mutantes de SEPT2 e Cromatografia de exclusão molecular

Sirajuddin *et al.* publicaram um trabalho a respeito da região de dimerização de SEPT2 (1-315), faltando os últimos 46 aminoácidos do C-terminal, que fazem parte de um *coiled coil* ⁴⁶. Eles notaram que SEPT2 podia dimerizar-se por duas interfaces, a interface G (pelo domínio GTPase) e a interface NC (pelas regiões N e C terminais). Visando identificar

qual a região está envolvida na dimerização de SEPT2 (1-315), eles construíram 5 proteínas mutantes: F20D, V27D, F156D, W260A, H270D, sendo que os dois primeiros mutantes possuem alterações que estão na interface NC, e os demais na interface G (Figura 2.2). Por filtração em gel eles perceberam que mutantes na interface NC não causavam o rompimento do dímero, porém mutações na interface G geravam moléculas na forma monomérica. Portanto a interface mais relevante na dimerização de SEPT2 (1-315) seria a interface G ⁴⁶.

Figura 2.2 - Detalhe das interfaces de dimerização de SEPT2 e posição das mutações propostas. SEPT2 (1-315) possui duas regiões de dimerização em solução, a interface G (pelo domínio GTPase) e a interface NC (pelas regiões N e C terminais). Os quadros à direita representam a interface G (mutações F156D, W260A e H270D) e os quadros à esquerda representam a interface NC (mutações F20D e V27D).

Esse resultado gera a dúvida de que se as proteínas estivessem completas (com o C-terminal), sua região de dimerização poderia ser somente a interface NC, já que o filamento formado por Septinas 2, 6 e 7 completas, SEPT2 forma dímeros pela interface NC ⁴⁶.

Então, com o intuito de avaliar a influência do C-terminal na dimerização de SEPT2, os mesmos mutantes de SEPT2 (1-315), produzidos no trabalho de Sirajuddin *et al.*, foram

reproduzidos para SEPT2 inteira. Ainda, foram desenhados mais dois novos mutantes pontuais, cujas alterações se restringiram ao C-terminal.

Foram então comprados 7 plasmídeos contendo as mutações desejadas, junto a empresa *Mutagenex*: F20D, V27D, F156D, W260A, H270D, L329D e M332D. As duas últimas são as mutações na região C-terminal, portanto ausentes no trabalho anteriormente citado. As proteínas mutantes foram expressas e purificadas da mesma forma que SEPT2, com exceção de que o tampão usado em todo o processo foi o mesmo usado pelo grupo de Sirajuddin: 50mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 5 mM DTE, a fim de comparar os resultados posteriormente.

Para verificar o estado de oligomerização das proteínas, foi usada a Cromatografia de exclusão molecular, com as colunas Superdex 75 e Superdex 200. Com essa mesma finalidade também foram realizados experimentos de Ultracentrifugação Analítica, no Centro de Investigações Biológicas, em Madri, Espanha.

2.2.6.2 Ultracentrifugação Analítica

A Ultracentrifugação Analítica é a técnica mais versátil e rigorosa para determinar a massa molecular e propriedades hidrodinâmicas e termodinâmicas de proteínas e outras macromoléculas ¹³¹.

Basicamente há dois tipos de experimentos com a Ultracentrifugação Analítica: Velocidade de Sedimentação e Equilíbrio de Sedimentação (Figura 2.3). No primeiro caso o campo centrífugo é elevado, tal que a força de centrifugação é maior que a difusão, o que permite separar as moléculas com base no seu coeficiente de sedimentação. Essa separação depende da massa molecular, da densidade e da forma da molécula e é utilizada para verificar a homogeneidade da amostra, fazer uma estimativa da massa molecular e calcular parâmetros hidrodinâmicos ¹³¹.

Já no caso do Equilíbrio de Sedimentação o campo centrífugo é moderado, com o intuito de equilibrar as forças de sedimentação e difusão (condição de equilíbrio). Nessas condições, as moléculas se distribuem, formando um gradiente de concentração. Essa distribuição depende exclusivamente da massa molecular e é indicado para cálculo da média

da massa molecular das espécies existentes (daí a importância de trabalhar com uma solução homogênea, com uma só espécie e sem agregados), e de parâmetros termodinâmicos¹³¹.

Figura 2.3 - Esquema dos experimentos de Ultracentrifugação Analítica. (A) Cella onde a amostra e o tampão puro são colocados e ilustração de um espectro simples durante a sedimentação das proteínas. (B) Diferenças entre Velocidade de Sedimentação e Equilíbrio de Sedimentação. Modificado a partir de¹³¹.

Todos os experimentos de Ultracentrifugação analítica foram feitos em uma ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA), equipada com um sistema de detecção no UV-visível. Um rotor Ti50 com oito buracos e uma cela padrão de setor duplo (12 mm passo óptico) foram usados. O tampão de medida foi 20 mM de fosfato de sódio, 2% de Glicerol, pH 7.4, e todas as medidas foram feitas a 10 °C.

Nos experimentos de Velocidade de Sedimentação, a concentração de SEPT2 e de seus mutantes foi praticamente a mesma (variando de 4 a 8 μM) e a velocidade empregada foi de 40 Krpm. Já nos experimentos de Equilíbrio de Sedimentação, foram medidas 3 concentrações diferentes de cada proteína e a velocidade empregada foi de 17 Krpm.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Amplificação e clonagem do cDNA de SEPT2 e seus domínios

A reação de amplificação do cDNA de SEPT2, assim como de seus domínios separadamente (Figura 2.4), foi realizada de acordo com as condições descritas em materiais e métodos. A enzima *Taq Platinum High Fidelity* foi usada para reduzir o risco de mutações, já que possui atividade exonucleásica 3' → 5'.

Figura 2.4 - Amplificação do cDNA codificante da SEPT2 e das sequências parciais correspondentes aos domínios. Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (1) *SEPT2*; (2) *SEPT2GC*; (3) *SEPT2G*; (4) *SEPT2NG*; (M2) 100 bp Plus DNA Ladder (Invitrogen); (5) *SEPT2C*.

Como esperado, os produtos resultantes das amplificações possuíam bandas correspondentes a 1023 pb, 981 pb, 924 pb, 822 pb e 168 pb, para *SEPT2*, *SEPT2GC*, *SEPT2NG*, *SEPT2G* e *SEPT2C*, respectivamente.

Os produtos amplificados foram então clonados no vetor de propagação pGEMT-*Easy* e, em seguida, os fragmentos foram subclonados no vetor de expressão pET-TEV, uma versão modificada do pET28a, que possibilita a produção da proteína fusionada com cauda de histidina no N-terminal, seguida por um sítio de reconhecimento da protease Tev. O plasmídeo escolhido carrega a região promotora do bacteriófago T7, designada para a expressão de altos níveis de proteína.

Uma análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *XhoI* foi feita com os clones transformantes para a confirmação da clonagem, confirmando a presença dos fragmentos gênicos.

2.3.2 Análise de sequências

A confirmação da sequência dos clones de interesse foi feita. A partir da sequência de aminoácidos deduzida (Quadro 2.1) foram obtidos os parâmetros acerca da estrutura primária dos produtos recombinantes (Tabela 2.5), necessários para as análises posteriores.

1	MSKQQPTQFINPETPGYVGFANLPNQVHRKS <u>VKK</u> GFEFTLMVVGESGLG
50	K <u>STL</u> INSLFLTDLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIEERGVKLRLTVVD
102	TPGYGDAINCRDCFKTHISYIDEQFERYLH <u>DESGL</u> NRRHIIDNRVHCCFY
152	FISPFGLHGLKPLDVAFMKAIHNKVNIVPVI <u>AKAD</u> TLTLKERERLKKRILD
202	EIEEHNIKIYHLPDAESDEDEDFKEQTRLLKASIPFSVVGSNQLIEAKGKK
252	VRGRLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRTMLITHMQDLQEVTQDLHYEN
299	FRSERLKRGG RV NEDMNKDQILLEKEAELRRMQEMIARMQAQMQ
345	MQMQGGDGDGGALGHHV

Quadro 2.1 - Sequência de aminoácidos dos produtos recombinantes. Em azul são mostrados os resíduos que compõem o domínio N-terminal (a região polibásica, responsável pela interação com lipídeo, está sublinhada em azul); em preto são mostrados os resíduos do domínio GTPase, as regiões ali sublinhadas correspondem, na sequência, a G1, G3 e G4. Em vermelho os resíduos do C-terminal. No caso de *SEPT2C*, um triptofano, não existente na sequência original, foi inserido no início da sequência, para permitir seu monitoramento em 280 nm.

Tabela 2.5 - Parâmetros relativos à estrutura primária de SEPT2 e seus domínios.

	Número de nucleotídeos	Número de aminoácidos	Peso Molecular (Da)	Coefficiente de extinção (280 nm)
SEPT2	1083	361	41487,4	19160
SEPT2GC	981	327	37635,0	17670
SEPT2NG	924	308	35421,5	19160
SEPT2G	822	274	31569,1	17670
SEPT2C	168	56	6458,3	5500

*Parâmetros obtidos através do *software* Prot Parameters (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).

*No caso de SEPT2C, foram adicionados 3 aminoácidos na região N-terminal, o que aumenta seu número de aminoácidos de 53 para 56.

2.3.4 Expressão recombinante e purificação

A síntese das proteínas recombinantes foi feita em *E. coli* Rosetta (DE3), a qual possui o gene que codifica a T7 RNA polimerase, sob o controle do promotor *lac*. Essa linhagem permite uma entrada uniforme do indutor e, ainda, expressa os tRNAs que reconhecem códons raros para *E. coli*, comuns em genes humanos. A indução da síntese das proteínas de interesse foi realizada de forma indireta, adicionando-se IPTG ao meio de cultura, que age desreprimindo tanto o promotor *lac* quanto o promotor T7 (ambos compartilham a mesma região operadora do operon *lac*). Dessa forma, o IPTG induz a expressão da T7 RNA polimerase, que por sua vez reconhecerá o promotor T7 (agora não reprimido), iniciando a expressão do gene de interesse.

Na análise por SDS-PAGE 15% foi verificada a expressão a partir das diversas construções plasmidiais, assim como a solubilidade das proteínas resultantes. Em todos os casos, grande parte das proteínas se mostrou solúvel, embora uma parte estivesse na fração insolúvel. SEPT2 foi a proteína que teve a maior fração insolúvel, apresentando o menor rendimento (2 mg de proteína pura por litro de expressão). Já para SEPT2NG, SEPT2GC, SEPT2G e SEPT2C, os rendimentos foram, respectivamente de 4, 3, 5, 10 mg/L.

Em virtude das proteínas não estarem com o grau de pureza desejável para os estudos subsequentes, após a purificação por afinidade outra cromatografia foi necessária (Figura 2.6

A). Assim, a cromatografia de exclusão molecular foi utilizada para aumentar a pureza da amostra, bem como estimar sua massa aparente.

Os resultados da cromatografia de exclusão molecular sugeriram uma natureza dimerica para essas proteínas (quando comparadas a proteínas padrão). Os segundos e terceiros picos que aparecem nos cromatogramas (Figura 2.5 A, acima) são referentes ao GTP e ao Imidazol, respectivamente. A pureza das proteínas eluídas da Superdex pode ser visualizada na Figura 2.6 B. Na Figura 2.6 C, é possível visualizar um esquema ilustrativo de todas as proteínas produzidas.

(A)

Continua

Continuação

Figura 2.5 - Purificação por cromatografia de exclusão molecular. (A) Cromatogramas das proteínas recombinantes; (B) SDS-PAGE 15% mostrando: (M) Marcador de massa molecular; (1) SEPT2; (2) SEPT2GC; (3) SEPT2G; (4) SEPT2NG; (5) SEPT2C; (C) Esquema ilustrativo da composição dos domínios de todas as proteínas produzidas.

Com as proteínas solúveis e puras, partimos para os experimentos espectroscópicos, de caracterização estrutural e funcional das proteínas recombinantes.

2.3.5 Caracterização estrutural e funcional

2.3.5.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD são caracterizados por máximos e mínimos de absorção de luz elipticamente polarizada, e diferem de acordo com a estrutura secundária de uma determinada proteína. O espectro de CD característico de estruturas do tipo α -hélices puras é caracterizado por mínimos negativos em 222 e 208 nm e um máximo em 192 nm. O espectro de CD característico de estruturas do tipo folhas- β é caracterizado por um mínimo em torno de 216 e um máximo em torno de 195 nm. Já para sequências com estruturas secundárias não regulares, um mínimo em torno de 200 nm e um máximo em torno de 218 nm caracterizam o espectro¹⁰⁹.

SEPT2, assim como seus domínios, apresentam um espectro característico de proteínas contendo elementos de estrutura secundária do tipo α -hélice, com mínimos de absorção em 208 nm e 220 nm (Figura 2.6).

Figura 2.6 - Espectro de CD de SEPT2 e de seus domínios a 10°C. Todas as proteínas apresentaram um espectro característico de α -hélices, como mínimos em 208 e 222 nm. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 5 μ M, exceto SEPT2C, que se encontrava em uma concentração de 20 μ M.

Medidas de Dicroísmo Circular também foram feitas com o intuito de se estudar a reversibilidade do processo de desenovelamento das proteínas recombinantes.

As proteínas foram incubadas a 37°C e a 45°C por 60 minutos, e então os espectros de CD foram obtidos. Em seguida as proteínas foram resfriadas em gelo por uma hora, e novamente medidas de CD foram feitas para avaliar o conteúdo de estrutura secundária.

Nos casos de SEPT2, SEPT2GC, SEPT2NG e SEPT2G, as proteínas não tiveram seu conteúdo de estrutura secundária recuperado, indicando a irreversibilidade do processo (Figura 2.7 A-D).

Continua

Continuação

Figura 2.7 - Desenovelamento parcial e reenovelamento de SEPT2 e seus domínios. Espectro de CD em função das temperaturas de 37°C e 45°C: (A) SEPT2; (B) SEPT2GC; (C) SEPT2NG; (D) SEPT2G; (E) SEPT2C. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 5 μ M, exceto SEPT2C, que se encontrava em uma concentração de 20 μ M.

Percebe-se que mesmo o processo de desnaturação sendo parcial, nas condições testadas, as proteínas acima citadas não readquire o sinal de CD original a 4°C, que foi diferente do apresentado a 37 °C ou a 45 °C. Quando essas temperaturas são atingidas há um deslocamento dos mínimos de absorção por volta de 216 nm, que é característico de proteínas com conteúdo rico em folhas- β . Mesmo após resfriadas, as amostras não retornam ao seu estado original. Quando as proteínas foram aquecidas acima de 60 °C houve precipitação, o que impediu a avaliação do processo de reversibilidade da desnaturação completa.

Já no caso de SEPT2C observou-se o oposto (Figura 2.7 E). Após o aquecimento a 37°C e a 45°C e, subsequente resfriamento, a proteína exibiu seu espectro original. Tal fato

pode ser explicado pelo menor tamanho e menor complexidade da SEPT2C. Além disso, essa proteína se mostra muito mais estável, quando comparada aos domínios maiores, podendo ser estáveis em concentrações muito maiores e também em temperaturas maiores (com a proteína SEPT2C é possível trabalhar em temperaturas ambientes, algo que para as outras proteínas leva a agregação).

2.3.5.2 Fluorescência intrínseca

A intensidade e comprimento de onda do máximo de emissão do triptofano são muito dependentes do solvente. Resíduos de triptofano, que estão enterrados nos núcleos hidrofóbicos de proteínas, podem ter espectros deslocados de 10-20 nm em relação aos triptofanos localizados na superfície da proteína ¹¹⁰. Foram realizadas medidas de emissão de fluorescência do triptofano de SEPT2 e seus domínios. Em todos os casos, com exceção de SEPT2C, o máximo de emissão do triptofano foi aproximadamente 330 nm (Figura 2.8). Esse resultado indica que o triptofano se encontra internalizado na estrutura das proteínas.

Figura 2.8 - Espectro de Fluorescência de SEPT2 e de seus domínios a 10°C. Todas as proteínas apresentaram um máximo de emissão em 330 nm, com exceção de SEPT2C, indicando que os triptofanos se encontram internalizados na estrutura terciária das proteínas. exceto SEPT2C, que se encontrava em uma concentração de 20 μ M.

No caso da SEPT2C, cujo triptofano foi inserido em sua seqüência de aminoácidos, o máximo de emissão foi em 350 nm, indicando uma maior exposição do triptofano ao solvente. Tal fato já era esperado, pois o aminoácido em questão foi adicionado a extremidade N-terminal de SEPT2C.

Os resultados apresentados de espectroscopia de Fluorescência e de Dicroísmo Circular indicam que as proteínas em questão possuem estrutura secundária regular e, além disso, possuem um enovelamento terciário.

2.3.5.3 Ensaio de hidrólise de GTP

Depois de confirmada a organização estrutural das proteínas em questão, foi necessário verificar a funcionalidade das mesmas, isto é, sua capacidade de hidrolisar o nucleotídeo GTP.

Após a desnaturação química de SEPT2, o conteúdo de nucleotídeo (GDP ou GTP) liberado foi determinado utilizando uma coluna de troca aniônica (Protein Pak DEAE 5 PW) e analisada em um cromatógrafo Alliance 2695 (Waters). A cromatografia foi monitorada em comprimento de onda de 254 nm, já que é o comprimento de onda de máxima absorção dos nucleotídeos contendo a base guanina, separados por tempos de migração.

Todos os espectros estão mostrados na Figura 2.9 A-C. O espectro de absorção do ácido perclórico (HClO_4), do GDP e do GTP são mostrados em A, com máxima absorção após 3 min., 8 min e 8.5 min, respectivamente, submetidos ao mesmo protocolo de desnaturação química.

Continua

Continuação

Figura 2.9 - Hidrólise de GTP pela SEPT2. Espectros de absorção a 254 nm, mostrando: (A) Controles de Ácido perclórico, GDP e GTP; (B) Sobrenadante da desnaturação de SEPT2 e (C) Sobreposição dos picos de GDP presentes em (A) e (B), evidenciando a hidrólise do GTP em GDP.

O espectro de absorção a 254 nm mostra que a proteína SEPT2 liberou GDP após desnaturação química, embora tenha sido incubada com GTP (Figura 2.9 B e C). Assim, estes resultados mostram que SEPT2 hidrolisou todo o GTP adicionado durante o processo de purificação, pois foi detectado um único pico em 8 min, indicando a presença apenas do GDP. Isso confirma a atividade hidrolítica da proteína SEPT2, produzida de forma recombinante, tal como esperado⁵⁷.

2.3.6 Formação de estruturas amiloidogênicas

2.3.6.1 Programas de predição *in silico*

Atualmente, são conhecidos dois mecanismos que parecem controlar a formação de fibras amilóides, um dependente da sequência de aminoácidos e outro independente¹³². Obviamente, o primeiro é mais facilmente detectável e, com o intuito de identificarmos as regiões responsáveis pela agregação e/ou formação de filamentos amilóides em SEPT2, utilizamos programas de predição *in silico* foram usados.

A sequência de aminoácidos de SEPT2 foi submetida aos programas de predição TANGO e WALTZ, a fim de analisar sua propensão de formação de agregados pelas fitas β e de formação de estruturas amilóides, respectivamente. Os resultados do TANGO indicaram quatro regiões com alta probabilidade de agregação, todas no domínio central GTPase: as sequências de resíduos entre 38 e 43 (FTLMVV); 52 e 59 (TLINSLFL); 118 e 122 (IISYI); 149 e 153 (CFYFI) (Figure 2.10 A e B). WALTZ também resultou em quatro regiões de com alta probabilidade de formação de estruturas amilóides: as sequências de resíduos entre 118 e 123 (IISYID); 147 e 155 (HCCFYFISP); 163 e 168 (LDVAFM); 173 e 178 (NKVNIV), todas também no domínio GTPase (Figura 2.10 A e C). Embora TANGO não seja específico para a predição de estruturas amilóides, suas predições apresentam uma boa correlação com as predições do WALTZ¹¹⁵.

Com o programa Zyggregator a predição de SEPT2 para a formação de amilóides. Para todos os aminoácidos com valor de Zagg maior que 1, há a propensão de formação das estruturas amiloidogênicas, o que resultou em 12 regiões. Dessas 12 regiões preditas, ressaltamos a região entre os aminoácidos 145 e 154, com maior valor de Zagg, e também a região entre os aminoácidos 111 e 121, ambas preditas pelo TANGO e WALTZ, e está presente nas 13 sequências de septinas humanas (Figura 2.10 D).

(A)

(B)

(C)

Continua

Continuação

Figura 2.10 - Programas de predição de agregação e de regiões amiloidogênicas. (A) Probabilidade da sequência de aminoácidos de SEPT2 de agregarem por folhas- β e se organizarem em fibras amilóides, preditos respectivamente por TANGO e WALTZ; (B) Estrutura tridimensional do dímero de SEPT2, com destaque para as regiões com alta probabilidade de agregação: 38FTLMVV43 (azul claro), 52TLINSLFL59 (amarelo), 118IISYI122 (vermelho), 146VHCCFYFI153 (azul escuro); (C) Estrutura tridimensional do dímero de SEPT2, com destaque para as regiões com alta probabilidade de formação de estruturas amiloidogênicas: 118IISYID123 (vermelho), 147HCCFYFISP155 (azul escuro), 163LDVAFM168 (roxo), 173NKVNIV178 (preto); (D) Regiões preditas pelo programa Zyggregator, com destaque para duas delas, corroborando a propensão de SEPT2 se organizar em fibras amilóides.

A região entre os aminoácidos 118-123 correspondem a uma região de hélice na superfície da proteína (Figura 2.10 B), enquanto a região compreendida entre os aminoácidos 147-155 estão organizados em uma fita- β enterrada na estrutura protéica (Figura 2.10 B). Em ambos os casos, um rearranjo estrutural seria necessário para expor essas sequências e, assim, participar diretamente na formação das fibras amilóides, eventualmente, levando a agregação.

Esses dados estão de acordo com a suposição de que SEPT2 é capaz de se organizar em filamentos, formando estruturas amiloidogênicas, que estão relacionados com doenças neurodegenerativas.

A análise da propensão da SEPT2 em se organizar em estruturas amilóides foi ainda estendida par as 13 septinas humanas e os resultados podem ser vistos no alinhamento da Figura 2.11.

SEPT1	-----	
SEPT2	-----	
SEPT4	-----	
SEPT5	-----	
SEPT6	-----	
SEPT8	-----	
SEPT10	-----	
SEPT11	-----	
SEPT14	-----	
SEPT7	-----	
SEPT3	-----	
SEPT9	MERDRISALKRSFEVEEVETPNSTPPRRVQTPLLRTVASSTQKFQDLGVKNSEPSARHV	
SEPT12	-----	
SEPT1	-----	
SEPT2	-----	
SEPT4	-----	MDRSLGW
SEPT5	-----	
SEPT6	-----	
SEPT8	-----	
SEPT10	-----	
SEPT11	-----	
SEPT14	-----	
SEPT7	-----	
SEPT3	-----	
SEPT9	DSLSQRSPKASLRRVELSGPKAAEPVSRTELSIDISSKQVENAGAIGPSRFGLKRAEVL	
SEPT12	-----	
SEPT1	-----	
SEPT2	-----	
SEPT4	QGNVPEDRTEAGIKRFLEDTTDDGELSKFVKDFSGNASCHPPEAKTWASRPQVPEPRPQ	
SEPT5	-----	
SEPT6	-----	
SEPT8	-----	
SEPT10	-----	
SEPT11	-----	
SEPT14	-----	
SEPT7	-----	
SEPT3	-----	
SEPT9	GHKTPEPAPRRTEITIVKPQESAHRMEPPASKVPEVPTAPATDAAPKRVEIQMPKPAEA	
SEPT12	-----	
SEPT1	-----	
SEPT2	-----	
SEPT4	APDLYDDDLFRPPSRPQSSD	NOQYFC
SEPT5	-----	LSPSARP
SEPT6	-----	MAATD
SEPT8	-----	MAATD
SEPT10	-----	MASSEVARHLLFQSHMATKT
SEPT11	-----	MAVA
SEPT14	-----	MAERT
SEPT7	-----	
SEPT3	-----	MSELVP
SEPT9	PTAPSPAQTLNENEPAPVSQLSRLEPKPQPPVAEATPRSQEATEAAPSCVGDMDATPRD	
SEPT12	-----	MDPLRR

Continuação

SEPT1	-----MDKE-YVGFAALPNQLHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLINS
SEPT2	---MSKQOPTQFINPETPGYVGFANLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLINS
SEPT4	RSPWGKLDPYDSSSEDDKE-YVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVNSL
SEPT5	KSKLATPE--DKQDIDKQ-YVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVHSL
SEPT6	-----VGEG--CRTVPLAGHVGFDSLDPQLVNKSVSQGF ^{FCFNILC} VGETGIGKSTLMDTL
SEPT8	-----SNAEPEPRSLSLGGHVGFDSLDPQLVSKSVTQGF ^{FSFNILC} VGETGIGKSTLMNTL
SEPT10	SDDEQIKREN-IRSLTMSGHVGFESLPDQLVNRSIQQGF ^{FCFNILC} VGETGIGKSTLIDTL
SEPT11	-----SNEE--LRNLSLSGHVGFDSLDPQLVNKSTSQGF ^{FCFNILC} VGETGIGKSTLMDTL
SEPT14	PADGDTQKENNIRCLTTIGHGFGECLPNQLVRSIR ^{QGFTFNILC} VGETGIGKSTLIDTL
SEPT7	-----MVAQQKNLEGYVGFANLPNQVYRKSVMKGFDFTLMVAGESGLGKSTLINS
SEPT3	--MKPMSINSN----LLGYIGIDTIEQMRKKTMTKG ^{FDNFNIMV} VGQSGLGKSTLVNTL
SEPT9	AGLKQAPASRNEKAPVDFGYVGDISILEQMRKAMKQGF ^{FEFNIMV} VGQSGLGKSTLINTL
SEPT12	-CLSSQPSSPSTPPCEMLGPVGIEAVLDQLKIKAMKMG ^{FEFNIMV} VGQSGLGKSTLMVNTL
SEPT1	FLTNLYEDRQVPEASARLTQTTLAIERRGVEIEEGGVKVLTLVDTPGFGDSVDCSDCWLP
SEPT2	FLTDLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIEERGKVLRLTVVDTPGYGDAINCRDCFKT
SEPT4	FLTDLYRDRKLLGAEERIMQTVETKHAVDIEEKGVRLRLTIVDTPGFGDAVNNTCEWKPK
SEPT5	FLTDLYKDRKLLSAEERISQTVETILKHTVDIEEKGVKLKLTVIVDTPGFGDAVNNTCEWKPK
SEPT6	FNTKFEGE-----PATHTQPGVQLQSNQTYDLQESNVRLKLTIVSTVGFQDQINKEDSYKP
SEPT8	FNTTFETE-----EASHHEACVRLRPQTYDLQESNVQLKLTIVDAVGFGDQINKDESYRP
SEPT10	FNTNFEDY-----ESSHFCPNVKLKAQTYELQESNVQLKL ^{TIVNTVGF} QDQINKEESYQP
SEPT11	FNTKFESD-----PATHNEPGVRLKARSYELQESNVRLKLTIVDTVGFQDQINKDDSYKP
SEPT14	FNTNLKDN----KSSHFSYSNVGL ^{QIQTVE} LQESNVQLKLTIVVETVGYGDQIDKEASYQP
SEPT7	FLTDLYSP-EYPGPSTRKIKTVQVEQSKVLIEKGGVQ ^{LLTIVD} TPGFGDAVNNSCWQP
SEPT3	FKSQVSRKASSWNREEKIPKTVIEIKAIGHVIEEGGVKMKLTIVDTPGFGDQINNENCWEP
SEPT9	FKSKISRKSVQPTSEERIPKTVIEIKSITHDIEEKGVRLKLTIVDTPGFGDHINNENCWQP
SEPT12	FKSKVWK-SNPPGLGVPTPQTLQLHSLTHVIEEKGVKLKLTVDTTPGFGDQINNENCWDP
SEPT1	VVKFIEEQFEQYLRDESGLNR--KNIQDSRV ^{HCCLYFISE} FGRGLRP ^{LDVAFRLA} VHEKV
SEPT2	^{IISYID} EQFERYLHDESGLNR--RHIIDNRV ^{HCCFYFISE} FGHGLKP ^{LDVAFMKA} IHNKV
SEPT4	VAEYIDQFEQYFRDESGLNR--KNIQDNRV ^{HCCLYFISE} FGHGLRPLDVEFMKALH ^{QRV}
SEPT5	ITDYVDQFEQYFRDESGLNR--KNIQDNRV ^{HCCLYFISE} FGHGLRPVDVGFMAKALHEKV
SEPT6	IVEFIDA ^{QFEAYLQ} EELKIRRVLTHTYHDSRI ^{HVCLYFIAP} TGHSLKSLDLVTMKKLDSKV
SEPT8	IVDYIDA ^{QFENYLQ} EELKIRRSFLDYHDTRI ^{HVCLYFITP} TGHSLKSLDLVTMKKLDSKV
SEPT10	IVDYIDA ^{QFEAYLQ} EELKIKRSLFTYHDSRI ^{HVCLYFISE} TGHSLKSLDLVTMKNLDSKV
SEPT11	IVEYIDA ^{QFEAYLQ} EELKIKR ^{SLFNHYD} TRI ^{HACLYFIAP} TGHSLKSLDLVTMKNLDSKV
SEPT14	IVDYIDA ^{QFEAYLQ} EELKIKRSLFEYHDSRV ^{HVCLYFISE} TGHSLKSLDLVTMKNLDSKV
SEPT7	VIDYIDSKFEDYLNRESVNR--RQMPDNRV ^{QCCLYFIAP} SGHGLKPLDIEFMKRLHEKV
SEPT3	IEKYINEQYEFKLEEVNIARK-KRIPDTRV ^{HCCLYFISE} TGHSLRPLDIEFMKRL ^{SKVV}
SEPT9	IMKFINDQYEFKLEEVNIARK-KRIPDTRV ^{HCCLYFIAP} TGHSLRPLDIEFMKRL ^{SKVV}
SEPT12	^{ILGYINEQYEQYLQEEIT} ITRQ-RHIPDTRV ^{HCCVYFV} PPTGHCLRPLDIEFLQRLCRTV
SEPT1	NIIPVIGKADALMPQETQALKQKIRDQLKEEIIHIYQFPECDSDEDEDFKRQDAEMKESI
SEPT2	^{NIVPVI} AKADTLTLKERERLKKRILDEIEHNIKIYHLPAESDEDEDFKEQTRLLKASI
SEPT4	^{NIVPTI} AKADTLTPPEVDHKKRKIREEIEHFGIKIYQFPDCSDEDEDFKLQDQALKESI
SEPT5	NIVPLIAKADCLVPSEIRKLKERIREEIDKFGIHVYQFPECDSDEDEDFKQDRELKESA
SEPT6	NIIPIIAKADAISKSELTKFKIKITSELVSN ^{GVQIYQFP} ----TDDESVAEINGTMNAHL
SEPT8	NIIPIIAKADTISKSELHKFKIKIMGELVSN ^{GVQIYQFP} ----TDDE ^{AVAEIN} AVMNAHL
SEPT10	NIIPVIAKADTVSKTELQKFKIKLMSELVSN ^{GVQIYQFP} ----TDDDTIAKVNAAMNGQL
SEPT11	NIIPVIAKADTIAKNEHKKFKSKIMSELVSN ^{GVQIYQFP} ----TDEETVAEINATAMSGHL
SEPT14	NIIPVIAKADTISKNDLQTFKNKIMSELISN ^{GIQIYQLP} ----TDEETAAQANSSVSGLL
SEPT7	NIIPVIAKADTLTPEECQQFKQIMKEIQEHKIKIYEFPETDDEEENKLVKK--IKDRL
SEPT3	^{NIIPVIA} KADTMTLEEKSEFKQVRVKELEVNGIEFYQKEFD-EDLEDKTENDKIRQESM
SEPT9	^{NIVPVI} AKADTLTLEERVHFKQIRITADLLSNGIDVYPQKEFD-EDSEDRLVNEKFR-EMI
SEPT12	NVVPVIARADSLTMEEREAFRRRIQONLRTHCIDVYPQMCFD-EDINDKILNSKLR-DRI
SEPT1	PFAVVGSEVVRDGGNRPVRGRRYSWGTVEEVENPHHCDFLNLRMLVQTHLQDLKEVTHD
SEPT2	PFSVVGSNQLIEAKGKK-VRGRLYPWGVEVENPEHNDFLKLRTMLI-THMQDLQEVTDQD
SEPT4	PFAVIGSNTVVEARGRR-VRGRLYPWGIVEVENPGHCDVFKLRMLVTHMQDLKDVTR
SEPT5	PFAVIGSNTVVEAKGQR-VRGRLYPWGIVEVENQAHCDVFKLRNMLIRTHMHDLKDVTC
SEPT6	PFAVIGSTEELK-IGNKMMRARQYPWGTVQVENEAHCDVFKLREMLIRVNMEDLREQTH
SEPT8	PFAVVGSTEEVK-VGNKMLVARQYPWGVVQVENENHCDVFKLREMLIRVNMEDLREQTH
SEPT10	PFAVVGSMDEVK-VGNKMLVARQYPWGVVQVENENHCDVFKLREMLICTNMEDLREQTH
SEPT11	PFAVVGSTEEVK-IGNKMAKARQYPWGVVQVENENHCDVFKLREMLIRVNMEDLREQTH
SEPT14	PFAVVGSTDEVK-VGKRMVGRHYPWGLQVENENHCDVFKLRDMLLCTNMENLKEKTH
SEPT7	PLAVVGSNTIIIEVNGKR-VRGRQYPWGVAEVENGEHCDFTILRNMLIRTHMQDLKDVTTN
SEPT3	PFAVVGSDKEYQVNGKR-VLGRKTPWGIIEVENLNHCEFALLRDFVIRTHLQDLKEVTHN

Continuação

SEPT9	PFAVVGSDHEYQVNGKR-ILGRKTKWGTIEVENTTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDITSS
SEPT12	PFAVVGADQEHLVNGRC-VLGRKTKWGIIEVENMAHCEFPLLRDLIRSHLQDLKDITHN
SEPT1	LLYEGYRARCLQSLARPGARDRASRSKLSRQSATEIPLP---MLP---LADTEKLIRE
SEPT2	LHYENFRSERLKRGR-----KVENE-----DMNKDQILLE
SEPT4	THYENYRAQCIQSMTRLVVKERN-RNKLTRESGTDFPIP---AVP-PGTDPETEKLIRE
SEPT5	VHYENYRAHCIQOMT-----SKLTQDSRMESPIP---ILPLPTDAETEKLIRM
SEPT6	RHYELYYRCKLEEMGFKDTDPDSKPFSLQETYEAKRNEFLG---ELQKKEEEMRQMFVQ
SEPT8	RHYELYYRCKLEEMGFQSDSDSQPFSLQETYEAKRKEFLS---ELQRKEEEMRQMFVN
SEPT10	RHYELYYRCKLEEMGFDTDVGPENKPVSVQETYEAKRHEFHG---ERQRKEEEMKQMFVQ
SEPT11	RHYELYYRCKLEEMGFKDTDPDSKPFSLQETYEAKRNEFLG---ELQKKEEEMRQMFVM
SEPT14	QHYECYRYQKLQKMGFTDVGPNNQPV SFQEIF EAKRQEFYD---QCREEEELKQRFMQ
SEPT7	VHYENYRSRKL AAVTY NGVDNNKNKGQLTKSPLAQMEERREHVAKMKMEMEMEQVFEM
SEPT3	IHYETYRAKRLNDNGGLPPVS--VDTEESHDSNP-----
SEPT9	IHFEAYRVKRLNEGSSAMANG--VEEKEPEAPEM-----
SEPT12	IHYENYRVIRLNESHLLPRGPGWVNLAPASPGQLTTPRTFK---VCRGAHDDSDDEF--
SEPT1	K-----DEELRRMQEMLEK-----MQAQMQSSQAQGEQSDAL-----
SEPT2	K-----EAELRRMQEMIA-----MQAQMQMQMQGGDGGALGHV-
SEPT4	K-----DEELRRMQEMLHK-----IQKQMKENY-----
SEPT5	K-----DEELRRMQEMLQR-----MKQQMQDQ-----
SEPT6	RVKEKEAELKEAEKELHEKFDRLKKLHQDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKTAELLQS
SEPT8	KVKETELELKEKERELHEKFEHLKRVHQEEKRKVEEKRELEETNAFNRRKAAVEALQS
SEPT10	RVKEKEAILKEAERELQAKFEHLKRLHQEERMKLEEKRRLEEEIIAFSKKKATSEIFHS
SEPT11	RVKEKEAELKEAEKELHEKFDLLKRTHQEEKKVEDKKKELEEVNMFQKKKAAQLLQS
SEPT14	RVKEKEATFKEAEKELQDKFEHLKMIQQEEIRKLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAAASEALQT
SEPT7	KVKEKVQKLKDSEAEQLRRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNS
SEPT3	-----
SEPT9	-----
SEPT12	-----
SEPT1	-----
SEPT2	-----
SEPT4	-----
SEPT5	-----
SEPT6	QGSQAGGSQTLKRDKEKKNPWLCTE-----
SEPT8	QALHATSQQPLRKDKDKKNRSDIGAHQPGMSLSSSKVMMTKASVEPLNCSSWWPAIQCCS
SEPT10	QSF-LATGSNLRKDKDRKKEPGCRFELLCIDVRACETNGGRKDAEKAPIFCKTEVPEHRR
SEPT11	QAQQSGAQQTCK-DKDKKNASFT-----
SEPT14	Q---LSTD--KDKHRKK-----
SEPT7	SRTLEKNKKKGKIF-----
SEPT3	-----
SEPT9	-----
SEPT12	-----
SEPT1	-----
SEPT2	-----
SEPT4	-----
SEPT5	-----
SEPT6	-----
SEPT8	CLVRDATWREGFL---
SEPT10	SSSQANFIKKKTRSVL
SEPT11	-----
SEPT14	-----
SEPT7	-----
SEPT3	-----
SEPT9	-----
SEPT12	-----

Figura 2.11 - Alinhamento das 14 septinas humanas. Em destaque as regiões com alta probabilidade de formarem estruturas amiloidogênicas. Em roxo estão marcadas as regiões com alta probabilidade de agregação em fibras amilóides das septinas pertencentes ao Grupo 1; em amarelo as septinas do Grupo 2; em verde as septinas do Grupo 3; em azul as septinas do Grupo 4. O alinhamento foi feito utilizando o *software* ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Analisando o alinhamento nota-se que todas as 13 septinas humanas possuem regiões preditas como sendo potenciais formadoras de fibras amilóides, apresentando pelo menos uma região, como é o caso da SEPT5. SEPT5 possui apenas uma região predita como sendo potencialmente amiloidogênica, a região 154 HCCLYFISP 162, que está presente em todas as septinas humanas (com algumas variações entre os grupos) e com mais 96% de probabilidade de formação dessas estruturas ricas em folhas- β .

Em contrapartida, SEPT14 contém 6 regiões preditas amilóides, sendo a septina com o maior número de regiões preditas pelo WALTZ. Embora não tenhamos dados experimentais da participação das 13 septinas humanas na formação de fibras amilóides, muito menos de seus envolvimento em doenças neurodegenerativas, esses resultados fornecem indícios de que as septinas humanas estão envolvidas nesse processo.

2.3.6.2 Desnaturação térmica

Proteínas com características amiloidogênicas são ricas em estrutura secundária organizadas em folhas- β , que se alinham perpendicularmente em relação ao eixo da fibra¹³³. Transições estruturais, induzidas pela temperatura, por exemplo, são necessárias para que alguns segmentos sejam expostos e se organizem em folhas- β ^{113; 134; 135; 136}.

Os experimentos subsequentes foram realizados com todas as construções truncadas de SEPT2, porém apresentando sempre o mesmo resultado. Como os programas de predição resultaram em sequências amiloidogênicas presentes apenas no domínio GTPase, somente SEPT2G, correspondente a tal domínio, e SEPT2, que é a proteína completa, foram utilizadas nesses experimentos.

Para detectar a presença ou não de estados estruturais ricos em folhas- β em SEPT2 e SEPT2G, durante a desnaturação térmica, utilizou-se a técnica de Dicroísmo Circular (Figura 2.12).

Figura 2.12 - Desnaturação térmica de SEPT2 e SEPT2G. Ambas as proteínas apresentam um espectro característico de α -hélices, como mínimos em 208 e 222 nm. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 3 μ M.

Em ambos os casos, a 15°C as proteínas mantêm um espectro de CD característico de proteínas ricas em α -hélice, como visto nas Figuras 2.6 e 2.7, com mínimos de 208 e 222 nm. Utilizando o programa de análise de estrutura secundária K2d (<http://www.embl.de/~andrade/k2d/>) estimou-se o conteúdo de estrutura secundária das proteínas: 32% α -hélice, 19% folhas- β e 49% de estruturas desordenadas para SEPT2; enquanto SEPT2G apresentou 25% α -hélice, 24% folhas- β e 50% de estruturas desordenadas. Esses dados são coerentes com aqueles calculados a partir da estrutura tridimensional da proteína SEPT2 1-315 (código do pdb 2QA5): 32% α -hélice e 15% folhas- β .

Com o aumento da temperatura, ocorreram mudanças na estrutura secundária de SEPT2 e SEPT2G. Acima de 30°C há uma perda do conteúdo de α -hélice, observado pela diminuição na elipsidade em 222 nm. Nas temperaturas maiores, os espectros adquirem característica de proteína com grande conteúdo de folhas- β , com um mínimo entre 215 e 220 nm. Tal fato é corroborado pelos dados de desconvolução a 45°C: 28% α -hélice, 26% folhas- β e 46% de estruturas não-regulares para SEPT2, enquanto SEPT2G apresentou 13% α -hélice, 39% folhas- β e 48% de estruturas não-regulares. Fica evidente que com o aumento da temperatura há uma transição de estrutura secundária nas proteínas em questão. Acima de 60°C, os espectros começaram a perder a intensidade em função de precipitação das amostras.

2.3.6.3 Análise do conteúdo de nucleotídeo

Como mostrado anteriormente, a 37°C e a 45°C, SEPT2G apresenta uma transição conformacional, exibindo características de proteínas ricas em folhas- β após o aquecimento (Figura 2.12). O aquecimento causou um desenovelamento parcial de SEPT2G, provocando a liberação do nucleotídeo (Figura 2.13).

Figura 2.13 - Análise da presença de nucleotídeo em SEPT2G. Após aquecimento, SEPT2G perdeu o nucleotídeo ligado. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 5 μ M

Na Figura 2.14 a análise do sobrenadante mostrou um espectro característico de GDP, com um máximo de absorção em 254 nm, enquanto no sobrenadante da solução protéica não aquecida não há presença do nucleotídeo. Tal sugere que a ligação do nucleotídeo contribui na estabilidade da proteína, sendo que a perda do mesmo pode acarretar mudanças conformacionais na molécula.

Nas temperaturas de 37°C e a 45°C SEPT2G, além de apresentar uma transição conformacional, perde o nucleotídeo ligado, mudanças essas que podem estar relacionadas com a reorganização estrutural de SEPT2 na formação dos filamentos amilóides, como é no caso de SEPT4G⁵⁸.

2.3.6.4 Espalhamento de luz a ângulo fixo

Na tentativa de avaliar se o tratamento térmico influenciava na agregação das proteínas, medidas de espalhamento de luz a ângulo fixo foram feitas. Inicialmente, amostras de SEPT2 e SEPT2G (Figura 2.14) foram medidas, em função do tempo, nas temperaturas de 15°C, 30°C, 45°C e 60°C, correspondendo ao mesmo intervalo de temperatura em que a transição de estrutura secundária foi observada pelo CD.

Continua

Continuação

Figura 2.14 - Espalhamento de luz a ângulo fixo de SEPT2 e SEPT2G, em função da temperatura. O comprimento de onda usado foi 350 nm, usando uma cubeta de quartzo de 1.0 cm. Todas as proteínas mostraram agregação acima de 30°C. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 5 μ M.

Tanto para SEPT2, quanto para SEPT2G, a intensidade da luz espalhada permaneceu constante entre 15°C e 30°C durante todo o experimento, sugerindo que as proteínas não agregam nessas condições (no caso de SEPT2G, os espalhamentos a 15°C e 30°C não são distinguíveis devido a sua semelhança). Entretanto, para SEPT2 a 30 °C é possível observar uma tendência a agregação, visto que há um leve aumento na intensidade do espalhamento em função do tempo.

Para ambas as proteínas a 45°C e a 60°C, a intensidade da luz espalhada aumentou ao longo tempo, permanecendo constante a partir de aproximadamente 1000 segundos. Esses dados sugerem que ocorreu a formação de grandes partículas espalhadoras em solução de uma forma dependente da temperatura. Vale ressaltar que dentro dessa variação de temperatura e concentração das proteínas estudadas, não houve nenhuma evidência de precipitação das proteínas, sendo que as soluções permaneceram transparentes ao longo de todo o experimento. No entanto, esse é um processo dependente da concentração. Em concentrações maiores é possível a observação de uma maior intensidade de luz espalhada, assim como precipitação das amostras a 60°C.

2.3.6.5 Espectroscopia de Fluorescência: Emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavina-T (ThT)

Para caracterizar se os agregados formados pela SEPT2 e SEPT2G tinham caráter amilóide, a ligação do fluoróforo Thioflavina-T (ThT) foi avaliada nas mesmas temperaturas que foram feitas as medidas de espalhamento de luz a ângulo fixo. O ThT é um fluoróforo amplamente utilizado para detecção de estruturas amilóides e que não se liga a agregados amorfos¹¹⁸. A Figura 2.15 mostra a emissão de fluorescência em 482 nm do ThT na presença de SEPT2 e SEPT2G (Figura 2.15 A e B), incubadas nas temperaturas de 15°C, 30°C, 45°C e 60°C. Alternativamente, uma cinética de ligação de SEPT2G ao ThT, a 4°C por 5 dias foi feita (Figura 2.15 C).

Os resultados de fluorescência do ThT mostraram que a emissão de fluorescência aumentou, até um valor máximo em ambos os casos, e esse comportamento foi dependente da temperatura. No caso de das medidas feitas com SEPT2G a 60°C, o *plateau* pode ser visto claramente e foi alcançado após 1000 segundos. Nesse caso houve rápido aumento da emissão de fluorescência durante os primeiros minutos, o que foi seguido por uma redução na intensidade de emissão, provavelmente devido o fato das proteínas se organizarem em agregados amorfos e não mais em amilóides. Já para SEPT2, o processo de agregação amorfa foi predominante, visto que nessa temperatura a emissão de fluorescência do ThT se mostrou muito reduzida.

Continua

Continuação

Figura 2.15 - Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT2 e SEPT2G, em função da temperatura. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm, usando uma cubeta de quartzo de 1.0 cm. (A) SEPT2; (B) SEPT2G; (C) SEPT2G a 4°C. Em ambos os casos ThT ligou-se aos agregados, o que é um comportamento comum de estruturas amilóides. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 5 μ M.

Ambas as proteínas analisadas formaram estruturas tipo filamentos amilóides, sugerindo que apenas o domínio GTPase é necessário e suficiente para a formação desses filamentos, concordando com o predito pelos programas TANGO, WALTZ e Zyggregator. Além disso, no caso de SEPT2 parece ocorrer uma maior formação de agregados amorfo,

provavelmente devido à presença do N-terminal e do C-terminal, que além de não serem regiões preditas como amiloidogênicas, tem um alto teor de estruturas não-ordenadas e, dessa forma, poderiam estar contribuindo para a formação de agregados amorfos.

É evidente que houve um aumento da intensidade de emissão no decorrer do tempo, mostrando a ligação do ThT à SEPT2 e à SEPT2G. No entanto, não foi observada uma curva sigmóide, como seria esperado para a formação das fibras amilóides, apresentando tipicamente uma fase *lag*, uma fase *log* e a fase estacionária. Estas fases representariam, respectivamente, a nucleação das proteínas, a formação das fibras e o término do processo, como é observado para várias proteínas amilóides^{137; 138; 139; 140}. Para SEPT2 e SEPT2G foi observado apenas um aumento gradual de intensidade de emissão, o que torna difícil a distinção de cada etapa do processo de formação das fibras amilóides.

Na tentativa de melhor visualizar as fases do processo de formação das fibras amilóides, as medidas de emissão do ThT foram refeitas, porém dessa vez a 4°C ao longo de 5 dias (Figura 2.15 C). Percebeu-se que houve um lento aumento da emissão do fluoróforo ao longo da incubação, indicando a formação das estruturas amiloidogênicas. Porém, mesmo assim não foi possível identificar as diferentes fases envolvidas nesse processo. Isso não significa que não seja possível a identificação dessas etapas, mas outras condições deverão ser testadas, assim como, talvez, outras técnicas, que possibilitem uma melhor caracterização dessa cinética.

2.3.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica e criomicroscopia são técnicas que vem sendo usadas para a visualização de fibras amilóides das proteínas β -amilóide, proteína TAU, α -Sinucleína, entre outras^{14; 141; 142; 143}.

Após a confirmação de que SEPT2 e seus domínios agregam e ligam ThT, tornou-se necessária a visualização desses filamentos para melhor caracterização dos mesmos. Com esse intuito, imagens dos agregados foram feitas por Microscopia eletrônica de transmissão.

Inicialmente incubou-se SEPT2 a 45°C por 30 minutos, já que essa foi a condição de máxima emissão do ThT, porém as imagens mostraram predominantemente agregados amorfos. Alternativamente, incubou-se SEPT2 a 37°C, também por 30 minutos e apesar da

predominância de agregados amorfos, também foram verificadas estruturas filamentosas (Figura 2.16 A e B).

Pelo fato de SEPT2 ser muito instável e de rápida agregação, a proteína foi incubada a 4°C, para monitor a formação dos filamentos. Somente a partir de 72 horas de incubação a 4°C foi possível visualizar estruturas fibrilares (Figura 2.16 C). Nesse caso, as fibras exibiram um diâmetro aproximado de 20-50 nm, sendo estruturalmente bem parecidas com aquelas observadas para SEPT4 humana ⁵⁸. Com 120 horas de incubação, as fibras têm o mesmo diâmetro e é possível visualizar agregados maiores (Figura 2.16 D).

(A)

(B)

Continua

Continuação

(C)

(D)

Figura 2.16 - Eletromicrografias dos filamentos formadas por SEPT2. (A) 37 °C; (B) Seleção de uma região da imagem anterior, aumentada; (C) 72 horas; (D) 120 horas. As escalas de aumento estão indicadas nas figuras.

Esses resultados mostram a tendência de SEPT2 se organizar em filamentos amilóides, mesmo em baixas temperaturas, o que é acelerado quando a proteína é aquecida, favorecendo a transição de α -hélices em folhas- β e até expando regiões enterradas na proteína nativa, levando a formação dos amilóides, como descrito para vários outros sistemas^{58; 72; 80; 89; 94; 133;}

Dada a relevância do estudo da formação de heterofilamentos das septinas e a escassa informação a respeito dos homofilamentos, é fundamental entender esse processo e sua relação com o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas.

2.3.7 Estudos de interação de SEPT2 com lipídeos

2.3.7.1 Monocamadas de Langmuir

Em 1999, Trimble e colaboradores descreveram a interação entre SEPT4 e fosfolípido PtdIns(4,5)P₂ (Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato), e também assumiram que o mesmo fosse verdadeiro para a SEPT2, devido a similaridade na sequência primária de aminoácidos na região polibásica ³⁶. Para verificar a proposição de que SEPT2 se liga ao fosfolípido PtdIns(4,5)P₂ acontecia de fato, a técnica de Monocamadas de Langmuir foi utilizada nesse trabalho.

Esta técnica baseia-se na simulação de uma monocamada da membrana celular sobre uma subfase aquosa, na qual as proteínas são introduzidas. Na interface ar/água estão as moléculas lipídicas, orientadas de modo a expor suas cadeias hidrofóbicas para o ar e as cabeças polares imersas na subfase aquosa (Figura 2.17).

Figura 2.17 - Esquema da Monocamada de Langmuir. Primeiramente espalha-se o lipídio na superfície e em seguida, a proteína é injetada na subfase aquosa ¹²⁷.

A interação é calculada pela fórmula a seguir:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

π - Pressão superficial

γ_0 - Tensão superficial sem a monocamada

γ - Tensão superficial com a monocamada

Inicialmente, antes do espalhamento da monocamada, a pressão superficial é nula, visto que $\gamma_0 = \gamma$. Com o espalhamento do filme lipídico, as moléculas anfífilas passam a se adsorver na interface, fazendo com a tensão superficial diminua. Consequentemente, o valor da pressão superficial aumentará. Quanto maior for a quantidade de moléculas na interface, bem quanto maior for sua orientação (empacotamento), menor será a tensão superficial provocada pela presença do filme interfacial, e maior será o valor de pressão superficial.

Foram realizadas medidas usando SEPT2, SEPT2NG e SEPT2G, em concentrações que variaram de 0,5 a 5 μM . Apenas os resultados mais significativos serão apresentados, embora todos tenham sido similares (Figura 2.18).

Para os experimentos aqui realizados, além de verificar a atividade superficial das proteínas, na interface ar-líquido pura, foram realizadas cinéticas de adsorção da proteína nas monocamadas lipídicas em π inicial de 30 mN m^{-1} , uma vez que este é o valor correspondente ao empacotamento lipídico em uma membrana biológica¹⁴⁵.

Continua

Continuação

Figura 2.18 - Adsorção de SEPT2, SEPT2NG e SEPT2G na monocamada de Langmuir. (A) SEPT2, SEPT2NG e SEPT2G na interface líquido-ar; **(B)** Adsorção de SEPT2 na monocamada lipídica; **(C)** Adsorção de SEPT2NG na monocamada lipídica; **(D)** Não adsorção de SEPT2G na monocamada lipídica. Ainda, nas Figuras B e D, em que há uma diminuição da pressão superficial para a monocamada de DPPC, as proteínas podem ter desestabilizado a monocamada.

Em todos os casos, as proteínas apresentaram uma alta atividade superficial, indicando a presença de regiões hidrofóbicas, que são expostas para o meio ar (Figuras 2.18 A). Muitas proteínas, que apresentam elevada atividade superficial são “expulsas” da interface na presença de uma monocamada lipídica com elevado grau de empacotamento, propriedade esta denominada de pressão de exclusão¹⁴⁶. Se o valor da pressão de exclusão obtido para a proteína é menor que o valor de pressão superficial, correspondente ao empacotamento lipídico de uma membrana biológica, isto representa um indicativo de que a proteína não é capaz de penetrar na membrana biológica constituída por aquele fosfolípídeo.

De acordo com os resultados, SEPT2 e SEPT2NG não apresentam interação significativa com a monocamada formada pelo fosfolípídeo DPPC, uma vez que a variação de π foi muito baixa (Figura 2.20 B e C). Além disso, conforme observado nas Figuras 2.18 A, a provável explicação para um valor não nulo de π seja devido a elevada atividade superficial das proteínas. Por outro lado, os experimentos realizados na presença de PtdIns(4,5)P₂ apresentaram um resultado bastante diferente do observado para DPPC puro. Na presença de PtdIns(4,5)P₂, puro ou misto com DPPC, houve uma elevada adsorção da proteína, mesmo para a elevada pressão superficial da monocamada. Comparando os dados para os dois lipídeos, é possível atestar que existe uma ligação da proteína ao PtdIns(4,5)P₂, e além disso, que esta interação é específica (Figuras 2.18 B e C).

Já para o caso da proteína SEPT2G, sem a região polibásica à qual se atribui a ligação ao fosfolípídeo, não foi observada a ligação à monocamada, indicando que a interação com PtdIns(4,5)P₂ se dá por alguma região presente no domínio N-terminal (Figura 2.18 D). Nota-se que mesmo em baixas concentrações, os domínios que possuem a região polibásica ligam na monocamada.

O presente estudo é o primeiro resultado experimental mostrando a ligação específica de SEPT2 ao fosfolípídeo PtdIns(4,5)P₂. Porém, a função e importância dessa interação merece ser melhor entendida em nível molecular e celular.

2.3.7.2 PM-IRRAS

As medidas de adsorção (mostradas acima) mostram claramente a adsorção específica de SEPT2 (e SEPT2NG) na monocamada de Langmuir quando o filme lipídico está altamente

empacotado, porém nada diz a respeito da estrutura secundária das proteínas adsorvidas. Com o objetivo de obter informações a esse respeito, a técnica PM-IRRAS foi utilizada, que possibilita avaliar a estrutura secundária das proteínas adsorvidas em uma monocamada (Figura 2.19).

Continua

Continuação

Figura 2.19 - Espectro de PM-IRRAS de SEPT2 a 20 °C. (A) SEPT2 na ausência de monocamada; (B) SEPT2 na presença de monocamada de DPPC; (C) SEPT2 na presença de monocamada de PtdIns(4,5)P₂. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 70 nM.

Para uma monocamada de Gibbs de SEPT2 na interface ar/água, o espectro de PM-IRRAS apresenta duas bandas principais, centradas em 1653 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , correspondentes as vibrações da amida I e amida II, respectivamente (Figura 2.19 A). Como a posição da banda de amida I é sensível a estrutura secundária da cadeia polipeptídica, o espectro indica que SEPT2 adota predominantemente uma estrutura rica em α -hélice, o que é concordante com os resultados de CD (Figura 2.12).

Provavelmente há outros elementos de estrutura secundária presentes em SEPT2 nesse caso, porém as regiões adsorvidas na interface são compostas principalmente por α -hélices (uma vez que a técnica PM-IRRAS é superfície específica e apenas os grupos na interface são detectados). A intensidade das bandas parece não depender do aumento da pressão superficial, o que é incomum, já que a intensidade geralmente aumenta com a elevação da pressão superficial.

Na presença da monocamada de DPPC, mesmo a 20°C, SEPT2 apresenta uma banda de absorção em 1624 cm^{-1} , referente a uma estrutura secundária rica em folhas- β (Figura 2.19 B). A banda de absorção em aproximadamente 1740 cm^{-1} se refere às vibrações dos grupos C=O presentes nesse lipídeo. Provavelmente a monocamada de DPPC esteja induzindo a proteína a expor regiões hidrofóbicas, já que é um lipídio inespecífico, e esse fato pode estar associado a organização da proteína em fibras amilóides, como é o caso de outras proteínas^{95; 98; 100}.

Interessante notar que, mesmo a elevadas pressões superficiais a proteína ainda permanece interagindo com o filme de DPPC. Esse fato parece estar em contradição com as

cinéticas de adsorção previamente apresentadas, em alto empacotamento lipídico. Entretanto, vale ressaltar que neste caso a proteína foi adsorvida ao filme lipídico a pressão superficial nula, quando o fator predominante para a adsorção foi sua elevada atividade superficial. A proteína adsorvida foi comprimida junto com o filme lipídico e a interação atribuímos a mudança de estrutura da proteína, que permanece na monocamada.

Já na presença da monocamada de PtdIns(4,5)P₂, SEPT2 apresenta uma banda de absorção em torno de 1660 cm⁻¹, referente a uma estrutura secundária rica em α -hélice, mantendo sua conformação original (Figura 2.19 C). Assim é possível que a região da proteína que interage com PtdIns(4,5)P₂ e com DPPC seja diferente. No caso do PtdIns(4,5)P₂, a interação se dá pela região polibásica, rica em aminoácidos carregados positivamente. Já para a monocamada de DPPC, especulamos que a interação ocorra via cauda hidrofóbica, expondo regiões hidrofóbicas, antes enterradas na proteína, que podem contribuir para a formação das fibras amilóides.

As medidas foram realizadas com uma amostra de SEPT2 pré-aquecida a 37 °C por 30 minutos e, posteriormente resfriada em gelo (Figura 2.20).

Continuação

Figura 2.20 - Espectro de PM-IRRAS de SEPT2 a 37 °C. (A) SEPT2 na ausência de monocamada; (B) SEPT2 na presença de monocamada de DPPC; (C) SEPT2 na presença de monocamada de PtdIns(4,5)P₂. Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução Tampão A, a 70 nM.

Na ausência de monocamada, SEPT2 pré-aquecida a 37 °C apresentou um espectro característico de folhas- β (Figura 2.20 A), concordando mais uma vez com os resultados de CD (Figura 2.12). Foram observadas bandas em 1542 cm⁻¹ e 1696 cm⁻¹. Curiosamente, a adsorção foi bem menor, quando comparada com SEPT2 a 20 °C. Esse resultado pode ser devido à formação de homofilamentos, os quais não são capazes de penetrar na monocamada, devido à internalização das regiões hidrofóbicas na formação das estruturas amiloidogênicas.

Com a monocamada de DPPC, o mesmo resultado anterior foi obtido, com SEPT2 apresentando bandas de absorção em 1644 cm⁻¹ e 1696 cm⁻¹, referentes a uma estrutura secundária rica em folhas- β (Figura 2.20 B). A compressão não alterou no deslocamento das bandas de absorção.

Na presença do PtdIns(4,5)P₂, SEPT2 também apresentou bandas de absorção em 1646 cm⁻¹ e 1696 cm⁻¹, referente a uma estrutura secundária rica em folhas- β (Figura 2.20 C). A compressão não alterou no deslocamento das bandas de absorção. Nesse caso a barreira parou em 25 mN m⁻¹. A presença do lipídio específico não reverteu a estrutura secundária de SEPT2, algo já esperado, dada a irreversibilidade da formação das fibras.

Sumarizando os resultados, as variações na pressão superficial e as bandas de absorção na região de Amida I são mostradas nas Tabelas 2.6 e 2.7.

Tabela 2.6 - Variações na pressão superficial (mN m^{-1}).

	SEPT2	SEPT2+DPPC	SEPT2+PtdIns(4,5) P_2
20 °C	10.23	3.48	7.65
37 °C	5	2.5	3.5

Os resultados mostram que SEPT2 possui uma alta atividade superficial, o que explica a grande variação da pressão superficial na ausência da monocamada, porém essa variação é diminuída a 37 °C. Tal diminuição da atividade superficial pode indicar que as estruturas em folhas- β minimizaram a exposição de regiões hidrofóbicas da proteína, que antes adsorviam na interface e que agora estão envolvidas na formação dos filamentos amilóides.

Table 2.7 - Bandas de absorção na região de amida I a 30 mN m^{-1} .

	20 °C	37 °C
SEPT2	1653 cm^{-1} (α -hélice)	1645/1698 cm^{-1} (folhas- β)
SEPT2+DPPC	1624 cm^{-1} (folhas- β)	1644/1698 cm^{-1} (folhas- β)
SEPT2+PtdIns(4,5) P_2	1654 cm^{-1} (α -hélice)	1643/1698 cm^{-1} (folhas- β)

A 20°C, SEPT2 apresenta estrutura secundária rica em α -hélice, estrutura essa que dá lugar às folhas- β , quando a proteína é aquecida. Porém, mesmo em baixa temperatura, SEPT2 já apresenta estrutura secundária características de folhas- β na presença do DPPC. Este resultado sugere que a interação com um lipídeo não específico (DPPC), esteja induzindo a proteína a uma transição para estruturas em folhas- β . É possível que a exposição das regiões hidrofóbicas para a interação com DPPC tenha provocado essa mudança.

Quando a proteína é aquecida, independentemente da monocamada, SEPT2 apresenta estrutura secundária rica em folhas- β . Assim, pode-se inferir que a ligação ao lipídio específico [PtdIns(4,5) P_2] não reverte a mudança estrutural causada pelo aquecimento.

Juntos, esses resultados mostraram que, além de SEPT2 se organizar em filamentos amilóides dependente da temperatura, esse processo também pode ocorrer devido à ligação inespecífica ao DPPC.

2.3.8 Investigação da região de dimerização de SEPT2

2.3.8.1 Análise da oligomerização das proteínas mutantes de SEPT2 por Cromatografia de Exclusão Molecular

Visando confirmar qual interface está envolvida na dimerização de SEPT2, 7 mutantes foram produzidos. Todos foram expressos e purificados por cromatografia de afinidade e posteriormente por exclusão molecular, na coluna Superdex 200 (Figuras 2.21 A, B e C) e Superdex 75 (Figuras 2.21 D, E e F).

Lembrando que SEPT2 possui uma massa molecular de 44 kDa, seu o tamanho esperado seria de aproximadamente 88 kDa para o dímero. As proteínas Conalbumina (75 kDa) e Ovalbumina (43 kDa) usadas como padrões mostram volumes de eluição correspondentes a forma dimérica e monomérica, respectivamente.

No caso da cromatografia de exclusão molecular, usando a Superdex 200, tanto F20D quanto V27D parecem eluir na forma dimérica, apesar da última ter eluído em um volume um pouco maior (Figura 2.21 A). Já F156D, W260A e H270D parecem ter um volume de eluição correspondente a um monômero, apesar de apresentarem um “ombro” correspondente a um dímero (Figura 2.21 B). Esses resultados corroborariam a teoria de Sirajuddin et al., de que as mutações na interface G romperiam o dímero ⁴⁶. Entretanto, o mutante M332D possui um perfil de eluição correspondente a um equilíbrio entre monômero e dímero (Figura 2.21 C), sendo que o esperado, segundo Sirajuddin et al., seriam somente formas diméricas. O mutante L329D teve um perfil de eluição inconclusivo (pico muito largo) (Figura 2.21 C).

Continua

Continuação

Continua

Continuação

Figura 2.21 - Cromatografia de exclusão molecular para SEPT2 e seus mutantes. (A, B e C) Filtração em gel na coluna Superdex 200; (D, E e F) Filtração em gel na coluna Superdex 75. Para efeito de comparação, SEPT2 (44 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ovalbumina (43 kDa) estão presentes em todos os gráficos.

N tentativa de conseguir uma melhor resolução na cromatografia, a coluna Superdex 75 foi usada, já que as formas diméricas seriam excluídas no volume morto da coluna, melhorando assim a separação entre monômeros e dímeros.

Nesse novo experimento, F20D e V27D parecem realmente estarem na forma dimérica, apesar da última ter eluído em um volume um pouco maior novamente (Figura 2.21 D). Já F156D e H270D parecem ter um volume de eluição exatamente entre o que seria esperado para um monômero e um dímero, o que poderia representar uma mistura de populações (Figura 2.21 E). W260A não foi incluída na coluna, o que deve ter acontecido devido a agregação das proteínas (Figura 2.21 E). O mutante M332D também possui um

perfil de eluição entre o que seria esperado para um monômero e um dímero, assim como para F156D e H270D (Figura 2.21 F). Assim como na Figura 2.21 C, o mutante L329D teve um perfil de eluição que impede qualquer conclusão (pico muito largo) (Figura 2.21 F).

A cromatografia de exclusão molecular não é a melhor forma para distinguir as massas das formas oligoméricas de SEPT2. Adicionalmente, seus mutantes não são muito estáveis, principalmente em um tampão sem glicerol, dificultando o processo de caracterização das formas oligoméricas. Na tentativa de obter uma análise mais precisa dos estados oligoméricos de SEPT2 e seus mutantes, experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados.

2.3.8.2 Ultracentrifugação Analítica

Como os resultados gerados pela cromatografia de exclusão molecular foram inconclusivos, realizamos experimentos de Ultracentrifugação Analítica para analisarmos a ocorrência de dimerização ou não dos mutantes de SEPT2.

Os mesmos 7 mutantes foram submetidos a experimentos de Velocidade de Sedimentação (Tabela 2.8) e Equilíbrio de Sedimentação (Tabela 2.9). O mutante H270D precipitou quando as amostras foram congeladas para o transporte, impedindo as análises nesse caso.

Nos experimentos de Velocidade de Sedimentação SEPT2 mostrou um perfil muito heterogêneo, isto é, com várias formas oligoméricas. F20D e V27D estavam, na sua maioria, na forma dimérica, enquanto F156D apresentou 51% de monômeros e muitos agregados. W260A, L329D e M332D apresentaram um equilíbrio de formas oligoméricas.

Tabela 2.8 - Velocidade de Sedimentação.

Proteína	Concentração (μM)	Resultado
SEPT2	4	Monômeros (31%) e Dímeros globulares (38%);
	8	Monômeros (18%) e Dímeros globulares (27%);
F20D	6,3	85% Dímero globular
V27D	7,2	75% Dímero globular
F156D	4	51% Monômero globular
W260A	6,9	Equilíbrio Monômero (36%) e Dímero (41%)
L329D	7,6	Equilíbrio Monômero (34%) e Dímero (62%)
M332D	6,4	Equilíbrio Monômero (51%) e Dímero (48%)

Os resultados obtidos pelos experimentos de Equilíbrio de Sedimentação também não foram muito conclusivos. Como a massa resultante é a média das massas das espécies existentes na amostra e havia muitos agregados, a maioria das massas foi maior do que a massa dos dímeros. Esse foi o caso de SEPT2, F20D, V27D e F156D para todas as concentrações, com exceção de V27D a 9,5 μM , que apresentou uma massa média de 78,4 KDa. Já os mutantes W260A, L329D e M332D apresentaram massas moleculares correspondentes a dímeros, o que era esperado para L329D e M332D, mas não para W260A, segundo os resultados de Sirajuddin et al.

Tabela 2.9 - Equilíbrio de Sedimentação.

Proteína	Concentração (μM)	Média da Massa molecular (KDa)
SEPT2	3,7	103,9
	4,5	108,6
	6	99,6
F20D	4,8	113,3
	6	146,1
	7,5	155,6
V27D	3,5	133,8
	4,5	96,4
	9,5	78,4
F156D	1,2	124,1
	2	140,2
	2,8	135,3
W260A	3	89,5
	4	92,1
	5	95
L329D	5,7	81,2
	11	78,5
	14	85,5
M332D	7,8	70,6
	17,7	84,3
	25,5	84,9

O fato das proteínas estarem diluídas em um tampão contendo apenas 2% de Glicerol (não é possível utilizar uma concentração maior para este tipo de experimento) e as medidas terem sido feitas a 10°C por muitas horas (no caso dos experimentos de Equilíbrio de Sedimentação foram 3 dias) pode ter contribuído para a agregação das mesmas. Os resultados desses experimentos não permitiram ainda validar a real região de dimerização de SEPT2.

2.4 Conclusões e Considerações finais

Neste trabalho realizamos estudos estruturais e bioquímicos da septina 2 humana (SEPT2) e de seus domínios, por meio de construções truncadas. O gene em questão foi isolado a partir de uma biblioteca e cDNA de cérebro fetal humano e as sequências codificantes dos domínios foram então subclonadas utilizando oligonucleotídeos específicos. Para todas as construções foi estabelecido um sistema de expressão e purificação que possibilitou a produção de proteínas com pureza e quantidade adequadas para a realização dos estudos subsequentes.

SEPT2 e seus domínios se mostraram enoveladas estruturalmente e, ainda, ensaios *in vitro* de hidrólise do GTP comprovaram a atividade catalítica de SEPT2.

Na tentativa de esclarecer qual a região envolvida na dimerização de SEPT2 em solução, foram construídos mutantes da proteína. As proteínas mutantes de SEPT2 foram expressas, purificadas e submetidas à filtração em gel, para análise do estado oligomérico. Infelizmente não foi possível obter conclusões sobre os resultados, devido à agregação e precipitação das amostras durante os experimentos. Com esse mesmo intuito foram realizados experimentos de Ultracentrifugação Analítica, mas ainda sem sucesso. Novas abordagens, como alterações nas soluções tampões, devem ser tentadas a fim de obter resultados que possam ser analisados de forma comparativa.

Características amiloidogênicas de SEPT2 foram estudadas e identificadas, por meio de programas de predição e de experimentos estruturais. Foi observado que tanto SEPT2, como seu domínio SEPT2G agregam sob determinadas condições, de forma irreversível. Além disso, esses agregados possuem estrutura secundária característica de folhas- β e têm a capacidade de ligar-se a ThT, sugerindo que se tratam de amilóides em sua natureza. Foi observado também que os filamentos são formados na ausência de nucleotídeo ligado, já que esse é liberado à medida que a proteína inicia a agregação. Imagens desses filamentos foram obtidas, corroborando os resultados anteriores sobre agregação.

Utilizando a técnica de Monocamadas de Langmuir, foi possível observar a ligação específica de SEPT2 ao fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato [PtdIns(4,5)P₂]. Tal comprovação ainda não havia sido descrita experimentalmente na literatura, apesar de predita. Além disso, os experimentos demonstraram que essa ligação manteve a secundária de SEPT2, algo que não ocorreu na presença de um fosfolípido inespecífico (no caso DPPC). Dessa forma, a

interação com o DPPC parece induzir a exposição de regiões hidrofóbicas de SEPT2, facilitando a formação das fibras amilóides.

Em um ambiente celular em condições normais, várias septinas são expressas, se reunindo na forma de heterofilamentos. Algum problema que interfira nessa organização, ou até mesmo que interfira na ligação específica de SEPT2 (ou do heterofilamento SEPT2, 6 e7) ao [PtdIns(4,5)P₂], pode levar SEPT2 a se organizar em estruturas amiloidogênicas, resultando em patologias neurodegenerativas.

As evidências experimentais obtidas nesse trabalho reforçam a tese de que SEPT2 está envolvida em doenças neurodegenerativas, porém experimentos futuros deverão ser feitos para esclarecer o que controla o processo de agregação e/ou formação de estruturas amilóides.

Experimentos futuros envolvendo a produção dos peptídeos, correspondentes as sequências preditas amilóides, proporcionará um sistema modelo menos complexo e, dessa forma, será possível estudar individualmente cada uma dessas regiões de SEPT2. Mutações pontuais nessas regiões, no caso do domínio GTPase, também possibilitarão avaliar com mais clareza o envolvimento dessas regiões preditas como amiloidogênicas.

Em relação à interação de SEPT2 com lipídeos, a obtenção de imagens dos supostos filamentos, formados devido à interação inespecífica, poderá comprovar a hipótese de indução da formação das fibras amilóides pela interação inespecífica com DPPC.

Concluindo, entender o envolvimento das septinas nessas patologias ajudará a compreender mais profundamente os mecanismos moleculares e consequentemente, formas de prevenção e terapias.

CAPÍTULO 3: Identificação de parceiros protéicos de SEPT2

Capítulo 3 Identificação de parceiros protéicos de SEPT2

3.1 Justificativa e Objetivos

SEPT2 está relacionada a vários processos fisiológicos relevantes, porém há poucas informações disponíveis a respeito de seu envolvimento nos processos e mecanismos celulares. Assim, a identificação de proteínas que interagem com SEPT2 pode contribuir para esclarecer de detalhes de suas funções.

Nesse contexto, este capítulo apresenta os estudos de interação de SEPT2 com outras proteínas, realizado pela técnica de Duplo Híbrido em levedura, visando identificar novas proteínas parceiras que interagem com SEPT2.

Frente a essas considerações, as etapas no desenvolvimento desse estudo foram:

- I. Subclonagem da ORF de SEPT2 no plasmídeo pBTM 116;
- II. Realização do teste de auto-ativação do sistema;
- III. Busca de parceiros em duas bibliotecas de cDNA: cérebro fetal humano e leucócitos humanos;
- IV. Seleção dos possíveis parceiros de interação, por meio dos testes de ativação dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3*;
- V. Clonagem, expressão e purificação das proteínas candidatas;
- VI. Validação das interações de SEPT2 com as proteínas selecionadas, a partir de experimentos *in vitro*, com ensaios de *pull-down*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Técnica do duplo Híbrido em levedura

Vários processos celulares ocorrem devido à interação entre proteínas, como por exemplo, no ciclo celular, replicação, transcrição, tradução, entre outros. Assim, as interações entre proteínas são fundamentais para a manutenção da organização, dinâmica e função celular. Além disso, identificar todas as proteínas envolvidas em um complexo protéico ou em uma via metabólica, por exemplo, auxilia no melhor entendimento desses processos e da função de cada proteína envolvida ¹⁴⁷.

A técnica de duplo híbrido em levedura permite a identificação de parceiros protéicos de uma proteína específica, sendo uma importante ferramenta nesse contexto ^{147; 148}.

O ensaio do duplo híbrido em leveduras foi primeiramente descrito em 1989 por Fields e Songs ¹⁴⁹, e é baseado no fato de que muitos fatores de transcrição de eucariotos são formados por dois domínios distintos: um de ligação ao DNA (BD) e outro de ativação (AD). A interação de proteínas fusionadas a estes domínios, de modo a favorecer a reconstituição do fator de transcrição, conduz a ativação da transcrição de um ou mais genes repórteres (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Esquema ilustrativo do sistema duplo híbrido em leveduras. X corresponde à proteína de interesse (isca) fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD), Y, a proteína (presa) fusionada ao domínio de ativação do fator de transcrição (AD). BD-X liga-se a ao promotor na sequência UAS; Y-AD ao interagir com X-BD, ativa a transcrição do gene repórter, permitindo identificar a interação. Modificado a partir de Causier ¹⁴⁸.

3.2.2 Subclonagem do gene SEPT2 no vetor pBTM 116

3.2.1.1 Amplificação e clonagem em vetor de propagação

Inicialmente, se faz necessária a clonagem da sequência codificadora da proteína “isca” (nesse caso SEPT2) fusionada ao domínio de ligação ao DNA (a proteína LexA) em um plasmídeo de expressão em leveduras.

Para a amplificação do gene SEPT2, utilizou-se a técnica da *Reação em Cadeia da Polimerase* - PCR, em um termociclador PTC-100 (Eppendorf) tendo como molde um plasmídeo contendo a ORF de SEPT2. Para isso foram sintetizados *primers* (GIBCO-BRL), que flanqueavam a região codificante (Tabela 3.1):

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação de SEPT2.

Oligonucleotídeos	Seqüência de nucleotídeos
SEPT2-Forward-EcoRI	5' GGAATTCATG TCTAAGCAACAGCCAACTCAG 3'
SEPT2-Reverse-PstI	5' CTGCAGTTTACACGTGGTGCCCGAG 3'

*Os nucleotídeos grifados fazem parte do sítio de reconhecimento da endonuclease.

Nas reações de PCR foram usados os reagentes descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados na reação de amplificação de SEPT2.

Reagentes	Concentração final
pGEMSEPT2 (molde)	100 ng
Primer forward	100 pmol
Primer reverse	100 pmol
dNTP's (Desoxinucleotídeos tri-fosfato)	0,2 mM
High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas)	1 unidade
Tampão da enzima	[1X]
MgSO ₄	2,5 mM
Água Milli Q	33 µl
Volume final	50 µl

Para as reações, o ciclo de amplificação foi realizado aquecendo as amostras a 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida de 25 ciclos: 94°C por 0,5 minutos

(desnaturação das fitas), 62°C por 0,5 minutos (hibridização dos oligonucleotídeos) e 68°C por 2 minutos (extensão das fitas). Por fim, foi feita uma extensão final por 5 minutos a 68°C

Os produtos amplificados foram purificados com o kit Wizard® SV Gel e PCR *Clean-up System* (Promega), purificados e inseridos no vetor pGEMT-Easy.

A mistura de reação foi incubada a 4°C por 16 horas. Ao plasmídeo recombinante foi dado o nome de pGEM_SEPT2yh2. Ao término da incubação, todo o volume da reação foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α , competente por tratamento com Cloreto de Cálcio ¹⁰⁶. A uma alíquota de células foi adicionada a reação de ligação que, após incubação no gelo por 5 minutos, foi submetida ao choque térmico a 42°C por 1 minuto. Em seguida adicionou-se às células 200 μ L de meio LB e as células se dividiram durante 1 hora, em meio LB, a 37°C, antes de serem plaqueadas em meio LB Agar, contendo o antibiótico Ampicilina [100 μ g/mL], IPTG [0,4mM μ g/mL] e X-Gal [100 μ g/mL]. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

As colônias foram crescidas em meio LB com ampicilina [100 μ g/mL] e tiveram seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina ¹⁰⁶, o qual foi analisado por análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (10 unidades de cada).

3.2.1.2 Sequenciamento

Dentre os clones positivos para a análise de restrição, cinco deles foram escolhidos aleatoriamente para terem suas sequências determinadas. Para o sequenciamento foi utilizada a técnica de didesoxinucleotídeo marcado ¹⁰⁷ em um seqüenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer). Os oligonucleotídeos, SP6 e T7, próprios para o vetor pGEMT-Easy foram utilizados.

3.2.1.3 Construção do vetor de expressão

Após confirmação da clonagem, o fragmento gênico correspondente a SEPT2 foi isolado do plasmídeo pGEMT-*Easy* por eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X], seguido de excisão e purificação da banda de interesse do gel, com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). O plasmídeo pBTM também foi linearizado com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e purificado da mesma forma.

Em seguida, foi feita a ligação de 100 ng do fragmento gênico no vetor pBTM (150 ng), previamente linearizado, utilizando a enzima T4 DNA Ligase, em um volume final de 10 µl. As reações foram incubadas a 4°C por 16 horas.

Após a incubação, células da linhagem *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com Cloreto de Cálcio, foram transformadas por choque térmico, usando todo o volume das misturas de ligação¹⁰⁶. As colônias positivas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico no vetor: canamicina [30 µg/mL].

Os clones tiveram, então, seu DNA plasmidial extraído e a clonagem confirmada por análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. Confirmada a clonagem nos vetores de expressão, células da linhagem *E. coli* BL21(DE3), competentes por tratamento com Cloreto de cálcio, foram transformadas¹⁰⁶ com o plasmídeo de expressão (nomeado pBTM_SEPT2).

3.2.2 Teste de auto-ativação

3.2.2.1 Transformação de levedura em pequena escala

Após a confirmação da clonagem de SEPT2, em *frame* com BD (LexA), no plasmídeo pBTM116, foi realizado o teste de auto-ativação do sistema, analisando a expressando dos genes repórteres. Caso a atividade destes genes repórteres seja observada, descarta-se esta construção de DNA e iniciam-se outras clonagens usando construções parciais da isca, a fim de obter um domínio que não autoative o sistema.

O plasmídeo recombinante pBTM_SEPT2 foi utilizado para transformar a cepa L40 (*trp1-901, his3_200, leu2-3,ade2 LYS2:::(lexAop)4-HIS3 URA3:::(lexAop)8-lac GAL4*) de

Saccharomyces cerevisiae. Uma colônia isolada de L40 foi inoculada em 50 mL de meio YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % peptona e 2 % de glicose) por aproximadamente 24 horas, a 30 °C, sob agitação a 200 rpm, até atingir a fase estacionária ($DO_{600nm} \geq 1,5$). Aliquotas de 1 mL do inóculo foram separadas para cada transformação, centrifugadas a temperatura ambiente por 3 minutos a 2.300 x g. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspenas em 200 µL de tampão de transformação (34,5 % de PEG 3350, 0,2 M de acetato de lítio, TE 1X, 0,1 M de DTT). À suspensão foram adicionados 100 µg de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado (95 °C por 10 minutos seguidos de 3 minutos em gelo) e 100 ng de DNA plasmidial, em seguida a mistura foi incubada em banho-maria a 45 °C, por 40 minutos, sob leve agitação a cada dez minutos. As células foram centrifugadas a temperatura ambiente por 5 minutos a 800 x g. 100 µL do sobrenadante foram descartados e as células foram ressuspenas e espalhadas em placas de petri (140 x 15 mm) com meio SD-W (Tabela 3.3). O controle do procedimento foi a transformação de L40 com água. As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

Tabela 3.3 - Meios de Cultura utilizados no experimento de Duplo Híbrido em Levedura.

Componente	SD-W	SD-WL	SD-WLH
YNB (difco yeast nitrogen base w/o amino acids)	6,7 g/L	6,7 g/L	6,7 g/L
Glicose	20,0 g/L	20,0 g/L	20,0 g/L
Adenina	0,02 g/L	0,02 g/L	0,02 g/L
Leucina	0,03 g/L	---	---
Histidina	0,02 g/L	0,02 g/L	---
Triptofano	---	---	---
Ágar*	18,0 g/L	18,0 g/L	18,0 g/L

* Ágar é adicionado apenas para meio sólido.

3.2.2.2 Ensaio da β -galactosidase em papel de filtro

Este ensaio foi realizado logo após a obtenção da levedura expressando o gene de interesse (“isca”, nesse caso SEPT2) no intuito de confirmar que a isca por si só não ativava o sistema, podendo neste caso ser chamado de teste de auto-ativação ou transativação.

Colônias isoladas de leveduras transformadas foram repicadas em duplicata em meio SD-WLH sólido e crescidas a 30 °C, por 3 dias, em seguida uma das placas foi utilizada para

transferência das colônias para papel de filtro e a outra armazenada em geladeira. O papel de filtro foi colocado sobre o meio de cultura e levemente pressionado com uma alça de Drigalsky para que as células se fixassem nele, em seguida foi imerso em nitrogênio líquido por 3 minutos para lise das células. O papel de filtro com a face contendo as células voltado para cima foi colocado sobre outro papel de filtro pré-imerso em 5 mL de tampão Z (16,1 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/L de KCl e 0,246 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) 13,5 μL de β -mercaptoetanol e 83,5 μL de X-gal 20 mg/mL, em uma placa de petri. O papel de filtro foi incubado a 37°C até o surgimento de colônias azuis e depois foi colocado em uma capela para secar.

Para o teste de auto-ativação, utilizou-se como controle positivo o clone de L40 expressando FEZ1 (1 a 392 resíduos) fusionada ao domínio de ligação ao DNA de LexA, que auto-ativa o sistema¹⁵⁰, cedido pelo Dr. Jörg Kobarg, do Laboratório de Biologia Molecular do LNBio, em Campinas. O controle negativo foi L40 transformada com o plasmídeo pBTM116 vazio.

3.2.3 *Screening* da biblioteca

3.2.3.1 Transformação em grande escala

Após a confirmação que pBTM_SEPT2 não auto-ativava o sistema, iniciou-se os procedimentos para *screening* dos clones das bibliotecas de cDNA de Cérebro fetal humano (CFH) Matchmaker™ (Clontech) e de Leucócitos humanos Matchmaker™ (Clontech), cujos cDNAs estão fusionados ao domínio de ativação GAL4, no plasmídeo pACT2. Ambas as bibliotecas de cDNA possuem um milhão de clones e o procedimento descrito abaixo foi realizado para o *screening* de 500.000 clones de cada biblioteca.

Três colônias isoladas de L40, pré-transformada com pBTM_SEPT2, foram transferidas para 1 mL de meio SD-W e ressuspensas por agitação vigorosa. A suspensão celular foi transferida para 150 mL de meio SD-W e incubada a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 24 horas, até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}} \geq 1,5$. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000 x g, 21 °C por 5 minutos, transferidas para 1000 mL de meio YPD e incubadas a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 4 horas, até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,4 e 0,6.

As células foram centrifugadas a 1.000 x g, 21 °C por 5 minutos, ressuspensas em 400 mL de TE 1X, novamente centrifugadas na mesma condição anterior. O precipitado de células foi então ressuspensão em 8 mL de TE 1X/LiAc (Tabela 3.4) e a suspensão foi dividida igualmente em dois tubos cônicos (“Falcon”). Duas alíquotas de 200 µL foram retiradas para as transformações controles. A cada tubo foram adicionados 10 mg de DNA de esperma de salmão desnaturado (15 minutos a 95 °C seguido de 10 minutos em gelo) e 150 µg de DNA da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano ou da biblioteca de cDNA de leucócitos humanos, 30 mL de PEG/LiAc (Tabela 3.4) e em seguida foram incubados a 30°C, 200 rpm durante 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42°C, por 15 minutos e banho de gelo por 3 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000 x g, 21°C por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de TE 1X. Alíquotas de 250 µL foram espalhadas em placas de petri (140 mm x 15 mm) contendo SD-WLH com 5 mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol, que é um inibidor competitivo da proteína HIS3). Para analisar a eficiência da transformação as seguintes titulações da suspensão celular 1:10, 1:100 e 1:1000 foram espalhadas em placas de petri contendo SD-WL. As placas foram incubadas a 30°C por 6 dias. O crescimento de colônias nas placas foi monitorado diariamente marcando-se as colônias com tamanho aproximado de 2 mm.

As transformações controles foram realizadas adicionando-se 600 µL de PEG/LiAc (Tabela 3.4), 100 µg de DNA de esperma de salmão e 10 µL de água ou 100 ng de DNA do plasmídeo pGAD424 às alíquotas de 200 µL de suspensão celular. O procedimento foi realizado como descrito acima e as células foram ressuspensas em 250 µL de TE e espalhadas em SD-WL.

Após seis dias, as colônias transformantes foram repicadas em meio SD-WL com réplica e meio SD-WLH com 5 mM de 3-AT para confirmar a presença dos dois plasmídeos. As colônias que não cresceram neste meio entre 3 a 4 dias foram eliminadas para os testes futuros. A confirmação do crescimento das colônias no meio SD-WLH com 3-AT é o primeiro teste para eliminar falsos positivos, em seguida foi realizado o teste da β-galactosidase (item 3.2.2.2) como o segundo passo para eliminar falsos positivos.

Tabela 3.4 - Soluções usadas na transformação das leveduras.

Solução	Componentes
TE 10X	0,1 M Tris-HCl , 10 mM EDTA, pH 7,5
PEG/LiAc	8 mL PEG 3350 50%, 1 mL de TE 10X, 1 mL LiAc 10X
LiAc 10 X	LiAc 1 M, ajustar pH para 7,5 com ácido acético
TE 1X/LiAc	1 mL TE 10X, 1 mL LiAc 10 X, 8 mL H ₂ O milli-Q

3.2.3.2 Extração de DNA plasmidial de levedura

As colônias de leveduras positivas para o teste da β -galactosidase foram inoculadas em meio SD-L, para seleção do plasmídeo recombinante pACT2, e incubadas a 30°C e a 200 rpm por 20 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e ressuspendidas em 60 μ L de tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Adicionou-se 20 μ L de liticase 5 mg/mL, seguida de agitação vigorosa e incubação em banho-maria a 37°C por uma hora, com leve agitação a cada 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 20 μ L de SDS 20% e agitou-se vigorosamente por um minuto. As amostras foram então submetidas a 10 ciclos de 20 segundos em nitrogênio líquido intercalado com 20 segundos em banho-maria a 42 °C. Em seguida adicionou-se 100 μ L de água milli-Q e 200 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v). Agitou-se vigorosamente a mistura por 1 minuto e centrifugou-se por 1 minuto a 16.000 x g. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 300 μ L), adicionou-se 10 μ L de LiCl 8 M e 300 μ L de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se a mistura, seguindo-se com uma incubação a -20 °C por 20 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O excesso de sal foi retirado por lavagem do DNA precipitado com 500 μ L de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação por 10 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, após secar a temperatura ambiente, foi ressuspenso em 30 μ L de água milli-Q.

Células de *E. coli* DH5 α , foram transformadas com 15 μ L dos DNAs plasmidiais extraídos de leveduras. As células transformadas foram selecionadas em meio LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina. O procedimento de transformação por choque térmico foi realizado como descrito por Sambrook ¹⁰⁶.

3.2.3.3 Extração de DNA plasmidial de bactéria

Os DNAs plasmidiais bacterianos para Sequenciamento foram extraídos pelo método da lise alcalina seguida de precipitação com álcool ¹⁰⁶. Colônias isoladas de bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C por 16 horas a 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e ressuspendidas em 300 µL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0) por agitação vigorosa. Em seguida, adicionou-se 300 µL de solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS), agitou-se a mistura por inversão e manteve-a por 5 minutos a temperatura ambiente. 300 µL de solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água) foram adicionados, misturando por inversão e centrifugando a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, 0,7 volume de isopropanol foi adicionado seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. A precipitação do DNA procedeu-se por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O excesso de sal foi retirado por lavagem do precipitado com 500 µL de etanol 70% seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. O DNA precipitado secou a temperatura ambiente e então foi ressuspenso em 50 µL de água.

3.2.3.4 Sequenciamento de DNA e análise de sequências

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactérias foram sequenciados em sequenciador automático no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (atual LNBio), em Campinas, sob coordenação do Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin.

As sequências foram analisadas com programas disponíveis nos seguintes endereços eletrônicos: análise de similaridade de sequências, BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; tradução das sequências de nucleotídeos, ORF Finder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>; alinhamento de sequências, MultAlin <http://multalin.multalin.html>; análise de restrição Webcutter 2.0 <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. A análise das sequências permitiu escolher quais os clones “pescados” no *screening* da

biblioteca com SEPT2 eram potenciais alvos para dar continuidade aos experimentos com a validação do duplo híbrido.

3.2.3.5 Co-transformação das leveduras para confirmação da interação de SEPT2 com os clones selecionados do *screening* das bibliotecas

Após as análises das seqüências, todos os clones considerados positivos foram selecionados para dar continuidade com o duplo-híbrido. Os plasmídeos, AD-presa (da biblioteca) e o plasmídeo BD-SEPT2 foram então utilizados na co-transformação de levedura com o propósito de mais uma vez submeter os clones obtidos aos testes de expressão dos genes repórteres e desta forma eliminar interações falso-positivas.

As leveduras L40 foram co-transformadas com pBTM_SEPT2 e cada um dos clones pré-selecionados das bibliotecas. O procedimento de transformação foi realizado como descrito no item 3.2.2.1, sendo utilizado 100 ng de cada DNA plasmidial e o meio seletivo foi SD-WL.

Além das transformações citadas anteriormente, foram realizadas também as co-transformações com o plasmídeo pBTM116 vazio e cada um dos clones e pBTM_SEPT2 com o plasmídeo pGAD424. O controle do procedimento foi a transformação de L40 com água. Após o crescimento de colônias nas placas foi realizado o teste para a confirmação da presença dos dois plasmídeos recombinantes em L40.

Colônias isoladas de L40 com pBTM_SEPT2 e clones da biblioteca foram repicadas em meio SD-WLH com 5 mM de 3-AT. As colônias que cresceram neste meio foram transferidas para meio SD-WL juntamente com colônias das outras transformações com pBTM116 vazio. Essas colônias foram submetidas ao ensaio da β -galactosidase conforme descrito no item 3.2.2.2.

Após estas etapas de eliminação dos falso-positivos, as interações que foram positivas no ensaio do duplo híbrido devem ser confirmadas por técnicas *in vitro*, como *pull-down* ou coimunoprecipitação.

3.2.4 Produção heteróloga das proteínas selecionadas que interagem com SEPT2

3.2.4.1 Amplificação do cDNA e clonagem dos genes que codificam as proteínas MBIP e DCTN2

No intuito de validar, *in vitro*, as interações identificadas pela técnica de duplo híbrido em levedura, dois genes foram escolhidos para serem clonados e produzidos de forma heteróloga em *E. coli*.

Para a amplificação dos genes *MBIP* (*MAP3K12-binding inhibitory protein 1*) e *DCTN2* (*Dynactin 2*), utilizou-se a técnica da *Reação em Cadeia da Polimerase* - PCR, em um termociclador PTC-100 (Eppendorf), tendo como molde uma biblioteca de cDNA, de cérebro fetal humano no caso de *MBIP*, e de leucócito no caso de *DCTN2*. Para isso foram sintetizados *primers* (IDT), que flanqueavam as regiões codificantes (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação de MBIP e DCTN2.

Oligonucleotídeos	Seqüência de nucleotídeos
MBIP-Forward-BamHI	5' AGGATCCAGATGGCTGCTGCCACGGAGCATAATCG 3'
MBIP-Reverse-XhoI	5' ACTCGAGTCATGGAAGGTGGTGGGTGGCCATGG 3'
DCTN2-Forward-Nhe	5' GGCTAGCCTTGGAGAGGGTCTGGGAGTG 3'
DCTN2-Reverse-BamHI	5' CGGATCCTCACTTTCCCAGCTTCTTCATCC 3'

*Os nucleotídeos grifados fazem parte do sítio de reconhecimento da enzima.

Nas reações de PCR foram usados os reagentes descritos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Reagentes utilizados na reação de amplificação de MBIP e DCTN2.

Reagentes	Concentração final
Biblioteca de cDNA	500 ng
<i>Primer forward</i>	100 pmol
<i>Primer reverse</i>	100 pmol
dNTP's (Desoxinucleotídeos tri-fosfato)	0,2 mM
<i>High Fidelity PCR Enzyme Mix</i> (Fermentas)	1 unidade
Tampão da enzima	[1X]
MgSO ₄	5 mM
Água Milli Q	31,5 µl
Volume final	50 µl

Para as reações, o ciclo de amplificação foi realizado aquecendo as amostras a 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida de 25 ciclos: 94°C por 0,5 minutos (desnaturação das fitas), 60°C por 0,5 minutos (hibridização dos oligonucleotídeos) e 68°C por 2 minutos (extensão das fitas). Por fim, foi feita uma extensão final por 5 minutos a 68°C. Para DCTN2, a temperatura de hibridização foi de 60°C.

Os produtos resultantes das amplificações foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR *Clean-up System* (Promega). Em seguida foi feita uma reação que promovesse a ligação das sequências amplificadas (100 ng) a 50 ng do vetor TOPO TA Cloning®, que possui a enzima Topoisomerase I ligada covalentemente, responsável pela ligação do inserto no vetor.

A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e, posteriormente, todo o volume da reação foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5α, competente por tratamento com Cloreto de Cálcio ¹⁰⁶.

As células cresceram durante 1 hora, em meio LB a 37°C, antes de serem plaqueadas em meio LB ágar, contendo o antibiótico ampicilina [100 µg/mL], IPTG [0,4mM µg/mL]_{final} e X-Gal [100 µg/mL]. As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 16 horas.

As colônias foram crescidas em meio LB contendo Ampicilina [100 µg/mL]. Foi então extraído o DNA plasmidial dessas colônias por lise alcalina ¹⁰⁶, o qual foi analisado para verificar a presença do inserto por análise de restrição.

3.2.4.2 Sequenciamento

Conforme descrito anteriormente, dentre os clones positivos cinco deles foram escolhidos aleatoriamente para terem suas sequências determinadas. Para o Sequenciamento foi utilizada a técnica de didesoxinucleotídeo marcado ¹⁰⁷ em um sequenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer). Os oligonucleotídeos, M13 *forward* e M13 *reverse*, próprios para o vetor TOPO TA Cloning[®] foram utilizados.

3.2.4.3 Construção dos vetores de expressão

Após confirmação da clonagem, pela análise de restrição e Sequenciamento, os fragmentos foram isolados do plasmídeo TOPO TA Cloning[®], utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, no caso de *MBIP*, e *Nhe* e *Bam*HI, no caso de *DCTN2*. Todo o volume da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X], seguido de excisão e purificação da banda de interesse do gel, com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega).

Em seguida, utilizando a enzima T4 DNA Ligase, foi feita a ligação dos fragmentos gênicos no vetor pGEX 5.1 no caso de *MBIP*, e pET 28a no caso de *DCTN2*, previamente linearizado com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente.

As reações foram incubadas a 4°C, *overnight*. Após o tempo de incubação, células da linhagem *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com Cloreto de Cálcio, foram transformadas por choque térmico, com todo o volume das misturas de ligação ¹⁰⁶. As colônias positivas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico no vetor: ampicilina no caso do pGEX 5.1 e canamicina no caso do pET 28a.

Os clones tiveram, então, seu DNA plasmidial extraído e confirmado por análise de restrição com suas respectivas enzimas. Confirmada a clonagem nos vetores de expressão, células da linhagem *E. coli* BL21(DE3), competentes por tratamento com Cloreto de cálcio, foram transformadas ¹⁰⁶ com um plasmídeo positivo, para a expressão. Os plasmídeos de expressão receberam a seguinte denominação: pGEX_MBIP e pET_DCTN2.

3.2.4.4 Teste de solubilidade

Foi feito um pré-inóculo das culturas de *E. coli* Rosetta(DE3) contendo pGEX_MBIP ou pET_DCTN2 em LB, com os respectivos antibióticos para cada plasmídeo. Esses pré-inóculos foram incubado a 37°C por 16 horas, sob agitação de 250 rpm e a seguir diluído (1:50), em meio LB contendo os antibióticos de seleção. As células foram crescidas, em constante agitação a 37°C, até atingir uma D.O._{600 nm} entre 0,4 e 0,6. Depois de atingida essa densidade de células, a cultura foi induzida com [0,4mM µg/mL] de IPTG. Após a indução as culturas foram incubadas a 18°C, por 16 horas, sob agitação de 200 rpm.

Após a incubação, cada cultura foi centrifugada por 5 minutos a 10.000xg e as células foram então ressuspensas em 5 ml de tampão PBS e, então, lisadas por sonicação com 10 ciclos (15 segundos de pulso ultra-som intercalados com 15 segundos de intervalo). Os lisados foram centrifugados por 30 minutos a 20.000xg, separando assim a fração solúvel e a precipitada, sendo esta última ressuspensa em 5 ml do mesmo tampão. Aliquotas foram retiradas e submetidas à SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli¹⁰⁸.

3.2.4.5 Purificação dos produtos recombinantes solúveis

Inicialmente foi feita uma purificação por cromatografia de afinidade, usando uma resina de Glutathione Sepharose para MBIP e uma resina de Ni-NTA para DCTN2, já que as proteínas recombinantes foram produzidas como proteínas de fusão a proteína GST e a um hexapeptídeo de histidina, na porção N-terminal, respectivamente. As colunas foram equilibradas com 10 volumes de PBS e, em seguida, as frações solúveis dos extratos celulares foram aplicadas nas respectivas colunas. Estas foram então lavadas com 10 volumes de PBS e, a seguir, foram aplicados mais 10 volumes de PBS contendo Imidazol 10 mM, no caso da DCTN2, para retirar contaminantes ligados com baixa afinidade. Finalmente, as proteínas de interesse foram eluídas em 10 volumes de PBS contendo 300 mM de Imidazol, no caso da DCTN2, e 10 mM de Glutathione reduzida, no caso da MBIP.

No caso de DCTN2, o eluato foi concentrado e aplicado numa coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 (Amersham-Pharmacia), previamente equilibrada com

PBS. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, monitorado pela absorbância em 280 nm e o material eluído foi coletado em frações de 0,5 mL. Aliquotas do eluato foram retiradas e então submetidas à SDS-PAGE 15%.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Duplo Híbrido em levedura

3.3.1.1 Construção do plasmídeo pBTM_SEPT2 e teste de auto-ativação

O sistema utilizado foi formado pela fusão da proteína de interesse (isca), nesse caso SEPT2, ao domínio de ligação ao DNA LexA de leveduras, presente no plasmídeo pBTM116. Os genes presentes na biblioteca de cDNA (presas), por sua vez, se encontravam fusionados ao domínio de ativação Gal4, presente no plasmídeo pACT2 ou pGAD424 (Clontech). A cepa de *Sacharomyces cerevisiae* L40 utilizada possui dois genes repórteres, o *lacZ*, cuja expressão é detectada pelo teste da β -galactosidase, e o gene *HIS3*, que confere auxotrofia às células em meio de cultura sem histidina.

A primeira etapa para realizar o ensaio do duplo híbrido foi construir o plasmídeo recombinante contendo a isca SEPT2 fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD). Assim, a sequência codificadora de SEPT2 foi amplificada e inserida no plasmídeo pBTM116 de forma a manter a janela aberta de leitura do BD do gene *lexA*. A confirmação da clonagem foi realizada pela análise de restrição do clone (Figura 3.2) e pelo Sequenciamento automático.

Figura 3.2 - Análise de restrição de SEPT2-pBTM116. Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1 e 2 correspondem ao DNA plasmidial clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, liberando um fragmento com aproximadamente 1000 pb, correspondente a *SEPT2*. O fragmento superior em 1 e 2 corresponde ao plasmídeo pBTM116.

Depois de confirmada a integridade da sequência, foi realizada a transformação de L40 com pBTM_SEPT2, selecionando os clones em meio de cultura sem triptofano.

Algumas proteínas quando fusionadas com o domínio de ligação ao DNA ativam a transcrição dos genes repórteres, atuando dessa forma como domínio de ativação da transcrição. Desta forma torna-se importante o teste de auto-ativação, que corresponde a análise da expressão do gene *lacZ*, com o ensaio da β -galactosidase. A presença de colônias azuis significa que a proteína isca está ativando o sistema, desta forma ela não pode ser usada como isca. Quando isso acontece, realiza-se o mapeamento de partes da proteína para a auto-ativação, a região que não ativar o sistema é usada como isca no duplo híbrido.

O teste de auto-ativação foi feito com 6 colônias isoladas de L40 contendo pBTM_SEPT2 e nenhuma foi positiva para o teste de auto-ativação, ou seja, as colônias permaneceram brancas após o contato com o substrato da enzima β -galactosidase. Neste teste utilizou-se como controle L40 expressando FEZ1¹⁵⁰, proteína que ativa o sistema. Este clone foi cedido pelo Dr Jörg Kobarg, LNLS, Campinas.

Confirmado que SEPT2 fusionada ao domínio de ligação ao DNA de *lexA* não ativava a expressão da β -galactosidase, o próximo passo foi analisar o escape da expressão do gene repórter *HIS3*. Colônias isoladas de L40 contendo pBTM_SEPT2 foram crescidas em meio SD sem triptofano e histidina com adição de 3-AT nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 50 mM. O 3-AT (3-amino-1,2,4-trizol) é um inibidor competitivo da proteína HIS3 que converte fosfato glicerol imidazol em fosfato acetol imidazol, um intermediário na rota de síntese de histidina. Desta forma, o 3-AT age reduzindo o *background* da expressão basal de *HIS3*. A menor concentração de 3-AT na qual as colônias permaneceram menores que 1 mm, após uma semana, foi escolhida para o procedimento de *screening* das bibliotecas, no caso 5 mM.

3.3.2 *Screening* das bibliotecas e teste da β -galactosidase

A transformação em larga escala de L40 contendo pBTM_SEPT2 com as bibliotecas de cDNA de leucócitos e cérebro fetal humano foi realizada pelo método de transformação mediada por acetato de lítio. A transformação para *screening* de 500.000 clones por biblioteca, que corresponde à metade dos clones de cada biblioteca. A seleção das colônias foi feita em meio de cultura sem triptofano, leucina e histidina, contendo 5 mM de 3-AT. O

crescimento das colônias foi monitorado durante seis dias. Somente colônias com tamanho aproximado de 2 mm foram selecionadas e transferidas para o mesmo meio seletivo.

A eficiência da transformação foi de 77% e 70% para as bibliotecas de Leucócito e CFH, respectivamente. Após seis dias haviam crescido 45 colônias provenientes do *screening* da biblioteca de leucócitos e 21 de CFH. A transferência para o meio sem histidina e com 3-AT ainda permitiu eliminar 1 colônia da biblioteca de CFH, que não cresceu no meio. A próxima etapa foi analisar a expressão do gene repórter *lacZ* com o teste da β -galactosidase em papel de filtro (Figura 3.3).

Este teste tem como finalidade eliminar interações positivas falsas, após o teste de crescimento em meio sem histidina. O teste da β -galactosidase foi positivo para 34 das 45 colônias dos clones da biblioteca de leucócitos e 19 das 20 colônias da biblioteca de CFH. Esta etapa é muito importante quando o *screening* da biblioteca gera centenas de clones, ajudando a reduzir o número de clones para as etapas seguintes.

Figura 3.3 - Teste da β -galactosidase. Colônias provenientes do *screening* da (A) Biblioteca de Leucócitos; (B) Biblioteca de Cérebro fetal humano. As setas azuis indicam os controles positivos para o teste e as setas vermelhas indicam os controles negativos. As colônias azuis correspondem à expressão do gene da β -galactosidade, indicando a interação entre proteínas.

3.3.2.1 Extração plasmidial e análise dos clones

A próxima etapa foi à obtenção do DNA plasmidial dos clones da biblioteca para Sequenciamento. Os clones de levedura positivos para o teste da β -galactosidase carregavam os plasmídeos pBTM_SEPT2 e pACT2_presa, que conferem auxotrofia a triptofano e leucina, respectivamente. Com o propósito de isolar o pACT2_presa, promovemos a perda do pBTM_SEPT2 pela levedura por ausência de pressão seletiva, ou seja, adicionando ao meio de cultura triptofano. Porém, a quantidade de DNA do plasmídeo extraído de leveduras é muito pequena para realizar o Sequenciamento, sendo necessário propagá-los em bactéria e em seguida extraí-los em quantidade suficiente para seqüenciá-los.

Depois de obtidas as sequências, foram identificadas quais eram as proteínas “pescadas” com SEPT2 no duplo híbrido em leveduras. Todas as sequências foram comparadas com o banco de dados de seqüência *GenBank*. Na biblioteca de leucócitos, dos 34 clones seqüenciados, 10 estavam fora da fase aberta de leitura do gene Gal4, enquanto para a biblioteca de CFH, 11 dos 19 clones estavam fora da fase aberta de leitura. Esses clones foram descartados para as etapas seguintes.

3.3.2.2 Co-transformação de L40 com SEPT2 e as presas e teste da β -galactosidase

Após a identificação dos possíveis parceiros para SEPT2, foi realizada a co-transformação de L40 com o plasmídeo isca (SEPT2) e cada uma das presas, para eliminar a possibilidade de ativação dos genes repórteres como consequência de escapes do sistema. Assim sendo, apenas as interações confirmadas após a co-transformação foram alvos para validação das interações *in vitro*.

Neste teste, além da co-transformação de L40 com pBTM_SEPT2 e cada um dos 8 clones da biblioteca de Cérebro Fetal Humano e 24 da biblioteca de Leucócitos, foram realizadas também as co-transformações das presas com o plasmídeo pBTM116, para eliminar a possibilidade da presa por si só ser a responsável pela ativação da transcrição dos genes repórteres.

Após as transformações, realizou-se o teste para crescimento em meio sem histidina contendo 3-AT. Na biblioteca de Leucócito, 11 colônias não cresceram e apenas uma colônia da biblioteca de Cérebro Fetal Humano não cresceu. O próximo passo foi a realização do teste da β -galactosidade (Figura 3.4). Dos clones repetidos, analisados pelo Sequenciamento, somente um representante de cada foi submetido ao teste da β -galactosidade.

Figura 3.4 - Teste da β - galactosidase para validação das interações. Colônias provenientes do *screening* da (A) Biblioteca de Leucócitos; (B) Biblioteca de Cérebro fetal humano. As colônias estão designadas pelos seus respectivos números e o símbolo “C-” representa os respectivos controles negativos para cada colônia. As setas azuis indicam os controles positivos para o teste e as setas vermelhas indicam os controles negativos. Colônias azuis correspondem à interação entre proteínas e consequentemente expressão da β -galactosidade. Colônias contendo o mesmo gene só foram representadas uma vez. Os números correspondem a designação original dos clones identificados.

Após a co-transformação e os testes de ativação dos genes repórteres restaram 4 clones da biblioteca de CFH e 5 da biblioteca de Leucócitos como potenciais candidatos a parceiros protéicos de SEPT2. Na tabela 3.7, estão descritas as informações referentes a todos os clones para a biblioteca de cérebro fetal humano.

Tabela 3.7 - Genes identificados na biblioteca de cérebro fetal humano.

Proteínas identificadas	Número de aminoácidos/ Região de interação	Número de acesso no NCBI	Número de clones encontrados	Características
<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor precursor</i>	260/180-247	NP_037403.1	1	Inibidor de uma serino-protease responsável pela clivagem e maturação de vários precursores de hormônios
<i>Septin 6, isoform CRA_f</i>	491/26-340	EAW89857.1	3	Família das Septinas humanas
<i>MAP3K12-binding inhibitory protein 1 (MAPK upstream kinase-binding inhibitory protein) (MUK-binding inhibitory protein)</i>	344/149-344	Q9NS73.2	1	Inibe a atividade da proteína “MAP3K12”, não permitindo a indução da via JNK/SAPK
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)</i>	188/5-188	AAH51289.3	1	Faz parte de uma via de degradação mediada por Ubiquitina

Na tabela 3.8, estão descritas as informações referentes a todos os clones para a biblioteca de leucócitos.

Tabela 3.8 - Genes identificados na biblioteca de leucócitos.

Proteínas identificadas	Número de aminoácidos/ Região de interação	Número de acesso no NCBI	Número de clones encontrados	Características
<i>DCTN2 - Dynactin 2 (p50), isoform CRA_b</i>	314/158-314	EAW97028	1	Liga-se aos microtúbulos e a Dineína citoplasmática. Está envolvida em vários processos celulares, como transporte Retículo endoplasmático - Golgi e formação das fibras do fuso
<i>ANKZF1</i>	728/688-728	EAW70708	1	Contém dois domínios ANK
<i>Unnamed protein product</i>	821/158-368	BAF83276.1	1	Predição de possuir um domínio “coiled-coil”
<i>Septin 6 isoform CRA_f</i>	457/67-278	EAW89857.1	4	Família das Septinas humanas
<i>Septin 4, isoform CRA_j</i>	493/135-451	EAW94449.1	1	Família das Septinas humanas
<i>Septin 6, isoform CRA_c</i>	267/46-267	EAW89853.1	1	Família das Septinas humanas

Analisando as proteínas que podem ter alguma função em conjunto com a SEPT2, foram identificadas proteínas nunca antes descritas e também parceiros protéicos já conhecidos.

SEPT6 foi a proteína identificada com maior frequência nos experimentos, três vezes na biblioteca de cérebro fetal humano e quatro vezes na de leucócitos. Tal resultado é coerente com a literatura, já que SEPT6 interage com SEPT2 no heterofilamento formado pelas septinas 2, 6 e 7 ⁴⁶ e pode, portanto, ser considerada um controle positivo do experimento.

Já a interação com SEPT4, identificada na biblioteca de leucócitos, não era esperada, já que SEPT4 pertence ao mesmo grupo de SEPT2 (Figura 1.2 B) e, segundo as regras de Kinoshita, essas proteínas não deveriam aparecer no mesmo heterofilamento⁵⁵.

Entretanto, SEPT4 foi identificada juntamente com SEPT2 em emaranhados de neurofibrilas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer⁵⁹. A partir desse resultado pode-se descrever alguns cenários: primeiro, SEPT2 e SEPT4 podem interagir em algum processo celular independentemente de estarem presentes no mesmo heterofilamento, isto é, podem interagir estando em heterofilamentos diferentes, ou mesmo em suas formas monoméricas; segundo, as regras de Kinoshita podem não totalmente válidas, existindo a possibilidade de septinas pertencentes ao mesmo grupo fazerem parte do mesmo heterofilamento; e por último, essa pode ser uma interação que de fato não ocorre, sendo um falso positivo.

Em relação às proteínas não septinas identificadas, a proteína UBC9 está envolvida nos processos de sumoilação de proteínas (um tipo de modificação pós-traducional), importante na via de degradação protéica e localização celular¹⁵¹. O processo de sumoilação já foi descrito para septinas de leveduras, agindo na dinâmica de formação do anel de septinas durante a divisão celular¹⁵². A identificação de UBC9 como parceira protéica de SEPT2 indica que o processo de sumoilação pode estar envolvido na regulação de algumas funções de septinas em humanos, uma vez que esse processo também foi identificado em leveduras.

A proteína ANKZF1 contém dois domínios ANK, conhecido por ser um dos domínios mais comuns para a interação entre proteína¹⁵³, porém informações a respeito dessa proteína são inexistentes na literatura.

O gene codificante para a proteína *Unnamed protein product* foi identificado por um projeto de Sequenciamento de cDNA humano e não possui referências na literatura.

As demais proteínas serão discutidas no próximo subitem.

3.3.3 Produção heteróloga das proteínas identificadas que interagem com SEPT2

Após todos os testes feitos para a confirmação das interações, ainda foi necessário o teste de interação *in vitro* (imunoprecipitação ou *pull down*, por exemplo), a partir do qual é possível afirmar que a interação entre duas proteínas em questão de fato ocorre. Esses

experimentos evitam a identificação de falsas interações, que poderiam ocorrer devido a mediação de outras proteínas da própria levedura ¹⁴⁸.

Inicialmente foram escolhidas três proteínas, para a clonagem e posterior teste de interação com a SEPT2 e seus domínios separadamente. As proteínas escolhidas foram: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor*; *MAP3K12-binding inhibitory protein 1* e *Dynactin 2 (p50)*.

Muitos hormônios neuroendócrinos são sintetizados como precursores maiores, que necessitam ser clivados para exercerem suas funções. Esses precursores podem ser clivados pelos pró-hormônios convertase 1 e 2 (PC1 e PC2) ¹⁵⁴, gerando intermediários contendo resíduos básicos no C-terminal, que posteriormente são removidos pela enzima Carboxipeptidase E (CPE), para se tornarem ativos ¹⁵⁵. O mRNA correspondente a *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor* foi identificada em cérebro e pâncreas de humanos, assim como em linhagens celulares neuroendócrinas de mamíferos, mas nunca em linhagens não-neuroendócrinas, como fibroblastos ¹⁵⁶. A proteína proSAAS, que é um precursor de 5 neuropeptídeos após sofrer processamento proteolítico, é um inibidor endógeno do pró-hormônio convertase 1. A super-expressão de proSAAS em linhagens celulares de hipófise de rato bloqueia o processamento do pró-hormônio Pró-opiomelanocortina, provavelmente devido a inibição de PC1, podendo gerar obesidade, insuficiência adrenal e pigmentação vermelha nos olhos ¹⁵⁶.

Além disso, a proteína proSAAS, associada com a proteína TAU, foi identificada em depósitos intracelulares de neurônios de cérebros de pacientes com a doença de Pick, uma doença neurodegenerativa ¹⁵⁷. SEPT2 também foi encontrada associada com a mesma proteína TAU em pacientes com doença de Alzheimer ⁵⁹. Esse pode ser um indício da interação entre SEPT2 e proSAAS *in vivo*, já que ambas parecem estar relacionadas em doenças neurodegenerativas, associadas a proteína TAU.

Já a *MAP3K12-binding inhibitory protein 1* está envolvida com as proteínas quinases. Estas são enzimas que catalisam a fosforilação de outras proteínas, em resíduos de treonina, serina e tirosina. As MAPKs fazem parte de um grupo de proteínas quinases ativadas por mitógenos que, após uma cascata de sinalização extracelular (são ativadas por outras quinases), são responsáveis pela proliferação celular, fosforilando proteínas envolvidas no processo de transcrição ¹⁵⁸. *MAP3K12-binding inhibitory protein 1*, também conhecida como MBIP, foi identificada como parceira de interação da proteína MUK/DLK/ZPK inibindo-a e, consequentemente, impedindo a fosforilação da proteína JNK/SAPK, a qual é caracterizada como uma quinase induzida pelo estresse celular, ¹⁵⁹ envolvida no processo de apoptose

celular, reorganização dos filamentos de actina, entre outras funções^{158; 159; 160}. A proteína MBIP pode modificar o estado de fosforilação de MUK/DLK/ZPK, atuando como um regulador negativo específico¹⁵⁹. Entretanto, os mecanismos de regulação da atividade de MUK/DLK/ZPK não são compreendidos, o que abre uma grande possibilidade a ser explorada, já que foi identificada a interação de SEPT2 com MBIP.

Com relação a última proteína escolhida, Dinactina 2 (do inglês *Dynactin 2*), trata-se de um complexo protéico multisubunitário contendo 11 polipeptídeos diferentes, tendo papel importante na mitose em eucariotos, auxiliando na dinâmica dos microtúbulos, entre outras funções¹⁶¹. Dinactina 2 p50, também chamada de Dinamitina (do inglês *Dynamitin*) ou DCTN2, faz parte do complexo da Dinactina (para cada molécula de Dinactina há 4 moléculas de Dinamitina). A Dinamitina interage com outras proteínas do complexo por meio de sua *coiled-coil*, e sua ausência causa a desorganização do complexo de Dinactina¹⁶². Pelo fato de SEPT2 também ser uma proteína envolvida com o processo de divisão celular, seria interessante um estudo sobre a interação dessas duas proteínas.

3.3.3.1 Amplificação do cDNA e clonagem dos genes que codificam as proteínas MBIP e DCTN2

A reação de amplificação dos genes que codificam a MBIP e DCTN2 (Figura 3.5) foi realizada de acordo com as condições descritas em materiais e métodos. A enzima *Taq Platinum High Fidelity* foi usada para reduzir o risco de mutações.

Figura 3.5 - Amplificação do cDNA de MBIP e DCTN2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (1) MBIP; (2) DCTN2.

Como esperado, os produtos resultantes da amplificação possuíam bandas compatíveis com 1000 pb aproximadamente, tanto para a MBIP quanto para a DCTN2.

Os produtos amplificados foram então clonados com sucesso no vetor de propagação pGEMT-Easy, seqüenciados e, em seguida, foram subclonados no vetor de pGEX 5.1, no caso da MBIP, o que possibilitou a produção da proteína fusionada com a GST no N-terminal. Já a DCTN2 foi subclonada no vetor de expressão pET-28a, permitindo a produção da proteína fusionada com cauda de histidina no N-terminal. O fato de MBIP ser produzida fusionada a GST representa uma estratégia para os ensaios de *pull down*, já que MBIP e SEPT2 possuem diferentes *tags*, possibilitando a co-purificação de ambas tanto em resina de afinidade a Níquel quanto na resina de Glutathione sepharose. Já no caso de DCTN2 a cauda de histidina deverá ser retirada para os ensaios de *pull down*.

Uma análise de restrição foi feita para a confirmação da clonagem, comprovando a subclonagem dos fragmentos gênicos (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Análise de restrição dos vetores de expressão. Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (1) MBIP; (2) DCTN2.

O gene que codifica a proteína *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor*, também conhecida como proSAAS, não foi amplificado, como era previsto. Dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados, um para a amplificação do gene inteiro e outro para a amplificação da região que codifica a proteína madura somente (*in silico*, o produto desse gene possui um peptídeo sinal predito, direcionador para retículo endoplasmático, no N-terminal). Várias tentativas de amplificação foram feitas, mas talvez exista uma baixa

representatividade do cDNA desse gene na biblioteca e, por esse motivo, a amplificação não ocorreu. Uma alternativa para conseguir o gene seria buscá-lo em outra biblioteca, porém, optou-se por prosseguir com os dois outros genes já clonados.

3.3.3.2 Sequenciamento

Após a confirmação dos clones positivos (MBIP e DCTN2) pelo Sequenciamento dos plasmídeos, a sequência primária das proteínas de interesse foi deduzida (Quadro 3.1 e 3.2).

```

1 MAAATEHNRPSGDRNLERRCSPNLSREVL YEIFRSLHTLVGQLDLRDDVVKITI
56 DWNKLQSLSAFQPALLFSALEQHILYLQPFLAKLQSPIKEENTTAVEEIGRTEM
110 GNKNEVNDKFSIGDLQEEKHKESDLRDVKKTIHFDPPEVVQIKAGKAEIDRR
163 ISAFIERKQAEINENNVREFCNVIDCNQENSCARTDAIFTPYPGFKSHVKVSRVV
218 NTYGPQTRPEGIPGSGHKPNSMLRDCGNQAVEERLQNEAHLRLQTGGPVPR
271 DIYQRIKKLEDKILELEGISPEYFQSVSFSGKRRKVQPPQQNYSLAELDEKISA
324 LKQALLRKSREAESMATHHLP

```

Quadro 3.1 – Sequência primária da proteína MBIP. MBIP possui 344 aminoácidos, peso molecular de 39236,3 Da, um pI teórico igual a 6,58 e coeficiente de extinção em 280 nm de $16180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

```

1 MLGEGLGVKETPQQKYQRLLEHVQELTTEVEKIKTTVKESATEEKLTPVLLAK
53 QLAALKQQLVASHLEKLLGPDAAINLTDPDGALAKRLLLQLEATKNSKGGSGG
107 KTTGTPPDSSLVTYELHSRPEQDKFSQAAKVAELEKRLTELETAVRCDQDAQN
160 PLSAGLQGACLMETVELLQAKVSALDLAVLDQVEARLQSVLGKVNEIAKHKA
212 SVEDADTQSKVHQLYETIQRWSPASTLPELVQRLVTIKQLHEQAMQFGQLL
264 THLDTTQQMANS�KDNTLLTQVQTTMRENLATVEGNFASIDERMKKLGK

```

Quadro 3.2 – Sequência primária da proteína DCTN2. DCTN2 possui 314 aminoácidos, peso molecular de 34486,4 Da, um pI teórico igual a 5,75 e coeficiente de extinção em 280 nm de $10095 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Todos os parâmetros foram obtidos através do *software Prot Parameters* (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).

3.3.3.3 Expressão e Purificação dos produtos recombinantes solúveis

A síntese das proteínas recombinantes MBIP e DCTN2 foi feita em *E. coli* Rosetta(DE3), a qual possui o gene que codifica a T7 RNA polimerase, sob o controle do promotor *lac*. Essa linhagem permite uma entrada uniforme do indutor e, ainda, expressa os tRNAs que reconhecem códons raros para *E. coli*.

Na análise por SDS-PAGE 15% foi verificada a expressão a partir das construções plasmidiais, assim como a solubilidade das proteínas resultantes. Tanto para MBIP quanto para DCTN2, a maior fração das proteínas se mostrou na fração insolúvel, embora uma pequena parte estivesse solúvel (Figura 3.7 A e B).

A proteína MBIP, fusionada a GST, não se ligou na resina de Glutathione Sepharose, já que a maior parte da fração solúvel da proteína foi removida na lavagem (Figura 3.7, colunas 5 e 6, aproximadamente 66 kDa). Diante desse problema, a purificação da proteína em questão foi dificultada, sendo necessário um procedimento alternativo para purificá-la.

Já para DCTN2, em virtude de não estar com o grau de pureza desejável para os estudos subsequentes de interação *in vitro*, após a purificação por afinidade, outra cromatografia foi necessária (Figura 3.7 B, aproximadamente 45 kDa, e C). Assim, foi utilizada uma cromatografia de exclusão molecular para aumentar a pureza da amostra.

Continuação

Figura 3.7 - Purificação por cromatografia de exclusão molecular. (A) SDS-PAGE 15% mostrando: (M) Marcador de massa molecular; Proteínas totais de *E coli*BL21(DE3)_MBIP: (1) Antes da indução; (2) Após a indução; (3) Fração insolúvel após a lise celular; (4) Fração solúvel após a lise celular; (5) Eluição do material não retido na resina; (6) Lavagem da coluna; (7) Eluição com 10mM de Glutathione reduzida; **(B)** SDS-PAGE 15% mostrando: (M) Marcador de massa molecular; Proteínas totais de *E coli*BL21(DE3)_DCTN2: (1) Antes da indução; (2) Após a indução; (3) Fração insolúvel após a lise celular; (4) Fração solúvel após a lise celular; (5) Eluição do material não retido na resina; (6) Lavagem da coluna; (7) Lavagem da coluna com 10 mM de Imidazol; (8) Eluição com 300mM de Imidazol; (9) Após Cromatografia de Exclusão Molecular; **(C)** Perfil de eluição de DCTN2.

A pureza da proteína eluída da Superdex 200 pode ser visualizada na Figura 3.7 B (coluna 9) e o resultado da cromatografia de exclusão molecular impede dizer algo a respeito da natureza oligomérica de DCTN2 (o perfil de eluição apresentou um pico muito

“largo” quando comparada a proteínas padrão). O primeiro e último picos que aparecem no cromatograma são referentes aos agregados e ao imidazol, respectivamente.

Apesar de DCTN2 ter sido produzida de forma solúvel, seu rendimento foi muito baixo. Além disso, estavam presentes alguns contaminantes, mesmo após a cromatografia de exclusão molecular. Portanto, novas abordagens para purificação precisam ser elaboradas a fim de melhorar o rendimento e a pureza das proteínas, permitindo a confirmação e caracterização das interações de SEPT2 com a DCTN2.

3.4 Conclusões e Considerações finais

O grupo de trabalho de septinas, dentro do CBME – Centro de Biologia Molecular e Estrutural - iniciou um esforço coletivo na busca de parceiros protéicos e interações das diversas septinas humanas, em um projeto chamado “Septinoma”, utilizando a técnica de Duplo Híbrido em Levedura. Como resultado dessa etapa do trabalho, foi publicado o trabalho intitulado “*A draft of the human septin interactome*”⁵², coordenado pelo Dr. Jorg Kobarg (LNBio).

Buscando “parceiros” de interação para SEPT2, a técnica de Duplo Híbrido em Levedura possibilitou a descoberta de proteínas que podem ter alguma função em conjunto com a SEPT2. Além de identificar proteínas nunca antes descritas interagindo com SEPT2 parceiros protéicos já conhecidos também foram encontrados. O fato de SEPT6 ter sido a proteína mais encontrada nesse experimento é um resultado coerente, já que essa interação é muito bem descrita na literatura, e pode ser considerada um controle positivo do experimento. Assim, este dado reforça a idéia de que as outras proteínas também possam realmente interagir e, conseqüentemente, desempenhar alguma função com a SEPT2^{8; 39; 40; 43; 44; 46}.

Dentre as proteínas “pescadas”, MBIP e DCTN2 tiveram seus genes isolados, amplificados e clonados. A expressão heteróloga foi alcançada com sucesso, mas em ambos os casos, grande parte da proteína produzida ficou contida na fração insolúvel. Ainda, MBIP foi purificada por afinidade, na coluna de Glutathione Sepharose, mas não se ligou na resina, o que impossibilitou sua purificação. DCTN2 pode ser purificada por afinidade em resina de Ni-NTA e cromatografia de exclusão molecular, mas com um grau de pureza ainda não adequado, além do rendimento ter sido muito baixo.

Para ambas as proteínas, novas tentativas de expressão e purificação serão necessárias.

Com a obtenção das proteínas com um grau de pureza aceitável, estudos *in vitro* poderão ser realizados, para confirmar a interação entre SEPT2 e as proteínas identificadas. Posteriormente, estudos *in vivo* permitirão um melhor entendimento da importância dessas interações nas células.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 SPILIOTIS, E. T.; KINOSHITA, M.; NELSON, W. J. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.
- 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. 265-76, 1971.
- 3 LONGTINE, M. S. et al. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 8, n. 1, p. 106-119, 1996.
- 4 COOPER, J. A.; KIEHART, D. P. Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments. *Journal of Cell Biology*, v. 134, n. 6, p. 1345-1348, 1996.
- 5 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends in Cell Biology*, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.
- 6 KINOSHITA, M. The septins. *Genome Biology*, v. 4, n. 11, p. 236, 2003.
- 7 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.
- 8 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell*, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 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 CAO, L. et al. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Molecular Life Science*, v. 66, n. 20, p. 3309-23, 2009.
- 11 MOMANY, M.; PAN, F. F.; MALMBERG, R. L. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *Biomedcentral Evolutionary Biology*, v. 7, 2007.

- 12 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. 681-7, 2011.
- 13 DREES, B. L. et al. A protein interaction map for cell polarity development. *Journal of Cell Biology*, v. 154, n. 3, p. 549-571, 2001.
- 14 IRAZOQUI, J. E.; LEW, D. J. Polarity establishment in yeast. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 11, p. 2169-2171, 2004.
- 15 DEMARINI, D. J. et al. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Cell Biology*, v. 139, n. 1, p. 75-93, 1997.
- 16 SURKA, M. C.; TSANG, 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 HSU, S. C. et al. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*, v. 20, n. 6, p. 1111-22, 1998.
- 20 BEITES, C. L. et al. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 5, p. 434-439, 1999.
- 21 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. 915-921, 2000.
- 22 KREMER, B. E.; ADANG, L. A.; MACARA, I. G. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell*, v. 130, n. 5, p. 837-850, 2007.

- 23 IHARA, M. et al. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Developmental Cell*, v. 8, n. 3, p. 343-352, 2005.
- 24 STEELS, J. D. et al. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 64, n. 10, p. 794-807, 2007.
- 25 KISSEL, H. et al. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Developmental Cell*, v. 8, n. 3, p. 353-364, 2005.
- 26 PETTY, E. M.; PETERSON, E. A. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n. 6, p. 511-524, 2010.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 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.
- 30 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.
- 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 THORNER, J. et al. Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 10, p. 4568-4583, 2004.
- 33 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111-3, 2002.
- 34 FUCHTBAUER, A. et al. Septin9 is involved in septin filament formation and cellular stability. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 769-77, 2011.

- 35 MARTINEZ, 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.
- 36 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, v. 9, n. 24, p. 1458-67, 1999.
- 37 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. Do septins have a role in cancer? *British Journal of Cancer*, v. 93, n. 5, p. 499-503, 2005.
- 38 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.
- 39 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.
- 40 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.
- 41 JOHN, C. M. et al. The Caenorhabditis elegans septin complex is nonpolar. *Embo Journal*, v. 26, n. 14, p. 3296-3307, 2007.
- 42 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.
- 43 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2006.
- 44 SHEFFIELD, P. J. et al. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.
- 45 JOBERTY, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nature Cell Biology*, v. 3, n. 10, p. 861-6, 2001.
- 46 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, n. 7160, p. 311-315, 2007.

- 47 MARTINEZ, C. et al. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochemical Journal*, v. 382, p. 783-791, 2004.
- 48 NAGATA, K. et al. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 53, p. 55895-55904, 2004.
- 49 MACCHI, P. et al. The GTP-binding protein septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.
- 50 KENGAKU, M. 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.
- 51 TRINICK, J.; LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008.
- 52 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. *Plos One*, v. 5, n. 11, p. e0013799, 2010.
- 53 SANDROCK, K. et al. Characterization of human septin interactions. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 751-61, 2011.
- 54 SELLIN, M. E. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Molecular Biology Cell*, 2011.
- 55 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491-6, 2003.
- 56 MENDOZA, M.; HYMAN, A. A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Current Biology*, v. 12, n. 21, p. 1858-1863, 2002.
- 57 HUANG, Y. W. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *Febs Journal*, v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.
- 58 GARCIA, W. et al. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro. *Biochemistry*, v. 46, n. 39, p. 11101-11109, 2007.

- 59 KINOSHITA, A. et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, v. 153, n. 5, p. 1551-60, 1998.
- 60 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111-4113, 2002.
- 61 KINOSHITA, M. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development*, v. 11, n. 12, p. 1535-1547, 1997.
- 62 YU, L. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *Febs Letters*, v. 581, n. 28, p. 5526-5532, 2007.
- 63 WITTINGHOFER, A. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.
- 64 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 791-7, 2011.
- 65 KINOSHITA, N. et al. Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes to Cells*, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2004.
- 66 CERVEIRA, N. et al. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2 ; 11)(q37 ; q23). *Oncogene*, v. 25, n. 45, p. 6147-6152, 2006.
- 67 MARGUTTI, P. et al. Screening of an endothelial cDNA library identifies the C-terminal region of Nedd5 as a novel autoantigen in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 4, p. R896-R903, 2005.
- 68 SAKAI, K. et al. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 57, n. 3, p. 169-177, 2002.
- 69 CRAVEN, R. A. et al. Proteomic identification of a role for the von Hippel Lindau tumour suppressor in changes in the expression of mitochondrial proteins and septin 2 in renal cell carcinoma. *Proteomics*, v. 6, n. 13, p. 3880-3893, 2006.

- 70 ZEROVNIK, E. et al. Protein aggregation as a possible cause for pathology in a subset of familial Unverricht-Lundborg disease. *Medical Hypotheses*, v. 64, n. 5, p. 955-959, 2005.
- 71 MERLINI, G. et al. Protein aggregation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 39, n. 11, p. 1065-1075, 2001.
- 72 ROUSSEAU, F.; SCHYMKOWITZ, J.; SERRANO, L. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Current Opinion in Structural Biology*, v. 16, n. 1, p. 118-26, 2006.
- 73 ADDADI, L. et al. Chirality of amyloid suprastructures. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 14, p. 4602-+, 2008.
- 74 SIPE, J. D.; COHEN, A. S. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*, v. 130, n. 2-3, p. 88-98, 2000.
- 75 EANES, E. D.; GLENNER, G. G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 16, n. 11, p. 673-7, 1968.
- 76 SHEWMAKER, F.; MCGLINCHEY, R. P.; WICKNER, R. B. Structural Insights into functional and pathological amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 19, p. 16533-16540, 2011.
- 77 SERPELL, L. C. et al. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology*, v. 300, n. 5, p. 1033-1039, 2000.
- 78 SUNDE, M.; BLAKE, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in Protein Chemistry, Vol 50*, v. 50, p. 123-159, 1997.
- 79 TYCKO, R. et al. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science*, v. 307, n. 5707, p. 262-265, 2005.
- 80 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, v. 75, p. 333-366, 2006.
- 81 ROMERO, D. et al. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 107, n. 5, p. 2230-4, 2010.

- 82 BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 131-147, 2006.
- 83 NIELSEN, P. H. et al. Functional amyloid in pseudomonas. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 4, p. 1009-1020, 2010.
- 84 MARKS, M. S. et al. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, v. 161, n. 3, p. 521-533, 2003.
- 85 DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature*, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 2003.
- 86 DOBSON, C. M. Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*, v. 34, n. 1, p. 4-14, 2004.
- 87 STEFANI, M.; DOBSON, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*, v. 81, n. 11, p. 678-99, 2003.
- 88 DOBSON, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 15, n. 1, p. 3-16, 2004.
- 89 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 1, p. 15-22, 2009.
- 90 BROOKMEYER, R. et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, v. 3, n. 3, p. 186-91, 2007.
- 91 FINDER, V. H. Alzheimer's Disease: a general introduction and pathomechanism. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 22, p. S5-S19, 2010.
- 92 SELKOE, D. J. Folding proteins in fatal ways. *Nature*, v. 426, n. 6968, p. 900-904, 2003.
- 93 WESTERMARK, P. et al. Amyloid: toward terminology clarification - report from the nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders*, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2005.

- 94 DOBSON, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 15, n. 1, p. 3-16, 2004.
- 95 HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 2, p. 101-12, 2007.
- 96 IHARA, M. et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 26, p. 24095-24102, 2003.
- 97 ZHANG, Y. et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 24, p. 13354-13359, 2000.
- 98 MURPHY, R. M. Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, v. 1768, n. 8, p. 1923-1934, 2007.
- 99 SELKOE, D. J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 1054-61, 2004.
- 100 GORBENKO, G. P.; KINNUNEN, P. K. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 141, n. 1-2, p. 72-82, 2006.
- 101 YIP, C. M.; MCLAURIN, J. Amyloid-beta peptide assembly: a critical step in fibrillogenesis and membrane disruption. *Biophysical Journal*, v. 80, n. 3, p. 1359-71, 2001.
- 102 SUOPANKI, J. et al. Interaction of huntingtin fragments with brain membranes - clues to early dysfunction in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 96, n. 3, p. 870-884, 2006.
- 103 COX, D. L.; SING, R. R. P.; YANG, S. C. Prion disease: exponential growth requires membrane binding. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 11, p. L77-L79, 2006.
- 104 ZHU, M.; FINK, A. L. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 19, p. 16873-16877, 2003.

- 105 OTZEN, D. E. et al. The changing face of glucagon fibrillation: Structural polymorphism and conformational imprinting. *Journal of Molecular Biology*, v. 355, n. 3, p. 501-523, 2006.
- 106 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006
- 107 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- 108 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.
- 109 ADLER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymology*, v. 27, p. 675-735, 1973.
- 110 LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006
- 111 HILLEBRAND, S. et al. In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 383, n. 1, p. 92-97, 2005.
- 112 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. 7655-61, 1990.
- 113 FERNANDEZ-ESCAMILLA, A. M. et al. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 10, p. 1302-6, 2004.
- 114 GIRALDO, R. Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 44, p. 17388-17393, 2007.
- 115 MAURER-STROH, S. et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nature Methods*, v. 7, n. 3, p. 237-U109, 2010.

- 116 TARTAGLIA, G. G.; VENDRUSCOLO, M. The Zygggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chemical Society Reviews*, v. 37, n. 7, p. 1395-1401, 2008.
- 117 VRABIOIU, A. M. et al. The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 4, p. 3111-3118, 2004.
- 118 LEVINE, H., 3RD. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, v. 2, n. 3, p. 404-10, 1993.
- 119 KREBS, M. R. H.; BROMLEY, E. H. C.; DONALD, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of Structural Biology*, v. 149, n. 1, p. 30-37, 2005.
- 120 GLOMM, W. R. et al. Same system-different results: the importance of protein-introduction protocols in Langmuir-monolayer studies of lipid-protein interactions. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 3042-50, 2009.
- 121 NOGALES, E. 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.
- 122 XIE, H. et al. Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 43, n. 1, p. 52-62, 1999.
- 123 TAKIGUCHI, K.; TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Current Biology*, v. 19, n. 2, p. 140-145, 2009.
- 124 CAETANO, W. et al. Cooperativity of phospholipid reorganization upon interaction of dipyrindamole with surface monolayers on water. *Biophysical Chemistry*, v. 91, n. 1, p. 21-35, 2001.
- 125 VERNOUNX, N. et al. Mitochondrial creatine kinase adsorption to biomimetic membranes: A Langmuir monolayer study. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 310, n. 2, p. 436-445, 2007.

- 126 DE SOUZA, N. C. et al. Interaction of small amounts of bovine serum albumin with phospholipid monolayers investigated by surface pressure and atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 297, n. 2, p. 546-553, 2006.
- 127 WANG, X. L. et al. Structural changes of phospholipid monolayers caused by coupling of human serum albumin: a GIXD study at the air/water interface. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 37, p. 14171-14177, 2004.
- 128 STUART, B. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2004
- 129 BLAUDEZ, D. et al. Polarization-modulated Ft-Ir spectroscopy of a spread monolayer at the air-water-interface. *Applied Spectroscopy*, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.
- 130 BLAUDEZ, D. et al. Polarization modulation ftir spectroscopy at the air-water-interface. *Thin Solid Films*, v. 242, n. 1-2, p. 146-150, 1994.
- 131 RALSTON, G. *Introduction to analytical ultracentrifugation*. Sydney, Australia: Beckman Instruments, Department of Biochemistry, The University of Sydney, 1993.
- 132 LINDGREN, M.; HAMMARSTROM, P. Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states. *Febs Journal*, v. 277, n. 6, p. 1380-1388, 2010.
- 133 NELSON, R.; EISENBERG, D. Structural models of amyloid-like fibrils. *Fibrous Proteins: amyloids, prions and beta proteins*, v. 73, p. 235-282, 2006.
- 134 PAWAR, A. P. et al. Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Biology*, v. 350, n. 2, p. 379-92, 2005.
- 135 LINDING, R. et al. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 342, n. 1, p. 345-353, 2004.
- 136 KALLBERG, Y. et al. Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 16, p. 12945-12950, 2001.

- 137 BASKAKOV, I. V. Branched chain mechanism of polymerization and ultrastructure of prion protein amyloid fibrils. *Febs Journal*, v. 274, n. 15, p. 3756-3765, 2007.
- 138 PERRETT, S. et al. In vitro analysis of SpUre2p, a prion-related protein, exemplifies the relationship between amyloid and prion. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 11, p. 7912-7920, 2007.
- 139 CHAPMAN, M. R. et al. In vitro polymerization of a functional Escherichia coli amyloid protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 6, p. 3713-3719, 2007.
- 140 YERBURY, J. J. et al. Alpha2-macroglobulin and haptoglobin suppress amyloid formation by interacting with prefibrillar protein species. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 7, p. 4246-54, 2009.
- 141 HAMMER, N. D. et al. Amyloids: friend or foe? *Journal of Alzheimers Disease*, v. 13, n. 4, p. 407-419, 2008.
- 142 XU, S. Cross-beta-sheet structure in amyloid fiber formation. *Journal Physical Chemistry*, v. 113, n. 37, p. 12447-55, 2009.
- 143 ZHANG, R. et al. Interprotofilament interactions between Alzheimer's A beta(1-42) peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 12, p. 4653-4658, 2009.
- 144 ELAM, J. S. et al. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nature Structural Biology*, v. 10, n. 6, p. 461-467, 2003.
- 145 MARSH, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.
- 146 WEINBERG, R. B. et al. Interfacial exclusion pressure determines the ability of apolipoprotein A-IV truncation mutants to activate cholesterol ester transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 24, p. 21549-21553, 2002.
- 147 VAN CRIEKINGE, W.; BEYAERT, R. Yeast two-hybrid: state of the art. *Biological Procedures Online*, v. 2, p. 1-38, 1999.

- 148 CAUSIER, B.; DAVIES, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 6, p. 855-870, 2002.
- 149 FIELDS, S.; SONG, O. K. A Novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature*, v. 340, n. 6230, p. 245-246, 1989.
- 150 ASSMANN, E. M. et al. FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 15, p. 9869-9881, 2006.
- 151 MULLER, S. et al. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 3, p. 202-10, 2001.
- 152 JOHNSON, E. S.; BLOBEL, G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *Journal of Cell Biology*, v. 147, n. 5, p. 981-993, 1999.
- 153 KALIA, A. et al. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. *Trends in Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 132-139, 2010.
- 154 STEINER, D. F. et al. Proteolytic processing in the secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 30, p. 20745-20748, 1999.
- 155 FRICKER, L. D. Carboxypeptidase-E. *Annual Review of Physiology*, v. 50, p. 309-321, 1988.
- 156 FRICKER, L. D. et al. Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 639-648, 2000.
- 157 KIKUCHI, K. et al. An N-terminal fragment of ProSAAS (a granin-like neuroendocrine peptide precursor) is associated with tau inclusions in Pick's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 308, n. 3, p. 646-654, 2003.
- 158 CHEN, Z. et al. MAP kinases. *Chemical Reviews*, v. 101, n. 8, p. 2449-76, 2001.
- 159 FUKUYAMA, K. et al. MAPK upstream kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/dual leucine zipper-bearing kinase/leucine zipper protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 28, p. 21247-21254, 2000.

-
- 160 YANG, D. D. et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 865-870, 1997.
- 161 SCHROER, T. A. Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 20, p. 759-779, 2004.
- 162 MAIER, K. C. et al. Dynamitin mutagenesis reveals protein-protein interactions important for dynactin structure. *Traffic*, v. 9, n. 4, p. 481-491, 2008.

Anexos

ANEXOS

Em anexo a esta tese, seguem os artigos científicos publicados ou em fase de publicação, referentes à pesquisa desenvolvida nesse doutoramento. São eles:

NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. *Plos One*, v. 5, n. 11, p. e0013799, 2010.

DAMALIO, J. C. P. et al. Self Assembly of Human Septin 2 into Amyloid Filaments. *Biochimie. In press.*

MARQUES, I. A. et al. Biophysical characterization of the C-terminal domains of the human septin complex 2/6/7. *Cell Biochemistry and Biophysics. In press.*

Outros dois artigos encontram-se em fase de redação, e deverão ser submetidos em breve. São eles:

DAMALIO, J. C. P. et al. Non specific membrane interaction induces a β -rich structure in Septin 2, which may be related to amyloid formation. *Results to be published.*

MACEDO, J. N. A. et al. Septin 3: Biophysical characterization, nucleotide binding, GTPase activity and structural analysis. *Results to be published.*

A Draft of the Human Septin Interactome

Marcel Nakahira^{1,2,3}, Joci Neuby Alves Macedo^{3,4}, Thiago Vargas Seraphim², Nayara Cavalcante³, Tatiana A. C. B. Souza¹, Julio Cesar Pissuti Damalio³, Luis Fernando Reyes³, Eliana M. Assmann¹, Marcos R. Alborghetti^{1,2}, Richard C. Garratt³, Ana Paula U. Araujo³, Nilson I. T. Zanchin⁴, João A. R. G. Barbosa⁵, Jörg Kobarg^{1,2*}

1 Laboratório Nacional de Biotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brasil, **2** Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **3** Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, **4** Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética e Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **5** Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil

Abstract

Background: Septins belong to the GTPase superclass of proteins and have been functionally implicated in cytokinesis and the maintenance of cellular morphology. They are found in all eukaryotes, except in plants. In mammals, 14 septins have been described that can be divided into four groups. It has been shown that mammalian septins can engage in homo- and heterooligomeric assemblies, in the form of filaments, which have as a basic unit a hetero-trimeric core. In addition, it has been speculated that the septin filaments may serve as scaffolds for the recruitment of additional proteins.

Methodology/Principal Findings: Here, we performed yeast two-hybrid screens with human septins 1–10, which include representatives of all four septin groups. Among the interactors detected, we found predominantly other septins, confirming the tendency of septins to engage in the formation of homo- and heteropolymeric filaments.

Conclusions/Significance: If we take as reference the reported arrangement of the septins 2, 6 and 7 within the heterofilament, (7-6-2-6-7), we note that the majority of the observed interactions respect the “group rule”, i.e. members of the same group (e.g. 6, 8, 10 and 11) can replace each other in the specific position along the heterofilament. Septins of the SEPT6 group preferentially interacted with septins of the SEPT2 group ($p < 0.001$), SEPT3 group ($p < 0.001$) and SEPT7 group ($p < 0.001$). SEPT2 type septins preferentially interacted with septins of the SEPT6 group ($p < 0.001$) aside from being the only septin group which interacted with members of its own group. Finally, septins of the SEPT3 group interacted preferentially with septins of the SEPT7 group ($p < 0.001$). Furthermore, we found non-septin interactors which can be functionally attributed to a variety of different cellular activities, including: ubiquitin/sumoylation cycles, microtubular transport and motor activities, cell division and the cell cycle, cell motility, protein phosphorylation/signaling, endocytosis, and apoptosis.

Citation: Nakahira M, Macedo JNA, Seraphim TV, Cavalcante N, Souza TACB, et al. (2010) A Draft of the Human Septin Interactome. PLoS ONE 5(11): e13799. doi:10.1371/journal.pone.0013799

Editor: Gustavo Goldman, Universidade de São Paulo, Brazil

Received: July 6, 2010; **Accepted:** October 13, 2010; **Published:** November 2, 2010

Copyright: © 2010 Nakahira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and the Laboratório Nacional de Biotecnologia-Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBio-CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jorg.kobarg@lnbio.org.br

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Septins belong to the GTPase superclass of P-loop NTPases. Specifically, they belong to the TRAFAC class which includes the Ras-like superfamily, Myosin-kinesin superfamily, and translation factor superfamily [1]. They are found in all eukaryotes, from yeast to mammals, except in higher plants [2] but the number of septin genes found in different species varies considerably. For example *Saccharomyces cerevisiae*, has seven septin genes (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12, Shs1, Spr28, Spr3), whilst *Caenorhabditis elegans* has only two (Unc59 and Unc61), *Drosophila melanogaster* five (Pnut, Sep1, Sep2, Sep4, Sep5), and *Mus musculus* thirteen (Sept1-Sept9, Sept10a, Sept10b, Sept11, Sept12) [2–4]. In humans, so far 14 septin genes have been reported. However, many of them present several splice variants, which are designated by a

nomenclature in which a variant of SEPT6, for example, would be indicated as SEPT6_v1. SEPT9 is particularly variable in this respect [5].

Mammalian septins have been classified into 4 different groups, based on their amino acid sequences. At present several different nomenclatures exist [2,6–8]. The simplest of these makes use of a reference septin for each group. Thus, the SEPT2 group (also called group 2B [2] or group III [7]) contains SEPT1, SEPT4 and SEPT5 as well as SEPT2. Similarly, the SEPT3 group (alternatively called group 1A or group I) consists of SEPT3, SEPT9 and SEPT12 and, the SEPT6 group (also called group 1B or group II) contains: SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 and SEPT14. The SEPT7 group, which includes in addition to SEPT7 also SEPT13 (group IV), is normally considered to form the fourth independent group. However, the latter two septins have sometimes been

considered to form a sub-group of the SEPT2 group (part of group 2B) with which they are closely related phylogenetically [2–4].

Septins have molecular masses that vary between 30 and 65 kDa and present a high sequence identity in their conserved central GTPase domains, featuring typical Ras like GTPase motifs and P-loop signatures found in most GTPases [2,6,9]. This central GTP-binding domain generally also contains a short polybasic region prior to the P-loop (or Walker A box). This has been shown to bind to phospholipids and may be responsible for mediating interactions with membranes [9]. The central domain is flanked by an amino-terminal domain which is variable in both sequence length and identity and a carboxy-terminal domain which also varies considerably from one septin to another, but frequently contains a coiled-coil region, possibly involved in mediating protein-protein interactions. In the case of mammalian septins, only members of the SEPT3 group lack the coiled-coil signature.

One of the most remarkable features of septins is their ability to engage in the formation of homo- and hetero-meric filaments, which seem to be important for mediating their cellular functions. Aside the expected and demonstrated roles of these filaments in intracellular transport processes and cellular movements, especially in the context of cell division, the septin filaments have been predicted to serve also as scaffolds for the docking of other regulatory or signaling proteins [10].

Several studies have now shown that the typical filamentous form of mammalian septins appears to systematically involve a heterotrimer as its core module [10–12]. The complexes described so far vary, however, in size and composition. Biochemical studies reported to date suggest the existence of several different trimeric complexes including SEPT4-SEPT5-SEPT8 [7], SEPT7-SEPT11-SEPT9b [13], SEPT5-SEPT7-SEPT11 [14] and SEPT3-SEPT5-SEPT7 [15,16]. The most well studied of all is that of human septins 2, 6 and 7 [17] which remains the only septin complex to have been solved crystallographically to date. Its structure, at 4.0 Å was reported together with that of a fragment of human SEPT2 which lacks 46 residues of the predicted coiled-coil region at the C-terminus [18]. These structures showed that the GTPase domain is responsible for polymerization and septin-septin interactions at the so called G and NC interfaces result in the assembly of linear non-polar polymers. More recently, the crystal structure of the GTP bound form of SEPT2 was reported at 2.9 Å resolution, revealing that GTP binding induces a conformational change in the switch regions directly affecting the G interface and indirectly, the NC interface [19]. Moreover, GTP binding/hydrolysis and the nature of the bound nucleotide influence the stability of the interface in the heterooligomeric and polymeric state, as well as filament assembly and disassembly.

Septins have been shown to be functionally involved in a diversity of processes ranging from cytokinesis [12,20], cell membrane dynamics [21,22], signal transduction cascades, cellular signaling events [6,23], cell cycle control and others [1,24]. Moreover, septins have been shown to regulate bacteria-host interactions [25] and to be important determinants for yeast virulence [26–28]. Finally, septin dysfunction has been associated with several human pathologies, including cancer [29], Parkinson's disease [30], Alzheimer's disease [31] and hereditary neuralgic amyotrophy [32].

Despite all the documented progress, the exact molecular mechanisms of the septins, and their cellular and physiological functions are still poorly understood. As a first step in approaching molecular and cellular functions a comprehensive description of the interacting protein partners for the septins would be very valuable. This is especially important if we consider the possible role of the different septin filaments as docking or scaffolding platforms to mediate additional new functions. Although some isolated attempts

to identify septin interactors using the yeast two-hybrid system have been made to date for the individual septins 5, 8, 9 and 14, so far no large scale analysis has been attempted [7,25,33–35].

Therefore we set out to perform yeast-two hybrid screens of the human septins 1–10, representing all 4 septin groups. In summary, we found that all septins, except SEPT10, interacted predominantly with other septins, principally those from other groups. The only exception came from the members of the SEPT2 group, which also interacted with partners from the same group. Most, although not all, of the results were confirmative in a reciprocal sense. For example, SEPT3 when used as a bait molecule identified SEPT6 as a partner and when SEPT6 was used as the bait, SEPT3 was identified. Most interestingly, the results on the whole seemed to conform to the proposed trimeric arrangement in a group format. This means that if we organize the two trimers in the following arrangement: Group 3/7-6-2 - 2-6-3/7, we can assign the great majority of the individually found interactions and all pair wise group interactions in this model are covered by statistical data which demonstrate that the experimental observed distribution of the fished septin clones is not random. If this interpretation of the trimer arrangement and the “group rule” holds true through additional biochemical experiments we can propose a range of new possible septin trimers, whose existence in cells should be tested.

All septins also interacted with other non-septin proteins. Those common to several septins or septin groups can be largely attributed to the ubiquitin and sumoylation cycles, transport and motor activity, cell division/cell cycle, and protein phosphorylation. Novel individual septin or septin family specific functions include: apoptosis (SEPT3 and SEPT6), transcription (SEPT8 and SEPT7) and DNA repair and splicing (SEPT3), among others. Our data shed new light on septin function and provide a wealth of new information to form new hypotheses, especially with respect to septin trimer and filament formation and the association of septins within new cellular contexts. Future biochemical, structural and cellular functional studies are required to test the newly proposed hypotheses.

Results and Discussion

The interactions of septins with other septins

Analysing the overall result of our initiative to characterize septin interacting proteins on a broad scale, one first is impressed by the large number of septin prey proteins that were discovered for all septin baits, with the sole exception of SEPT10. Although the latter did not interact with any other septin when used as bait, it was however selected in reasonable quantity by both SEPT4 (23% of the interacting septins) and to a lesser extent by SEPT7 (2% of the interacting septins). The complete data is given in resumed form in Table 1, Figure 1 and Figure S1. Please refer to Table S1 for complete primary data.

Members of the SEPT6 group, with the exception of SEPT10, had a clear tendency to interact with other septins instead of with other non-septin proteins (Fig. 1). For example, SEPT6 had only 12% non-septin interactors and SEPT8 only 24%. A similar result is observed for SEPT7, for which only 9% of the identified interactors were non-septins. Several other septins, including SEPT2, SEPT4 and SEPT3, showed the opposite tendency and tended to interact with a relatively large number of non-septin partners. SEPT2 interacted with 54%, SEPT4 with 48% and SEPT3 with an impressive 80% of non-septin preys.

Interestingly, several septins showed a marked preference for a particular septin as partner from among those identified. SEPT2 predominantly interacted with SEPT6 (38%), SEPT9/SEPT9(1-269) mostly with SEPT6 (39%) and SEPT6, SEPT8 and SEPT7 all interacted predominantly with SEPT9 (62%, 40% and 61%,

Table 1. Correlation of septin prey clones (columns) fished by a given bait septin (lines).

Prey: Bait:	1	2	4	5	6	8	10	11	3	9	7
1		3	2	1	1	<u>14</u>		3		15	
2			1		<u>5</u>						
4					<u>2</u>	<u>1</u>	3	7			
5		1		1	<u>8</u>	<u>6</u>		3			
6		<u>8</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>12</u>				<u>1</u>	<u>96</u>	<u>9</u>
8		<u>3</u>	<u>6</u>	<u>9</u>	<u>5</u>					49	22
10											
11											
3					<u>6</u>			5			
9					<u>5</u>						<u>3</u>
7	1		3		<u>11</u>		1	1		<u>34</u>	

The numbers are the number of identified clones. Bold and underlined numbers emphasizes those preys that also fished the corresponding prey when they were used as bait (reciprocal fishing). The baits and prey are listed regarding to membership in the four septin groups: 1,2,4,5 (group 2); 6,8,10,11 (group 6); 3,9 (group 3) and 7 ("group 7").

doi:10.1371/journal.pone.0013799.t001

respectively). For the whole table of groups of baits vs. groups of prey septins we obtained with Fischer's exact test a *p* value of 0.0005, diagnosed as significant (Table S1). In other words, the data are far from being randomly distributed. This can also be seen directly from Fig. 2, where islands and clusters can be easily observed in between many blank regions.

Although there was not always a strict reciprocity in the sense that each bait which picked up a given septin prey was also found as a prey when the interacting septin was used as bait, several interesting tendencies can nevertheless be detected. In Table 1 the number of fished septin clones is listed in accordance with their group membership which aids in emphasizing a certain clustering of blocks of interactions which can be readily observed (clone numbers in bold and underlined). Block 1 corresponds to the use of SEPT6 and SEPT8 as bait. Both these septins picked up predominantly septins of the SEPT2 group (Block1a) and members of group 3/9 and 7 (Block1b), but never septins of the same group (SEPT6). Block 2 refers to the SEPT2 group when used as bait, which preferentially picked up septins of the SEPT6 group (Block2a). Most interestingly, for both of these blocks there is also a considerable degree of reciprocity (bold underlined numbers in Table 1), which lends an additional degree of confidence to the results. For example bait SEPT6 fishes prey SEPT3/9/7 and in reverse bait septin 3/9/7 fished prey SEPT 6. A third block also corresponds to the use of the SEPT2 group septins as bait and which had a weak but consistent tendency to pick up preys of the same group: SEPT1 interacted with SEPT1/2/4/5; SEPT2 with SEPT4, and SEPT5 with SEPT2/5. The latter is the only example of self-interactions among members of the same group, detected during this study. These intra-group interactions observed for the SEPT2 members are in stark contrast to what is observed for the SEPT6 group members and are probably pertinent to filament formation as described below.

Comparison of the septin-septin interactions within the format of the septin trimer

The interaction results described in the previous paragraph gain an interesting new perspective when analyzed in the light of the structural data obtained for the septin trimer 7-6-2 [18] and

further taking into consideration Kinoshita's prediction [6] that in the trimer format septins from within a given group may substitutes for one another (Figs. 2 and 3).

Analysis of the results for the SEPT6 group members as baits, given the known arrangement of the trimer, reveals interesting new insights. SEPT6 occupies the central position in the trimer structure and Kinoshita's prediction suggests that other members of the group, namely SEPT8, SEPT10, SEPT11 and SEPT14 should be competent substitutes at this position of the filament. Hence, the SEPT6 group members could be predicted to be sandwiched between SEPT2 and SEPT7 group members. Based on this assumption it would be expected to find them largely interacting with septins from the latter two groups but never with members of their own. The number of clones corresponding to an interaction between SEPT6 group members and SEPT2 group members is statistically significant ($p < 0.001$) as is that between SEPT6 and SEPT3 group members and between SEPT6 and SEPT7 group members. [Fig. 3, (a)] (Please refer to Materials and Methods section for details of the statistical analysis).

The only exception is SEPT10, which seems to behave differently altogether, since, when used as bait, we did not identify any septin partners at all. However, consistent with the above scenario, SEPT10 was identified as a binding partner of both SEPT4 (a SEPT2 group member) and SEPT7 in the reverse experiments. In summary these findings are entirely in accordance with what would be expected from the trimer model and allow us to propose new possible trimer configurations, which can be summarized as 7-8-1/2/4/5 or 7-6-1/4/5. Although we are unaware of any direct experimental evidence reporting these particular trimeric arrangements it is worth mentioning that a complex of SEPT5, SEPT7 and SEPT11 (a very close relative of SEPT6) has been reported recently [14]. The physiological relevance of such potential complexes clearly depends on other factors such as the tissue specific expression of different septins and their splice variants [36].

Notably, of all the 10 septins analyzed, SEPT6 followed by SEPT8 showed both the largest number of interacting clones as well as the greatest number of different identified candidate interactors. Since the majority of clones found to interact represented other septins (88% and 76% for SEPT 6 and 8, respectively), this may reflect the fact that the members of this group always occupy the central position of the filament's trimeric unit. In co-purification studies we were able to demonstrate that GST-SEPT6 co-purified with septins 1, 2, 3, 5, 7 and 9, when both are expressed together in *E. coli*, thereby confirming the majority of the interactions given in Table 1 (Nakahira et al., unpublished observations). It has been recently shown that septins of this group (SEPT 6, 8 and 11) show a lower rate of GTP hydrolysis when compared to SEPT2 (Souza et al., unpublished observation). Most interestingly, septins of this group have the key Ser residue in the G1 motif substituted by a Thr residue, possibly indicating why the septins of this group have a less efficient rate of hydrolysis. This speculation has some support in the finding that in the crystal structure of the 7-6-2 hetero-trimer GDP is observed bound to SEPT2 and SEPT7 but GTP to SEPT6 [18].

A very interesting result was obtained when the SEPT2 group members were used as bait [Fig. 2, Fig. 3(b)]. In this case the majority of preys belong to the SEPT6 group (46, 38, 52 and 65% respectively, for baits SEPT1, SEPT2, SEPT4 and SEPT5). This is consistent with what is expected from the canonical 7-6-2 trimer, where SEPT2 makes direct contact with SEPT6. Again the preference of SEPT2 group members for partners from SEPT6 group is statistically significant ($p < 0.001$, Fig. 3b).

Figure 1. Summary of protein-protein interactions found for human septins 1-10. The values are given as a percentage of clones from the total number of confirmed interacting clones sequenced and identified. See color code for septin specification. Septins are grouped according to the four groups SEPT2, SEPT3, SEPT6 and SEPT7 from left to right.
doi:10.1371/journal.pone.0013799.g001

A small but consistent fraction of the preys belonged to the SEPT2 group were found as partners of septins of the same group (8%, for each of SEPT1, SEPT2 and SEPT5, when used as bait). This makes SEPT2 group members an exception as the only septins which interacted with members of their own group and may reflect the fact that the first stage of polymerization appears to be the formation of hexamers (or dimers of trimers) in which one copy of SEPT2 makes contact with a second via what has been called an NC interface [18] (Fig. 4A). Furthermore, SEPT2 when expressed and purified as a dimer, although curiously this appears to use the G interface rather than NC [19]. Together, this further suggests that SEPT1, 4, and 5 can substitute SEPT2 in the trimer format and reinforces the proposed 7-6-1/4/5 combinations described above. It is interesting to note that none of the SEPT2 group septins picked up SEPT7, as would be also expected, given that there is no direct contact made between them in the trimer. However, during the reverse experiment SEPT7 identified a small number (7%) of SEPT2 group clones. These may correspond to

real hits corresponding to hetero-polymers of different arrangement or may be artifacts. It is known for example that SEPT2 alone is able to form continuous polymers similar to those seen in the 7-6-2 complex, in which it makes use of both G and NC interfaces. The G interface may be promiscuous in that it is not observed in the hetero-polymer and similar promiscuity may be observed with other septins leading to possible artifacts. What is noteworthy, is the fact that the vast majority of observed interactions are consistent with the 7-6-2 filament and with Kinoshita's conjecture [6].

Besides identifying the expected binding partners predicted from the trimeric arrangement, SEPT6 and SEPT8 also interacted with SEPT3 group members, notably SEPT9 (Fig. 3a, $p < 0.001$). Furthermore, in the reverse sense, when SEPT3 and SEPT9 were used as bait, they preferentially fished out preys belonging to the SEPT6 group (39% in the case of SEPT9 for example, Fig. 3c, $p < 0.001$), consistent with previous studies [13,37]. Since the SEPT3 group is not present in the canonical 7-6-2 trimer, this

Figure 2. Three dimensional column diagram of the number of clones of septin prey proteins fished by septin bait proteins in group wise organization. Number of fished clones for each prey septin (Y-axis), was plotted against bait (X-axis) and prey septins (Z-axis), where the septins have been ordered in a group wise fashion (See Table S1 for raw data of clone numbers). The whole distribution is significantly ($p = 0.0004998$) different from a random distribution, as can also be verified visually, since the clone numbers group into "islands" in between various blank areas. When we compared groups in a one-to-one and reciprocal fashion we obtained significant p-values ($p < 0.001$), suggesting a non-random distribution, for the following pairs of groups: group 2 vs. group 6, group 6 vs. group 3/9, group 6 vs. group 7, and group 3/9 vs. group 7. Furthermore, we can still analyze the occurrence of interactions among septins of the same group. The result in this case is obvious: members of groups 6, 3/9 and 7 never interacted with themselves or with other members of the same group. The only exception is group 2, which members tended to interact with other group 2 members. See also Fig. 3.
doi:10.1371/journal.pone.0013799.g002

raises the intriguing question of how they may participate in filament formation. Since SEPT6 occupies the central position, one possibility is that the SEPT3 group members may replace either SEPT2 or SEPT7. If they were to occupy the position normally occupied by SEPT7, this would lead to 3-6-2 and 9-6-2 as possible new trimeric arrangements (Fig. 3c, Fig. 4B). However, this would be incompatible with the coiled coil C-termini which are expected to project laterally, at a 90 degree angle, from the filament (Fig. 4A,B), since it would leave the SEPT6 coiled coil unpaired. On the other hand the coiled-coil pairing may have only a stabilizing function, since we know that the filament formation is primarily based on GTPase domain interactions [18,19]. An alternative would be for the SEPT3 group to substitute SEPT2 at the center of hexameric unit (Fig. 4C). This would lead to combinations of the type 7-6-3 or 7-6-9. Included in the latter group is the combination 7-11-9b which has been experimentally reported [13].

Although we did not observe homotypical interactions of the type: septins 7×7 , 3×3 or 9×9 in our yeast two hybrid screens the above mentioned models (Fig. 4) synthesize our data with those

already described in the literature (e.g. 7×7 , 9×9). An intriguing possibility is that we never observed these homotypical septin interactions in our yeast two hybrid assay, because the latter is limited to one-to-one interactions among individual septins. It may be possible that 7×7 and 9×9 predominantly interact in the context of trimer-trimer or hexamer-hexamer interactions at the final stage of filament formation. This may be due to conformational changes which could occur at the septins 3, 7 and 9 when the hexamer units are formed. Septin 7 in a hexamer context would therefore gain then the capacity to interact with itself. Either way, these potential new filaments need to be verified *in vivo* and evaluated by further biochemical studies *in vitro*.

SEPT9 and SEPT7 identified one another as mutual partners at very high percentages. 23% of the prey clones identified by SEPT9 corresponded to SEPT7, whilst in the reverse direction the rate was even higher (61% of septin clones, Fig. 1). Again this distribution is significantly different from a random distribution (Fig. 3c,d), and the preferential interaction was reciprocal: septin bait 7 fished septin 9 ($p < 0.001$) and septin bait 9 fished septin 7 prey ($p < 0.001$). These results strongly suggest a physiological significance and possibly

Figure 3. Representation of the two-hybrid septin-septin results in the light of the format of the trimer/hexamer SEPT7/SEPT6/SEPT2 – SEPT2/SEPT6/SEPT7 [18]. Assuming that members of the same group may serve as substitutes [6] and taking into account the structural arrangement found for the crystal of the trimer/hexamer SEPT 7/6/2, interesting observations can be made. The bait septins employed in the two-hybrid system are given on the left. In green in the schematic figure the preferentially found prey septins are indicated and assigned to likely positions in the hexamer scheme. The three dimensional column diagrams on the right refer to Fig. 2. The data that differ significantly from a random distribution have been circled to indicate the experimental basis on which each structural arrangement (monomer interfaces) is based. From top to bottom: (a) is based on the following statistical comparison: group 6 vs. group 2 (no random distribution: $p < 0.001$), group 6 vs. group 3/9 ($p < 0.001$), group 6 vs. 7 ($p < 0.001$). (b): group 2 vs. group 6 ($p < 0.001$). (c): group 3/9 vs. group 6 ($p < 0.001$), group 7 vs. group 9/3 ($p < 0.001$), (d): group 7 vs. group 6 ($p < 0.001$), group 7 vs. group 9/3 ($p < 0.001$). None of the septins fished members of its own family, except group two members (b). The group pairings with statistically significant distributions were indicated at the right side of the figure (e.g. 6×7 , $3/9 \times 6$ etc.). By comparison of the letters color codes it can be seen that all of these group pairs were reciprocal. For example bait septin 6 group fished group 2 septins (a) and vice versa (b) ($p < 0.001$). As initially proposed by Kinoshita there may be substitutions among different members of the same septin group. The sequence of listed septins from left to right reflects a descending order of frequency of clones with septins that were found to interact (e.g. for SEPT6 bait: 9,3,7 and 5,1,4,2).

doi:10.1371/journal.pone.0013799.g003

imply filament assembly, which is different from the canonical 7-6-2 arrangement. Surka and coworkers [38] described the immunoprecipitation of a complex containing septins 2, 6, 7 and 9 from HeLa cells, therefore suggesting that septin complexes may involve more than three components. This was confirmed more recently by Mostowy and coworkers [25] in which SEPT11 was replaced by SEPT6. A possible arrangement of SEPT7 and 9 in the filament is given in Figure 4D, where our own data are combined with data from the literature.

The SEPT3 members tested, especially SEPT3 itself, showed the lowest number of interactions with other septins but a relatively large number of interactions with other proteins (80%, Fig. 1). SEPT3 is highly expressed in neurons [8], which may imply a specialized function in these cells that may not be limited to septin filament formation, although it has been found in complex with SEPT6 members [13,37]. SEPT9, on the other hand, is expressed ubiquitously, but occurs in many different

variants in different tissues [8,36]. Full length SEPT9 interacted only with SEPT6 and SEPT7, but its N-terminal region used alone as bait, only picked up non-septin proteins as interaction partners (see discussion below). Since SEPT9 lacks the C-terminal coiled coil domain, its interaction with other septins is likely to occur via the GTPase domain.

Besides the foregoing discussion SEPT7 also detected some clones of SEPT4 and SEPT1 (together 7%). These are not anticipated by the canonical 7-6-2 filament and may suggest a tendency to participate in other trimeric or even dimeric or tetrameric assemblies upon multimerization or filament formation. SEPT7 is expressed in most tissues and is therefore expected to be more involved in basic processes such as cell division. It belongs to the group of septins with the fewest members (SEPT7 and 13, only) and is present in almost all of the heterofilaments described to date. It may therefore turn out to be a fundamental element for filament formation.

Figure 4. Schematic representation of possible septin-septin interactions within putative filaments, based on a combination of our yeast two hybrid assay's data and previously published data. (A) the canonical or standard filament taken from the crystal structure of the 7-6-2 complex [18] showing the trimeric and hexameric cores and the NC and G interface. The 7-6 dimer is believed to be stabilized by a long coiled coil at an NC interface, whilst the 2-2 dimer is similarly stabilized by a short coiled coil. (B) possible arrangement for a filament composed of members from the SEPT3, SEPT6 and SEPT2 groups. SEPT3 group contains both septin 3 and 9. This arrangement would leave the SEPT6 coiled coil unpaired and "free" for interaction with other coiled-coil containing proteins (see text for details). (C) possible arrangement for a filament composed of members from the SEPT3, SEPT6 and SEPT7 groups. (D) possible position for SEPT9 compatible with the observed yeast two-hybrid data and data from the literature [38] (see also Fig. 3c,d). doi:10.1371/journal.pone.0013799.g004

SEPT11 (which is very similar to SEPT6), although not used as a bait by us here, was found as a prey in significant proportions when SEPT1, 4, 5 and 3 were used as bait and in relatively smaller proportion in the case of SEPT5 (Fig. 1). These interactions are consistent with the canonical filament where SEPT11 would occupy the central position of the trimeric unit. Curiously, neither septins 12, 13 nor 14 were ever picked up by any of our bait septins. This may either suggest that they are poorly expressed in the libraries tested or that these septins, like SEPT10 have no strong tendency to interact with other septins.

Common non septin-interactors

Aside the many septins found to interact with most of our baits, we observed varying quantities of non-septin proteins as interaction partners in all cases. These belonged to both structural and functional classes of proteins (Table 2, Figure S1). Most interestingly, some of them were repeatedly found with several different septins (e.g. UBE2L, SUMO or PIAS). In fact the latter proteins, functionally associated with the ubiquitin and sumo-cycles were found as interactors for all septins except SEPT7, SEPT9 and SEPT10. This indicated that at all members of the SEPT2 group and at least some members of the SEPT3 and SEPT6 groups have a propensity to interact with proteins from the sumo- and ubiquitin-cycles and seems to suggest possible protein degradation pathways relevant for human septins (Fig. 5). Furthermore, these findings

show that the sumoylation process may be relevant for the regulation of septin functions, since SEPT3, SEPT6 and SEPT8 all picked up SUMO1 and/or the Sumo ligase PIAS3. Sumoylation of proteins has been shown to regulate the assembly and disassembly of protein complexes, their localization, stability and various other functions [39–41]. Previous data from the literature have demonstrated that yeast septins interact with SUMO and it has been suggested that sumoylation may be key for assembly of human septin filaments [42]. In yeast the septin ring formation depends critically on septin sumoylation [42–44].

Further functional contexts which are common to more than one septin or even to more than one septin group include: (a) Microtubular transport/intracellular trafficking/endocytosis (septins 2, 3, 5, 7 and 8); (b) Cell motility (septins 3, 6 and 8); (c) cell division/cell cycle (septins 1, 6, 8 and 10); (d) apoptosis (septins 3, 9 and 6) and (e) regulation through kinases/phosphorylation (signaling) (septins 2, 3, 4 and 6) (Table 2, Figure 5).

Selected non-septin interactors

Some of the septins used as baits interacted with non-septin proteins or members of the same family of proteins that have been previously reported to interact with another septin. For example, the protein CENP-F was identified as an interactor of SEPT8 (Table 2). Interestingly, SEPT7 has been previously found to interact with CENP-E [45]. In that case it was reported that interference with SEPT7 iRNA prevents the correct localization of CENP-E to the kinetochore and abnormal chromosomal segregation [45]. Based on these and other experiments it was established that SEPT7 and CENP-E form an interacting pair in cells and that this interaction is not only important for the septin filament assembly but also for the correct formation of the kinetochore complex and is therefore essential for the mitotic spindle checkpoint [12,45–48]. We may speculate that another such pair of interactors may be the proteins SEPT8 and CENP-F, whose interaction we describe here for the first time. This may suggest that SEPT8 in addition to other previously reported septins (SEPT2, SEPT7), is important for chromosome segregation and mitotic progression. Since this particular combination of septins (SEPT 7-8-2, Fig. 4) is expected to form viable filaments (see above discussion), this may imply that complex formation is relevant for fulfilling this physiological role.

Another individual interaction found, which merits discussion is that of SEPT5 and SNX6, since this may involve a coiled-coil interaction between the C-terminal domain of SEPT5 and one or both of the coiled-coil regions present in the C-terminal region of SNX6 [49,50]. Coiled-coil domains (CC) are predicted to occur in up to 10% of eukaryotic proteins and are related to a wide array of different functions but serve predominantly to promote protein-protein interaction [51,52]. SNX6 contains a Phox (PX) domain involved in phosphoinositide binding and members of the SNX family of proteins, like septins, are involved in intracellular trafficking. SNX members have been found in oligomeric complexes with other proteins where their interactions were mediated by both the PX and CC domains [49,50]. The interaction of SEPT5 and SNX6 seems to be biologically relevant since several other proteins that have been described to interact with septins are also related to intracellular trafficking and/or exocytosis.

It is of interest to note that both SNX6 and CENP-E appear to interact with septins via a coiled coil domain. This may imply that under certain circumstances, acting individually or even within the context of certain heterofilaments, not all of the septin coiled coils are satisfied. Some combinations of septins may leave coiled coils available for interaction with non-septin partners (e.g. Fig. 4B).

Table 2. Summary table of all septin interacting proteins identified and their functional assignments.

Septin bait	Group	Septin preys (In order of frequency)	Predominant septin prey group	Non-septin preys in order of frequency (shared preys)	Functions of non-septins	Overlapping functions
1	2	Septin 9,6,11, 1,2,4,5	Group 6	UBE2I, CEP110, SKA1	Protein degradation, cell division	C U
2	2	Septin 6, 4	Group 6	ANKZF1, DCTN2, CCDC45, PC-5/K-I, MAP3K12, ribosomal S6 Kinase like, UBE2I	Transport, Motor activity, microtubule-based process, kinase	T M P C U
4	2	Septin 11, 10, 6, 8	Group6	UBE2I, VEGFR-1, CASC3	Phosphorylation/Tyrosine kinase receptor, Protein degradation	P C U
5	2	Septin 6, 8, 11, 5, 2	Group6	UBE2I, SNX6	Protein degradation, Intracellular Trafficking	T C U
9 (9N)	3 (3/9)	Septin 6, 7	Group 6	FLNA, SH3KBP1	Cytoskeletal organization, apoptosis	T C
3	3 (3/9)	Septin 6, 11	Group 6	UBE2I, CASP8AP2, PIAS3, TDG, ABCB10, ACTB, EIF 4A, EXOSC9, GABA-RAPL2, HNRNP3, MYO1B, PLK2, PRDX2, RPL14, RPS24, STMN2, SUMO1, TMEM93, IFT27, TDG	Protein degradation, Cell motility, Apoptosis, DNA repair, SUMO ligase, Neuron differentiation, Splicing process, Phosphorylation, Translation, Signal transduction, kinase, Endocytosis	T M P G C U
6	6	Septin 9, 5, 7, 1, 2, 4, 3	Group 3	UBE2I, SUMO1, CASP8AP2, PIAS3, TOPORS, ACTR2, HIPK3, MDH1	Apoptosis, Cell cycle, SUMO cycle activity, Protein modification process, Ubiquitin cycle, Cell motility, Cell division, Protein degradation, kinase	P C U
8	6	Septin 9, 7, 4, 2, 5, 1	Group 3	C1QBP, CERCAM, CENP-F, SH2B3, UFD1L, CAPRIN1, ERP29, FAM89B, HDAC11, KIF14, LCP1, LMNB1, PBXIP1, PIAS3, SMARCC2, ZNF451	Immune response, Cell division, Cell adhesion, cell motility, SUMO ligase activity, Cell cycle, intracellular protein transport, Transcription, microtubule motor activity, Cell differentiation, ubiquitin cycle	T M C U
10	6	–	–	PLZF-ZBTB16	cell cycle, transcription	C
7	7	Septin 9, 6, 4, 1, 10, 11	Group 3	RALBP1, ANKRD12, ZNF451	Endocytosis, Transcriptional	G C

Overlapping functions: T = Transport, endocytosis and cytoskeleton, M = Motoractivity, P = Phosphorylation, G = GAP Ras, C = Cell division, Cell cycle, U = Ubiquitin / Sumo cycles (Plas, Ube2I).

doi:10.1371/journal.pone.0013799.t002

Figure 5. Non-septin interactors of the septins 1–10 grouped by functional categories. The group wise clustering of functional contexts is evident. The most predominant functions are emphasized only in order not to pollute the figure with excessive information. Septins are shown clustered into the four groups: SEPT2, SEPT3, SEPT6 and SEPT7 from top to bottom in different colors.
doi:10.1371/journal.pone.0013799.g005

In yeast it has been reported that septins recruit SDKs (septin dependent kinases) [53–55] indicating that phosphorylation of septins may be an important factor in the regulation of their activities. SDKs function as regulators of septin filament assembly and for the correct positioning and alignment of the microtubules during the budding process. Other kinases such as Hsl1 and Gin4 seem to be critical for the transition from G2 to M during the cell cycle [53,56,57] and their direct interaction with septins seems to be essential for their correct localization and activity. In our screens we identified two additional kinases that may represent candidates for additional points of regulation of septin activity. HIPK3 (Homeodomain interacting protein kinase 3) was found as an interactor for SEPT6 and PLK2 (Polo-like kinase 2) as an interactor of SEPT3 (Table S1). Although in both cases only a single clone was identified, the result may be significant. Based on the usually weak and transient interaction between kinases and their substrates, it is not expected that this type of interaction appear with considerable frequency in yeast two-hybrid screens. It is worth pointing out that PLK2 is like the functionally related SDKs mentioned above, associated with the regulation of the transition from G2 to M [58]. Should this interaction prove to be of physiological relevance our data suggest that aside the SDKs other kinases are involved in the functional regulation of septins during this part of the cell cycle.

In the case of the HIPK3 kinase, a possible biological link is less evident and there are only very few publications on the functions of

this kinase currently available. It has been identified to be associated with the cytoplasmic domain of the FAS receptor, although its activity was not found to influence cell death directly [59].

Another interesting finding is the identification of the two proteins IFT27 (former name RabL4) and RalABP1 which interacted with SEPT3 and SEPT7 respectively. IFT27 is a Ras-like GTPase protein that contains the five consensus sequences needed for GTP-binding and GTPase activity. IFT27 can bind to GTP and may act at the end of the cytokinesis where Rab family members are involved in vesicle trafficking required to complete this process [60]. Since septins are also involved in vesicle trafficking and cytokinesis, the interaction with IFT27 may be biologically relevant and should be further tested experimentally. RalABP1 is a member of the Ras GTPase superfamily and the latter is GTPase-activator protein, involved in the regulation of endocytosis during interphase. Since the discovery that septins bind and hydrolyze GTP, although at a rather slow rate, it has been speculated that other interacting proteins may act as GAPs (GTPase activating proteins), that through promoting GTP to GDP hydrolysis may regulate septin function. This could alter the septins conformation and may influence its interaction with other proteins, including their assembly into septin filaments. RalABP1 has been already reported to act as a GAP on other GTPases and RabL4 could be another candidate for a septin GTPase regulatory protein. The GAP Rho has been previously shown to act on the mammalian SEPT9b [35].

Finally, we also found two interesting non-septin interactors of the SEPT9 N-terminal region: filamin A (FLNA) and SH3-domain kinase binding protein 1 (SH3KBP1). The former one is directly involved in actin cytoskeleton organization [61] and the interaction between FLNA and SEPT9 could represent a novel physical and functional connection between septin and actin filaments. SH3KBP1, the second interactor, is an adaptor protein involved in many processes, from cytoskeleton remodeling and vesicle-mediated transport to signal transduction and cell death [12,62–65]. Recently, many proteins involved in cytoskeleton and membrane processes, including septins, were found to interact with SH3KBP1 by mass spectrometry analysis [66]. Our results confirm these previous studies since the N-terminal domain of SEPT9 picked up SH3KBP1 in the two-hybrid assay. In addition, an interactor of septins, cytoskeleton components and plasma membranes called anillin [67] was found to interact with SH3KBP1 [66]. Since anillin and septins interact directly [17] and both interact with SH3KBP1, our findings suggest that the septins-SH3KBP1 interaction could be involved in cytokinesis and plasma membrane processes, such as vesicle trafficking. Although our findings provide possible clues for better understanding septin filament assembly and regulation, further experimental studies are clearly essential.

Prey regions involved in Protein-Protein Interactions

After DNA sequencing of the interacting prey plasmids and analysis of their sequences we found that a large fraction of the clones encode full-length or almost full length proteins. As expected however many clones also encode only protein fragments that may contain specific protein domains.

In case of the septin preys found to interact with septin baits it was especially obvious that the majority of clones encoded full length proteins (Table S1, e.g. SEPT3: interacted with SEPT6(4-427), SEPT11(7-429). Most interestingly, even if the prey septins were not full length proteins, they almost always encoded for the central GTPase domain, for example SEPT6, which interacted with SEPT9(129-568), SEPT5(39-369) and SEPT7(65-437), and SEPT4(101-478). This clearly confirms the known fact that the central GTPase domain is important for mediating septin-septin

interactions [18]. Furthermore, this finding indicated that the identified new septin-septin interactions may indeed represent physiological relevant combinations. For the other, non-septin preys, we were able to identify the following overall trend: small-size prey proteins tend to be present rather completely, while for the larger proteins, often only a restricted interacting region could be identified. This may imply that for larger proteins, only specific domains or modules are responsible for septin recognition.

The first crystal structure of a septin complex [18] provided considerable food for thought with respect to the way in which this apparently redundant family of proteins can potentially form a myriad of different filaments. Here we provide the first large scale yeast two-hybrid study which addresses this question. We have provided a large body of experimental evidence which for the most part corroborates the speculation made by Kinoshita [6] that septins are substitutable within their given groups. New potential non-septin partners have also been described. What controls assembly and the physiological requirement for such potential diversity are questions which badly need addressing.

Materials and Methods

Plasmid construction

Oligonucleotides were designed to amplify and sub-clone the cDNAs encoding the amino acid sequences of the human Septins 2–10 studied here. Full length SEPT1 was picked up as a prey in a two hybrid screen with SEPT6. Its cDNA was subsequently sub-cloned in the pBTM116 vector to perform a screen with SEPT1 as bait. In all cases full length cDNAs were amplified, except for SEPT9, where in addition to the full length protein we also used a construct that spans the N-terminal region alone (amino acids 1- 269). A second exception was that of the full length version of SEPT4, which showed auto-activation of the reporter genes. In this case we employed for the screen a construct which lacked the N-terminal domain (aa 124-478) and no longer resulted in auto-activation. All septin cDNAs were isolated from a human fetal brain cDNA library (Clontech). These were cloned in frame with LexA into the poly linker of the bait vector pBTM116 which had the ampicillin resistance marker changed to a kanamycin resistance marker to facilitate recovery of the prey plasmid from the co-transformed bait-plasmid pACT2, contains an Amp resistance marker. Furthermore, the modified plasmid contained some additional restriction enzyme sites in the cloning site to facilitate cloning. A total of 11 baits cDNAs were successfully cloned. These include: hSEPT1 (NM_052838), hSEPT2 (NM_004404), hSEPT3 (NM_019106), hSEPT4 (lacking the N-terminal domain and hence corresponding to amino acid residues 124–478) (NM_080416), hSEPT5 (NM_002688), hSEPT6 (NM_015129), hSEPT7 (NM_001788), hSEPT8 (NM_001098811.1), hSEPT9 (NM_006640) transcript variant 3, protein: isoform c, hSEPT9 N-terminal region (amino acid residues 1-269 transcript variant 3, protein: isoform c), and hSEPT10 (NM144710). These are no new cell lines but only cDNA clones obtained by in vitro experiments as described above.

Basic yeast procedures and two hybrid screen

The yeast two-hybrid screens [68] of two different cDNA libraries were screened for all 11 bait proteins; a human fetal brain library and a human leukocyte library (both from Clontech). We used the yeast strain LAO (*trp1-901*, *his3Δ200*, *leu2-3*, *ade2* *LIS2::(lexAop)4-HIS3* *URA3::(lexAop)8-lac* *GAL4*) and the baits described above fused to the bacterial LexA protein in the slightly modified vector pBTM116 [69]. Since SEPT4 auto-activated the yeast reporter genes, a construct spanning amino acids 124-478 was used, which showed no auto-activation. This construct

contains the GTPase and C-terminal domains of SEPT4, but lacks the relatively large N-terminal domain.

Yeast cells were transformed according to procedures provided by Clontech. The autonomous activation test for HIS3 was performed in minimal medium plates in the absence of tryptophan and histidine but containing varying concentrations of 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole). None of the septin bait constructs, except SEPT4, showed auto-activation.

For the library scale screens the competent L40 yeast cells were first transfected with the bait construct as described previously [70]. The recombinant cells were then, in a second round of growth, transfected with the library plasmid. For the interaction screen these double transfected cells were then plated on minimal medium plates in the absence of tryptophan, leucine, and histidine and containing 5 mM 3-AT, to suppress non specific background growth. At least 1 million co-transfectants were plated and analyzed in total for each bait septin. Typically this meant that at least 20 plates of 15 cm diameter were screened for each of the two libraries. The number of clones growing varied greatly from septin to septin bait, ranging from few clones for SEPT10 to several thousand clones in case of SEPT6. Recombinant pACT2 plasmids of growing colonies were isolated and subsequently transformed in *E. coli* for plasmid amplification and isolation. Prey plasmid DNA was extracted and sequenced with an automatic DNA sequencer (Model 16-capillary 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). The corresponding Accession numbers of the DNA sequences identified are given in the Supplementary Table S1. As no new sequences have been obtained no new sequence data have been deposited in the GenBank.

When only a relatively small number of colonies grew (<100), plasmid DNA was extracted and sequenced from all such colonies. In cases where a relatively large number of colonies were obtained (>1000), plasmid was extracted and sequenced for at least 200 colonies (SEPT6 and SEPT8). All plasmids were submitted to confirmation assays in the yeast (see next paragraph) and only those which proved to be positive were considered for subsequent analyses and are presented here (see next paragraph). In some cases up to 50% of the initially sequenced clones did not give positive results in the confirmation assay and all of these were discarded from further analysis. All clones shown in the supplementary tables 1–10 have been confirmed.

Yeast interaction confirmation assay

Extracted plasmids from positive clones during the initial screening were used to transform L40 yeast cells previously transformed with the appropriate bait. The interactions were confirmed in yeast cells using the β -galactosidase assay. The control of assay was performed with an empty bait vector (pBTM116-lexA alone). Clones that did not confirm the growth and blue color production when co-transformed with their bait septins were discarded from further analysis (false positives). Any prey plasmids that had alone (in absence of the specific bait vector and presence of “empty” bait vector only) the capacity to promote growth or the production of blue color was also discarded (false positive). All clones reported in the Table S1 have been confirmed.

β -Galactosidase assay for the confirmation of interactions

For confirmation of the potential interaction between the septin bait and the fished prey clones in a one-to-one fashion, β -Galactosidase activity in yeast cells was determined using the filter assay method. Yeast transformants (Leu+, Trp+, His+) grown on minimal medium were transferred onto filter papers. The paper disks were incubated for 3 min in liquid nitrogen, thawed and soaked with Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄,

10 mM MgCl₂, 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0) containing 1 mg.mL⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal). After incubation at 37°C for 30 min to 1 h the formation of a blue color was evaluated. Only clones that had an unambiguous blue color were considered true positives. These interactions were considered to be confirmed and the corresponding clones were included in the data analysis presented in the tables and figures of this report. Colonies that remained white or faintly blue were excluded from further analyses.

Cloning, protein expression and purification for confirmatory interaction assays

For expression in *E. coli* of either the bait proteins or the corresponding preys identified above, the encoding cDNAs were sub-cloned into the expression vectors pET28 and/or pGEX as described [70]. Orientation and correctness of DNA sequences were confirmed by DNA sequencing. The recombinant proteins were either expressed in fusion with GST or 6xHis tags according to standard protocols [71]. Subsequently, the fusion proteins were purified on glutathione-Uniflow resin (Clontech) or HiTrap chelating resin (GE Healthcare) as described [72]. *In vitro* binding assays/pull down assays were performed as described previously [73].

Statistical analysis

In the case of the septin bait's interactions with other prey septins (Fig. 2, 3) we performed group wise statistical analysis using a Fischer's exact test for counts employing the free software R, version 2.11.1 [74]. First, septins were grouped into four groups, according to their sequence similarity: group 2 (septins 1,2,4,5), group 6 (septins 6,8,10,11), group 3/9 (septins 3 and 9), “group” 7 (only septin 7). Then the number of interacting clones was summed for each member inside the same group (see raw data plotted in Fig. 2 and also Table S1) and tested for a random distribution. Subsequently, we compared groups in a one-to-one and reciprocal fashion in a similar manner. Finally, an analysis was performed for the occurrence of interactions among septins of the same group. Please refer to the supplementary material for detailed results of the statistical analysis.

Supporting Information

Table S1 Characteristics of interacting proteins for septins 1 to septin 10 as predicted from the clones retrieved in the yeast two-hybrid system screenings. The Tables appear in sequence of the septin protein used as bait in the screen. HFB: Human fetal brain cDNA library screened, LEU: human leukocyte cDNA library screened. The number of clones obtained is indicated as a total as well as the numbers for the leukocyte and human fetal brain library separately. The gene accession number, main assigned protein function, specific present protein domains and references are also given. Septins are listed first followed by non-septins, in both cases in order of decreasing frequency (i.e., the number of identified clones, independent of being either identical or not. See table for discrimination if available). Results of statistical analyses are given after the tables.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013799.s001 (0.39 MB DOC)

Figure S1 A protein interaction network of the human septins 1–10. The network consists of a total of proteins (colored nodes, including the septin baits and its interacting partners identified in the yeast two-hybrid screens) and the interactions connecting them (grey links). The nodes are colored based on the GO biological process as indicated in the legend. The network was generated using the Osprey 1.2.0. software (<http://biodata.mshri.on.ca/>)

osprey/). The proteins that interacted with septin are involved in Carbohydrate Metabolism, Cell Cycle, Cell Organization and Biogenesis, DNA Damage Response, DNA metabolism, DNA Repair, Metabolism, Protein amino acid phosphorylation, Protein biosynthesis, Protein transport, RNA Localization, RNA processing, Signal transduction, Transcription, Transport.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013799.s002 (0.11 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Maria Eugenia R. Camargo, Elaine Cristina Teixeira, Tereza Cristina Lima Silva and Adriana Cristina Alves Pinto for technical assistance

References

- Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y (2008) Nature Reviews, Molecular Cell Biology 9: 478–489.
- Pan F, Malmberg RL, Momany M (2007) Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. BMC Evol Biol 7: 103.
- Peterson EA, Kalikin IM, Steels JD, Etey MP, Trimble WS, et al. (2007) Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. Mamm Genome 18: 796–807.
- Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, et al. (2002) Mammalian septins nomenclature. Mol Biol Cell 13: 4111–4113.
- McIlhatton MA, Burrows JF, Domaghy PG, Chanduloy S, Johnston PG, et al. (2001) Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. Oncogene 20: 5930–5939.
- Kinoshita M (2003) Assembly of mammalian septins. J Biochem 134: 491–496.
- Martinez C, Sanjuan MA, Dent JA, Karlsson I, Ware J (2004) Biochem J 382: 783–791.
- Cao L, Ding X, Yu W, Yang X, Shen S, et al. (2007) Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. FEBS Lett 581: 5526–32.
- Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, et al. (1999) Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. Curr Biol 9: 1458–1467.
- Kinoshita M (2006) Diversity of septin scaffolds. Current Opinion in Cell Biology 18: 54–60.
- Bertin A, McMurray MA, Grob P, Park SS, Garcia G, et al. (2008) Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 8274–8279.
- Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ (2005) A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. Science 307: 1781–1785.
- Nagata K, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M (2004) Biochemical and Cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. J Biol Chem 279: 55895–55904.
- Xie Y, Vessey JP, Konecna A, Dahm R, Macchi P, et al. (2007) The GTP Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching and Dendritic-Spine Morphology. Current Biology 17: 1746–1751.
- Fujishima K, Kiyonari H, Kurisu J, Hirano T, Kengaku M (2007) Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. J Neurochem 102: 77–92.
- Lukyanova N, Baldwin SA, Trincik J (2007) 3D reconstruction of mammalian septin filaments. J Mol Biol 376: 1–7.
- Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ (2002) Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. Developmental Cell 3: 791–802.
- Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Köhlmann D, Macara IG, et al. (2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. Nature 449: 311–315.
- Sirajuddin M, Farkasovsky M, Zent E, Wittinghofer A (2009) GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 16592–16597.
- Dobbelare J, Barral Y (2004) Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. Science 305: 393–396.
- Huang Y-W, Yan M, Collins RF, DiGiacco JE, Grinstein S, et al. (2008) Mammalian Septins Are Required for Phagosome Formation. Mol Biol Cell 19: 1717–1726.
- Joo E, Tsang CW, Trimble WS (2005) Septins: Traffic Control at the Cytokinesis Intersection. Traffic 6: 626–634.
- Ogawa Y, Rashad MN (2009) Proteomic analysis of optic nerve lipid rafts reveals new paranodal proteins. J Neurosci Res 87: 3502–3510.
- Cao L, Yu W, Wu Y, Yu L (2009) The evolution, complex structure and function of septins. Cell Mol Life Sci 66: 3309–3323.
- Mostowy S, Nam Tham T, Dandkaert A, Guadagnini S, Boisson-Dupuis S, et al. (2009) Septins regulate bacterial entry into host cells. PLoS One 4: e4196.
- Kozubowski L, Heitman J (2010) Septins Enhance Morphogenetic Events during Sexual Reproduction and Contribute to Virulence of Cryptococcus neoformans. Mol Microbiol 75: 658–675.
- González-Nowo A, Labrador L, Jiménez A, Sánchez-Pérez M, Jiménez J (2006) Role of the septin Cdc10 in the virulence of Candida albicans. Microbiol Immunol 50: 499–511.
- Douglas LM, Alvarez EJ, McCreary C, Konopka JB (2005) Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. Eukaryot Cell 4: 1503–1512.
- Gonzalez ME, Peterson EA, Privette IM, Loffreda-Wren JI, Kalikin IM, et al. (2007) High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. Cancer Res 67: 8554–8564.
- Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, et al. (2003) Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. J Biol Chem 278: 24095–24102.
- Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Akiguchi I, et al. (1998) Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's Disease. Am J Pathol 153: 1551–1560.
- Kuhlenbäumer G, Hannibal MC, Nedis E, Schirmacher A, Verpoorten N, et al. (2005) Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. Nature Genet 37: 1044–1046.
- Blaser S, Horn J, Würmli H, Bauer H, Strümpell, et al. (2004) The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. Thromb Haemost. 91: 959–966.
- Blaser S, Rösler S, Rempp H, Bartsch I, Bauer H, et al. (2006) Human endothelial cell septins: SEPT11 is an interaction partner of SEPT5. J Pathol 210: 103–110.
- Nagata K, Inagaki M (2005) Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. Oncogene 24: 65–76.
- Hall PA, Jung K, Hilar KJ, Russell SEH (2005) Expression profiling of the human septin gene family. J Pathology 206: 269–278.
- Ding X, Yu W, Liu M, Shen S, Chen F, et al. (2008) GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. Mol Cells 25: 385–389.
- Sorka MC, Tsang CW, Trimble WS (2002) The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. Mol Biol Cell 13: 3532–3545.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. Annu Rev Biochem 73: 355–382.
- Jackson PK (2001) A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. Genes Dev 15: 3053–3058.
- Schmidt D, Müller S (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. Cell Mol Life Sci 60: 2561–2574.
- Martin SW, Konopka JB (2004) SUMO modification of septin-interacting proteins in Candida albicans. J Biol Chem 279: 40861–40867.
- Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. Cell 106: 735–744.
- Johnson ES, Blobel G (1999) Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein Sumo to the yeast septins. J Cell Biol 147: 981–994.
- Zhu M, Wang F, Yan F, Yao PY, Du J, et al. (2008) Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. J Biol Chem 283: 18916–18925.
- Rattner JB, Rao A, Fritzler MJ, Valencia DW, Yen TJ (1993) CENPF is a ca. 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. Cell Motil Cytoskeleton 26: 214–226.
- Liao H, Winkler RJ, Mack G, Rattner JB, Yen TJ (1995) CENPF is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. 130: 507–18.
- Varis A, Salmela AL, Kallio MJ (2006) Cenp-F (mitosin) is more than a mitotic marker. Chromosoma 115: 288–295.
- Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ, et al. (2007) A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. J Cell Sci 120: 45–54.
- Parks WT, Frank DB, Huff C, Renfrew Haft C, Martin J, et al. (2001) Sorting nexin 6, a novel SNX, interacts with the transforming growth factor-beta family of receptor serine-threonine kinases. J Biol Chem 276: 19332–19339.
- Grigoryan G, Keating AE (2008) Structural specificity in coiled-coil interactions. Curr Opin Struct Biol 18: 477–483.

52. Rose A, Meier I (2004) Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci* 61: 1996–2009.
53. Barral Y, Parra M, Bidlingmaier S, Snyder M (1999) Nrm1 related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* 13: 176–187.
54. Hanarajan J, Snyder M (2003) Cytoskeletal activation of a checkpoint kinase. *Mol Cell* 12: 663–673.
55. Keaton J, Lew DJ (2006) Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in yeast morphogenesis checkpoint. *Curr Opin Microbiol* 9: 540–546.
56. Carroll CW, Altman R, Schiltz D, Yates JR, Kellogg D (1998) The septins are required for the mitosis specific activation of Gin4 kinase. 143: 709–717.
57. Longtine MS, Fares H, Pringle JR (1998) Role of the yeast Gin4 protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* 143: 719–736.
58. Kishi K, van Vugt MA, Okamoto K, Hayashi Y, Yaffe MB (2009) Functional dynamics of polo-like kinase 1 at the centrosome. *Mol Cell Biol* 29: 3134–3150.
59. Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, et al. (2000) FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits Fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med* 192: 1165–1174.
60. Qin H, Wang Z, Diener D, Rosenbaum J (2007) Intracellular transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Current Biology* 17: 193–202.
61. van der Plier A, Sonnenberg A (2001) Structural and functional aspects of filamins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1538: 99–117.
62. Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu Z, Iwata N, et al. (2000) Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 321–328.
63. Gout I, Middleton G, Adu J, Ninkina NN, Drobot LB, et al. (2000) Negative regulation of PI3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *EMBO J* 19: 4015–4025.
64. Schmidt MH, Chen B, Randazzo LM, Boger O (2003) SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *Journal of Cell Science* 116: 2845–2855.
65. Zhang J, Zheng X, Yang X, Liao K (2009) CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Research* 19: 733–746.
66. Havrylov S, Rzhetsky Y, Malinowska A, Drobot L, Redowicz MJ (2009) Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome Science* 7: 21.
67. Hickson GRX, O'Farrell PH (2008) Anillin: a pivotal organizer of the cytokinetic machinery. *Biochemical Society Transactions*. 36: 439–441.
68. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9578.
69. Bartel PL, Fields S (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* 254: 241–263.
70. Assmann EM, Alborghetti MR, Camargo MER, Kobarg J (2006) FEZ1 Dimerization and Interaction with Transcription Regulatory Proteins Involves Its Coiled-coil Region. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 9869–9881.
71. Moraes KCM, Quaresma AJC, Machius K, Kobarg J (2003) Identification of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding factor AUF1 (hnRNP D0). *Biological Chemistry* 384: 25–37.
72. Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J (2003) Identification of proteins that interact with the central coiled coil region of the human protein kinase NEK1 involved in the cell cycle regulation. *Biochemistry* 42: 15369–15376.
73. Nery FC, Pasos DO, Garcia V, Kobarg J (2004) Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 279: 11444–11455.
74. R development core team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90051-07-0, Available: <http://www.R-project.org>, Accessed 2010, Aug 24.

ARTICLE IN PRESS

Biochimie xxx (2011) 1–9

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Self assembly of human septin 2 into amyloid filaments

Julio Cesar Pissuti Damalio^a, Wanius Garcia^b, Joci Neuby Alves Macêdo^a, Ivo de Almeida Marques^a,
José M. Andreu^c, Rafael Giraldo^c, Richard Charles Garratt^a, Ana Paula Ulian Araújo^{a,*}

^a Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Santa Adélia, 148, Santo André, SP, Brazil

^c Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2011

Accepted 15 September 2011

Available online xxx

Keywords:

GTPase domain

Aggregates

Amyloid

Neurodegenerative diseases

Septin

ABSTRACT

Septins are a conserved group of GTP-binding proteins that form hetero-oligomeric complexes which assemble into filaments. These are essential for septin function, including their role in cytokinesis, cell division, exocytosis and membrane trafficking. Septin 2 (SEPT2) is a member of the septin family and has been associated with neurofibrillary tangles and other pathological features of senile plaques in Alzheimer's disease. An *in silico* analysis of the amino acid sequence of SEPT2 identified regions with a significant tendency to aggregate and/or form amyloid. These were all observed within the GTP-binding domain. This was consistent with the experimental identification of a structure rich in β -sheet during temperature induced unfolding transitions observed for both the full length protein and the GTP-binding domain alone. This intermediate state is characterized by irreversible aggregation and has the ability to bind Thioflavin-T, suggesting its amyloid nature. Under electron microscopy, fibers extending for several micrometers in length could be visualized. The results shown in this study support the hypothesis that single septins, when present in excess or with unbalanced stoichiometries, may be unstable and assemble into amyloid-like structures.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The septins are members of a conserved group of GTP-binding proteins, originally discovered in yeast as being required for the completion of the cell cycle [1]. Septins have been identified in all animals and fungi [2]. In mammals they are involved in a variety of cellular phenomena, such as microtubule regulation [3,4], vesicle trafficking [5], the assembly of scaffolding platforms [6], actin dynamics [7], exocytosis [8], apoptosis [9], DNA repair [10] and mechanical stability [11–13].

All members of the septin family can be divided into three domains: a variable N-terminal domain, a GTP-binding domain and a C-terminal region, which generally includes sequences with the potential to assemble as a coiled-coil [14]. In addition, some septins have a polybasic region between the N-terminal and GTP-binding domains, which is responsible for lipid interaction [15]. Both the binding of GTP and its hydrolysis have been experimentally demonstrated for several septins *in vitro* [2,16–18].

Septins can assemble into high-order hetero-filaments, including two or more members of the family, *in vivo* and *in vitro*. These hetero-filaments were isolated from *Drosophila melanogaster* [19] and fungi [20], and shown to have a width of about 7–9 nm and a variable length. Hetero-filaments were also identified in the case of the *Caenorhabditis elegans* septins UNC-59 and UNC-61 [21]. Moreover, a complex of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* septins, Cdc3, Cdc10, Cdc11 and Cdc12, forms an elongated linear octamer composed of two copies of each individual septin which subsequently polymerize to form filaments [22]. Recently, Sirajuddin et al. solved the crystal structures of both the human SEPT2 GTP-binding domain alone and the hetero-trimeric complex of SEPT2–SEPT6–SEPT7 [23]. In both cases the crystal lattice leads to the formation of filaments. In addition, members of the same group can replace each other in the specific position along the heterofilament [24].

Although the formation of hetero-filaments by septins and their associated functions is relatively well established, information concerning the existence and physiological role of homo-filaments is puzzling. The first report of filaments formed by a single septin was that for *Xenopus laevis* SEPT2. The authors described homo-filaments of 20 nm in width when the component monomers were bound to GTP but not to GDP [25]. This observation has been

* Corresponding author. Tel.: +55 16 33739875; fax: +55 1633715381.
E-mail address: anapaula@ifsc.usp.br (A.P. Ulian Araújo).

subsequently questioned, leaving some doubt about the relevance of homo-filaments in the case of *Xenopus* septins [26]. However, 20–40 nm wide homo-filaments have also been reported for human SEPT2 in both the GTP- and GDP-bound states [18]. The question of the existence of homo-filaments is therefore unsettled and has been complicated by the observation of homo-filaments of human SEPT4, which are believed to be amyloid fibers with no physiological relevance [27].

SEPT2 is essential for cytokinesis, being located near the contractile ring from anaphase to telophase and finally condensing into the midbody [7]. It has a wide tissue distribution and specifically in the brain has been observed to co-localize with GLAST, an astrocyte glutamate transporter [28]. Based on this data SEPT2 has been suggested to play a role in signal transmission in the cerebellum [28]. Besides its physiological roles, SEPT2 has also been implicated in several pathologies including leukemia and lymphoma [29], renal cell carcinoma [30], brain tumors [31,32] and systemic lupus erythematosus [33]. Moreover, SEPT2 together with SEPT1 and SEPT4 (all of which are acidic proteins) have been seen to accumulate in neurofibrillary tangles (NFTs) in Alzheimer's disease [34] where they co-localize with the basic microtubule-associated protein tau. So far, however, the role of septins in NFT formation and the possible mechanisms of self-aggregation of septins in neurodegenerative disorders still remain unclear.

A wide range of human pathologies are associated with uncontrolled protein misfolding, leading to the conversion of polypeptide chains from their soluble globular states into well-organized fibrillar aggregates rich in β -sheet structure [35,36]. Amyloid formation is the hallmark of medically related disorders, such as Alzheimer disease, and more than 40 human related diseases have been described, each having a distinct clinical profile and each associated with the aggregation of a single dominant protein [37].

With the aim of shedding some light upon this issue, the present study uses a biophysical approach to investigate the stability and aggregation of SEPT2. Our results show that both SEPT2 and its GTP-binding domain (SEPT2G) are dimeric in solution, but they have the tendency to rapidly aggregate at physiological temperatures. These aggregates have the ability to bind Thioflavin-T, suggesting that they are amyloids and providing the first insight on the mechanisms that cause the formation of the aggregates associated with neurodegenerative diseases.

2. Material and methods

2.1. Materials and reagents

The bacterial expression vector pET28a(+) and Ni-NTA resin were purchased from Novagen. Restriction endonucleases, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, kanamycin, T4 DNA ligase and Taq Polymerase were obtained from Invitrogen. The Superdex-200 column 10/30 and native gels for electrophoresis [8–25% (w/v) gradient polyacrylamide] were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (GE-Healthcare). Guanosine-5'-diphosphate (GDP), protein standard markers and ThT (Thioflavin-T) were purchased from Sigma. All other chemical products used were obtained from Sigma and/or GE-Healthcare.

2.2. In silico analysis

Essentially, protein aggregation is a self-assembly of identical molecules [38], and these aggregates can be classified as either ordered or disordered, on the basis of their intimate structural features [39]. There is evidence that local unfolding events can cause the aggregation of normally globular proteins into well-organized fibrils [40]. In order to identify possible regions presenting a high

aggregation probability in SEPT2, we used the *in silico* analysis programs TANGO, WALTZ and ZYGREGATOR. TANGO is a statistical mechanics algorithm which predicts protein aggregation, based on the physico-chemical principles of β -sheet formation [41,42]. WALTZ and ZYGREGATOR are algorithms including additional thermodynamic information in the prediction of regions with a high probability to form amyloid sequences [43,44]. The amino acid sequence of SEPT2 was submitted to these prediction programs using servers based at <http://tango.crg.es/> and <http://waltz.switchlab.org/>, using default parameters. Additionally, the major isoforms of all 13 human septin sequences were also analyzed with WALTZ in order to compare their predicted amyloidogenic regions.

2.3. Plasmid construction and proteins expression

Based on the results of the sequence analysis, which suggested the presence of aggregation prone sequences within the GTP-binding domain, a construct was designed corresponding to a truncated SEPT2 protein covering this region of the molecule (SEPT2G, residues 34–308). The cDNA corresponding to SEPT2 (residues 1–361) and its GTP-binding domain (SEPT2G) were amplified using the polymerase chain reaction performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf), using a fetal brain cDNA library (Gibco BRL) as template. Amplification products were purified and cloned into the pET28a(+) expression vector, using *Nde*I and *Xho*I restriction sites. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH5 α for propagation and plasmid extraction purposes. These were named pSEPT2 and pSEPT2G and produced their respective products fused to an N-terminal His-tag. All plasmids were sequenced by the dideoxy chain method [45] using an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer) following the protocol of the manufacturer.

The expression plasmids were used to transform the *E. coli* host strain BL21(DE3). A total of 500 μ L of an overnight culture of *E. coli* BL21(DE3) harboring the pSEPT2 plasmid were inoculated into 500 mL of fresh LB medium containing kanamycin (50 μ g/mL). The culture was grown whilst shaking at 37 °C to mid log phase ($OD_{600nm} = 0.6$) and subsequently induced with IPTG at a final concentration of 0.4 mM followed by incubation for 10 h at 18 °C.

After centrifugation, the pelleted cells were re-suspended in 25 mM Tris-HCl pH 7.8 buffer, containing 100 μ M GDP and 10% glycerol. The cells were disrupted by the addition of 0.1 mg/mL lysozyme for 30 min at 4 °C, followed by sonication. The suspension was then centrifuged at 18,000 g for 20 min at 4 °C, and the pellet and supernatant were analyzed by SDS-PAGE to check the solubility of the recombinant protein. The supernatant containing the recombinant SEPT2 was loaded onto a nickel-affinity column equilibrated with the same buffer. After the unbound proteins were eliminated by exhaustive washing, SEPT2 was eluted by increasing concentrations of imidazole up to 300 mM.

The resulting SEPT2 was then loaded onto a Superdex-200 10/300 GL column (GE-Healthcare) pre-equilibrated with 25 mM Tris-HCl pH 7.8 buffer, containing 10% glycerol and driven by an Äkta purifier. The elution was carried out in the same buffer, at 4 °C and fractions analyzed by means of 15% SDS-PAGE. Protein elution was monitored by absorbance at 280 nm. The elution volumes of standard proteins were used to calculate the K_{av} values [$K_{av} = (\text{elution volume} - \text{column void volume}) / (\text{total column volume} - \text{column void volume})$]. The standard proteins of known molecular weight were carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (43 kDa), conalbumin (75 kDa), ferritin (440 kDa) and lactoglobulin (669 kDa). An identical protocol was used for the purification of SEPT2G. The protein concentration, in all cases, was determined from its absorbance at 280 nm, based on its amino acid composition [46], employing a U-2001 Hitachi UV-visible spectrophotometer.

2.4. Native gel electrophoresis

SEPT2 (20 μ M) and SEPT2G (20 μ M) were centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. Subsequently the samples were subjected to electrophoresis on an 8–25% (w/v) gradient polyacrylamide gel at pH 8.8 using the Phast System (Amersham Bioscience), at 4 °C, and stained following standard protocols. Protein standards of known hydrodynamic radii (thyroglobulin, 8.5 nm; ferritin, 6.1 nm; catalase, 5.22 nm; lactate dehydrogenase, 4.4 nm; and bovine serum albumin, 3.55 nm) were subjected to electrophoresis under identical conditions. The mobilities of the individual bands of the protein standards were plotted as the retardation factors (R_f) versus the Stokes radii (R_h). The linear equation obtained from this calibration was employed to calculate the R_h of SEPT2 and SEPT2G.

2.5. Circular dichroism spectroscopy (CD)

The thermal unfolding of the recombinant proteins, SEPT2 and SEPT2G was monitored by far-UV CD spectroscopy over a wavelength range of 195–250 nm, using a J-715 Jasco spectropolarimeter equipped with a temperature controller. CD spectra were measured from samples in 0.1 cm quartz cuvettes and were the average of 16 accumulations, using a scanning speed of 100 nm min⁻¹, a spectral bandwidth of 1 nm, and a response time of 0.5 s. The protein concentration, in all cases, was approximately 10 μ M in 25 mM Tris–HCl, pH 7.8 buffer containing 10% glycerol. Thermal denaturation measurements were performed by incubating the samples for 30 min at temperatures of 15 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C and 60 °C. CD spectra were obtained on a degree ellipticity scale and the buffer contribution was subtracted in all of the experiments. Data points were analyzed with the software Origin 7.0 and deconvolution of the spectrum was performed using the K2d algorithm (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>).

2.6. Right-angle light scattering

SEPT2 and SEPT2G (5 μ M) in 25 mM Tris–HCl, pH 7.8 buffer containing 10% glycerol were centrifuged ($16,000 \times g$ for 10 min at 4 °C) and each sample placed in a 1 cm path length quartz cuvette in a spectrofluorimeter, model K2 ISS, equipped with a refrigerated circulator. The samples were illuminated with 350 nm light, and the scattering at the same wavelength was collected at an angle of 90°. Measurements were made at 15 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C and 60 °C. All intensity measurements were normalized to values between 0 and 1 (where the latter corresponds to the maximum intensity obtained at 60 °C) after subtraction of the light scattering by the buffer. Data points were analyzed with the software Origin 7.0.

2.7. Thioflavin-T fluorescence assay

Thioflavin T (ThT) is the most commonly used dye for the detection of amyloid aggregates [47,48], and it is speculated that ThT may bind in between the β -sheets of the fibril [49]. Proteins at 5 μ M (in 25 mM Tris–HCl, 10% glycerol, pH 7.8 buffer) were used in this experiment to analyze the ThT binding to SEPT2 and SEPT2G. The proteins were incubated with 80 μ M ThT, excited at 450 nm and the emission measured at 482 nm for a period of 90 min. Measurements were made at 15 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C and 60 °C. All intensity measurements were normalized to values between 0 and 1, after subtraction of the light scattering by the buffer. Data points were analyzed with the software Origin 7.0.

2.8. Electron microscopy

In order to verify the morphology of the SEPT2 aggregates, the sample (5 μ M) was maintained at 37 °C for 30 min in buffer containing 25 mM Tris–HCl, 10% glycerol, pH 7.8. Samples incubated at 4 °C for 5 days were also prepared in order to decrease the rate of amyloid filament formation. Negative staining was performed as follows. Initially samples were applied to glow-discharged carbon-coated grids for 1 min. These were stained with filtered 1% uranyl acetate for 1 min, subsequently washed with a drop of the same buffer and blotted dry. Images were acquired with a transmission electron microscope Philips CM 120 or a JEOL JEM 1230, working at 80 or 100 kV.

3. Results and discussion

3.1. SEPT2 presents regions with high probability of aggregation and/or amyloid formation

It is accepted that two mechanisms appear to control the assembly of amyloid oligomers, one sequence-dependant and the other sequence-independent [50]. Obviously, the sequence-dependant mechanism is more predictable and the programs TANGO and WALTZ are very sensitive for the detection of β -sheet aggregation and amyloidogenic regions, respectively [41,43]. The TANGO results indicated four regions of SEPT2 presenting a high probability of aggregation through β -sheets, all of them within the GTP-binding domain. The sequences identified included those between residues 38 and 43 (FTLMVW), 52 and 59 (TLINSLFL), 118 and 122 (IISYI) and 146 and 153 (VHCCFYFI) (Fig. 1A). Although TANGO aims to predict β -sheet aggregation but not specifically amyloid formation, there is a good correlation between the two [41].

The program WALTZ aims to minimize the over prediction of amorphous β -aggregation compared to the regular cross- β structure characteristic of amyloid fibrils, making it more specific for the latter [51]. WALTZ also identified four regions within SEPT2 which presented a high amyloidogenic potential: the sequences between residues 118 and 123 (IISYID), 147 and 155 (HCCFYFISP), 163 and 168 (LDVAFM), 173 and 178 (NKVNIV) (Fig. 1A). Once again these regions were all restricted to the GTP-binding domain and two of the WALTZ predictions were effectively identical to those identified by TANGO, being highly suggestive that these regions have a tendency towards self-assembly and amyloid formation. The region from 118 to 123 corresponds to a helical region on the surface of the monomer whilst that from 147 to 155 maps to a buried β -strand. They are shown in red and blue in Fig. 1B and C. Furthermore, both of these regions were also identified by the independent algorithm Zyggregator. In both cases considerable structural rearrangement of the monomer would therefore be necessary in order for these particular sequences to become solvent exposed and directly participate in the cross- β spine, eventually leading to aggregation. In order to investigate this further, SEPT2 and SEPT2G were over-expressed for structural analysis.

3.2. SEPT2 and SEPTG are dimers in solution

The definition of the GTP-binding domain for SEPT2 was based on that used in a previous study of the molecular dissection of SEPT4 [52]. DNA amplifications produced fragments of 1083 and 822 bp corresponding to the coding regions of SEPT2 and SEPT2G, respectively. After induction with IPTG, *E. coli* cells harboring the appropriate expression vector produced additional bands of around 44 and 34 kDa corresponding to SEPT2 and SEPT2G, respectively. In both cases, the majority of the expressed product was soluble after cell lysis and final yields were typically 3 and 10 mg of recombinant protein/L of culture medium for SEPT2 and SEPT2G, respectively.

4

J.C. Pissuti Damallo et al. / *Biochimie xxx (2011) 1–9*

Fig. 1. *In silico* sequence analysis of SEPT2 (A). The programs TANGO and WALTZ indicate four regions with a high probability (>60%) of β -sheet aggregation and amyloid formation, respectively. (B) The 3D structure of SEPT2 (2QA5 pdb code) showing the regions predicted by TANGO: 38FTLMVW43 (cyan), 52TLNLSLFL59 (yellow), 118ISYI122 (red), 146VHCFYR153 (blue); (C) SEPT2 showing the regions predicted by WALTZ: 118ISYI123 (red), 147HCCFYR155 (blue), 163LDVAFM168 (purple), 173NKNVIV178 (black). Two effectively identical regions were identified within the GTP-binding domain by both programs. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The recombinant proteins showed GTPase activity (data not shown), as previously reported [18].

Upon SEC, the full length SEPT2 molecule eluted as a single peak of apparent molecular weight of around 91 kDa (Fig. 2, solid line), which is consistent with a dimer, whose expected mass is 88 kDa. This is broadly supported by the results of native gel electrophoresis, which showed a major band migrating below lactate dehydrogenase (140 kDa) (Fig. 3B, lane 2). The hydrodynamic radius calculated for SEPT2 from its R_f value was 4.6 nm, corresponding a molecular weight of approximately 120 kDa, considering a spherical particle. This value is compatible with a dimer or a trimer for SEPT2 in solution under native conditions, but definitive conclusions are limited by the fact that a SEPT2 dimer would not be expected to be a spherical particle.

Fig. 2. Elution profile of SEPT2 and its GTP-binding domain (SEPT2G) on Size Exclusion Chromatography. Both proteins eluted as dimers in solution in the presence of GDP. Excess nucleotide corresponds to the peak observed close to fraction 25. The elution volumes of standard proteins were used to calculate K_{av} values (inset). The main peak position corresponded to about 91 kDa for SEPT2 and 60 kDa for SEPT2G.

SEPT2G eluted as a single peak with an apparent molecular weight of approximately 60 kDa (Fig. 2, dotted line), consistent with a dimer, whose expected mass is 68 kDa. Furthermore, the native gel showed a major band migrating similarly to BSA (67 kDa) (Fig. 3B, lane 3). The hydrodynamic radius of SEPT2G was calculated to be 3.9 nm, corresponding to a molecular weight of 74 kDa, consistent with a dimer under native conditions. The recombinant proteins migrated with the expected molecular mass under denaturing conditions in 15% SDS-PAGE (Fig. 3A). Taken together, these data indicate that both human SEPT2 and SEPT2G are dimeric molecules in solution, agreeing with the structural results obtained for human SEPT2-315, which shows that the dimer is stabilized by interactions across the nucleotide-binding G interface [23].

3.3. At higher temperatures SEPT2 and SEPT2G show a structural transition

Amyloidogenic proteins are rich in β -sheet secondary structure in which the strands lie orthogonal to the fiber axis [53]. Structural transition of buried segments in protein chains into solvent-exposed β -strands is a remarkable characteristic of a number of conformational diseases [41,54–56]. Circular dichroism was therefore used to probe SEPT2 and SEPT2G in order to investigate if the dimeric structure described above is susceptible to such structural transitions. At 15 °C, the far-UV CD of both spectra exhibit two negative minima at 208 nm and 220 nm, which are characteristic of the presence of α -helical secondary structure. The deconvolution of the SEPT2G spectrum led to an estimated content of 25% α -helix, 24% β -strand and 50% turns/irregular structures. This is compatible with the data from the tridimensional structure of SEPT2-315 (2QA5 pdb code, Fig. 1), which gave values of 32% α -helix and 15% β -strand and 53% turns/irregular structures. However, it should be pointed out that the construct used in the crystallographic studies is slightly different from that described here.

On increasing the temperature, marked changes in the secondary structure of SEPT2 took place (Fig. 4A and B). Above 30 °C loss in the α -helical content can be readily observed. This can be followed by the change in the ellipticity at 220 nm, which is the dominant trough characteristic of α -helical structure. This is clearer in SEPT2G, which lacks the C-terminal coiled-coil domain, responsible for a significant percentage of the helical component in

Fig. 3. A) SEPT2 profile on 15% SDS-PAGE. Lane 1: Molecular weight markers; Lane 2: SEPT2; Lane 3: SEPT2G. B) SEPT2 under Native Gel Electrophoresis (8–25%). Lane 1: Molecular weight markers; Lane 2: SEPT2; Lane 3: SEPT2G. The estimated hydrodynamic radii were 4.6 nm for SEPT2 and 3.9 nm for SEPT2G.

the case of SEPT2. At higher temperatures the spectrum acquires characteristics of β -sheet structure, with a minimum between 215 nm and 220 nm, consistent with the results of deconvolution of the spectrum measured at 45 °C, which yielded 15% α -helix, 35% β -strand and 50% turns/irregular structures. Above 60 °C, the spectrum loses overall intensity and the sample begins to precipitate.

3.4. Formation of high order particles in solution

In order to evaluate whether the heat treatment was promoting aggregation of the proteins, right-angle light scattering (RALS)

Fig. 4. Thermal unfolding of SEPT2 and SEPT2G. Circular Dichroism (CD) spectra as a function of temperature were recorded in 25 mM Tris–HCl pH 7.8, 10% Glycerol. In both cases, although no significant change to the CD spectrum could be observed from 15 °C to 30 °C, above this temperature a loss in the characteristic transitions indicating the presence of α -helix can be observed the spectral profile.

measurements were performed. Initially, SEPT2 (Fig. 5A) and SEPT2G (Fig. 5B) were measured at temperatures between 15 °C and 60 °C, and RALS was followed as a function of time. In both cases, the intensity of scattered light remained constant at 15 °C for the entire duration of the experiment, indicating that no protein aggregation was detectable under these conditions. However, in the interval from 30 °C to 60 °C the intensity of light scattering increased over time in a temperature dependent manner, reaching a maximum intensity at 60 °C. This intensity subsequently remained constant over time and there was no evidence of protein precipitation. These data suggest the temperature dependent formation of larger particles in solution. SEPT2 showed a more rapid aggregation than SEPT2G suggesting that the presence of the non-globular N- and C-terminal domains may lead to rapid amorphous aggregation.

3.5. SEPT2 and SEPT2G bind ThT

ThT exhibits enhanced fluorescence upon binding to amyloid fibrils, both *in vivo* and *in vitro* [37] and this was monitored at 482 nm in the case of SEPT2 (Fig. 6A) and SEPT2G (Fig. 6B) on incubation at the same temperatures used to study protein

6

J.C. Pissuti Damalio et al. / *Biochimie xxx (2011) 1–9*

Fig. 5. Right angle light scattering of SEPT2 and SEPT2G as a function of temperature. Scattering intensity at 350 nm was measured as a function of time at each temperature for the two samples. Both proteins show a rapid aggregation at temperatures above 30 °C.

aggregation. The level of ThT fluorescence emission increased up to a maximum value in both cases, and this behavior was temperature dependent. In the case of the measurements made at 45 °C, the plateau could be clearly seen and was reached after approximately 1000 s. This is the temperature at which the structure rich in β -sheet, strongly suggestive of amyloid formation, is observed on thermal unfolding. Indeed, at 37 °C and 45 °C both proteins released the nucleotide, which is normally buried within the GTPase domain (Supplementary material, Figure S1). At higher temperatures (above 45 °C) there is a reduction in the maximum fluorescence intensity reached indicating an increase in the formation of amorphous aggregates rather than amyloid. Such aggregates are expected to be the result of rapid partial unfolding of the protein at higher temperatures and the consequent exposure of hydrophobic regions. These contribute to light scattering but cannot be detected by ThT fluorescence emission. Furthermore, incubation of SEPT2G with DTNB (5,5'-dithiobis,2-nitrobenzoic acid) [57] demonstrated an increase in binding as a function of temperature followed by a sharp decline above 37 °C (data not shown). This is consistent with the initial exposure of the region 147HCCFYFISPI55, (which contains two of the protein's four cysteine residues) followed by its subsequent burial, coherent with the participation of this region in amyloid formation.

Fig. 6. ThT fluorescence emission spectra of SEPT2 and SEPT2G as a function of temperature. Fluorescence emission was monitored at 482 nm after excitation at 450 nm. In both cases, some degree of ThT binding (indicative of amyloid formation) can be observed even at 30 °C. At 45 °C the greatest degree of binding is observed, reaching a maximum after approximately 1000 s. At 60 °C a rapid increase in the fluorescence emission is observed during the first few minutes in the case of SEPT2G which is followed by a reduction in the emission intensity due to the formation of amorphous aggregates.

An interesting difference can be observed between the two constructs studied. SEPT2G shows a sharp rise in ThT fluorescence emission at 60 °C demonstrating the initial rapid formation of amyloid-like structures which subsequently becomes dominated by amorphous aggregation leading to a flattening of the curve. This behavior can be verified by comparing the corresponding curves in Figs. 5 and 6B. SEPT2 aggregation at 60 °C, on the other hand, appears to involve a greater amorphous component right from the outset. These results suggest that the GTP-binding domain is sufficient for the formation of amyloid-like structures as predicted by the results of the sequence analyses with TANGO and WALTZ. The difference in the behavior of the two constructs can be attributed to the presence of the N- and C-terminal domains in the case of SEPT2 which are not predicted to be involved in amyloid formation but could readily contribute to other forms of protein aggregation at higher temperatures.

Ideally, in order to verify the direct participation of the predicted regions in amyloid formation, mutagenesis of these sequences would be necessary. However, an exhaustive study of potential mutations using the CUPSAT algorithm [58] indicated the majority

of these to be destabilizing. Furthermore, given the possible involvement of more than one amyloidogenic region, a series of single and double mutants would be necessary in order to properly test this hypothesis. Unfortunately, these limitations would lead to considerable ambiguity when interpreting the outcome.

3.6. Amyloid like filaments are visualized by electron microscopy

To evaluate the formation of amyloid-like fibers, SEPT2 was incubated at 37 °C for 30 min (Fig. 7A). At this temperature, chosen to be below that at which SEPT2 rapidly binds ThT, the samples have the ability to form amyloid-like aggregates similar to those observed for SEPT4 [27]. It was also observed the presence of amorphous aggregates, probably due to the time and temperature that the sample was incubated. In an attempt to decrease the velocity of this process even further, SEPT2 was incubated at 4 °C for 120 h. Under these conditions we observed a small number of well-defined filaments of 20 nm in diameter and lengths of up to several micrometers (Fig. 7B). At this lower temperature the sample still bound ThT, but at a much reduced rate (in 90 min there is no detection of ThT binding), compared with 45 °C (Supplementary material, Figure S2). This strongly suggests that filament formation can occur over a wide range of temperatures but is accelerated on heating.

An overall picture emerges in which the natural tendency of the GTP-binding domain of SEPT2 to form amyloid-like aggregates is exacerbated at temperatures, which favor the partial unfolding of the protein and the appearance of β -structure. The latter may be new structures, for example the conversion of an α -helix into a β -strand, or alternatively the exposure of buried strands upon

partial unfolding. These will tend to aggregate to form the cross- β spine described for other systems [27,37–40,53,59]. Similar observations have been reported for SEPT4, suggesting that a similar phenomenon may be at work [27,60]. The results of a WALTZ analysis of all 13 human septins revealed at least one amyloidogenic region within each GTP-binding domain suggesting this to be a general characteristic of the septin family members. Furthermore, one of the two coincident regions given for SEPT2 by both TANGO and WALTZ (that corresponding to the region around residue 150) was also predicted to be amyloidogenic in all 13 human septins. This may indicate a general tendency for all family members to aggregate and it may be worthwhile investigating the possible involvement of different septins in other amyloidogenic conditions. Since this region corresponds to a buried β -strand, significant structural rearrangement would be necessary for it to become directly involved in the formation of the cross- β spine.

Given the physiological role of septins in filament formation, knowledge on their ability to form amyloids is important as it is fundamental to be able to distinguish between these two types of assemblies. Reports of homo-filaments in the literature are scarce [18,25] and their physiological relevance requires further investigation. Interestingly, the diameters of some of the fibers described here for SEPT2 are similar to those previously reported for SEPT4 [27].

4. Conclusions

Septins have been associated with certain neurodegenerative disorders. In particular, SEPT2 has been found to be associated with neurofibrillary tangles and other pathological features of senile plaques in Alzheimer's disease. Since the significance of this finding is unclear, it is important to gain a better understanding of the intrinsic aggregation properties of SEPT2.

In silico prediction programs indicated that the GTP-binding domain of SEPT2 contains regions with a high probability of involvement in aggregation and amyloid formation. This was borne out by experimental data from CD measurements which show a relative loss of α -helical content and a gain in β -sheet structure at around 45 °C, coincident with the tendency to bind the amyloid-specific dye ThT. Although it is not rare for globular proteins to be induced to form amyloid structures *in vitro* under harsh conditions (such as low pHs or high salt concentrations), in the case of SEPT2 and SEPT2G this occurs under near physiological conditions, suggesting that their tendency toward amyloid formation may be relevant to the pathological conditions in which they have been implicated, including Alzheimer's disease.

In summary, these studies should provide a useful basis for future biophysical studies of septin aggregation mechanisms and their role in nervous system disorders. Further studies will be necessary to address whether Septin 2 participates in the development of neurodegenerative diseases or its amyloidosis is a consequence of the underlying pathological processes.

Acknowledgments

We wish to thank Andressa Alves Pinto and Derminda I. de Moraes for technical support. This research was supported by FAPESP via a grant to the Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biochi.2011.09.014.

Fig. 7. Electron microscopy. Negatively-stained electron micrograph of SEPT2 fibrils after incubation at: (A) 37 °C for 30 min and (B) 120 h at 4 °C. A scale bar is indicated in each image. The filaments observed in (B) present diameters of 20 nm and lengths up to several micrometers.

References

- [1] L.H. Hartwell, Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis, *Exp. Cell Res.* 69 (1971) 265–276.
- [2] M. Kinoshita, The septins, *Genome Biol.* 4 (2003) 236.
- [3] M.C. Surka, C.W. Tsang, W.S. Trimble, The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 3532–3545.
- [4] K. Nagata, A. Kawajiri, S. Matsui, M. Takagishi, T. Shiromizu, N. Saitoh, I. Izawa, T. Kiyono, T.J. Itoh, H. Hotani, M. Inagaki, Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18538–18543.
- [5] S.C. Hsu, C.D. Hazuka, R. Roth, D.J. Foletti, J. Heuser, R.H. Scheller, Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments, *Neuron* 20 (1998) 1111–1122.
- [6] E.T. Spiliotis, M. Kinoshita, W.J. Nelson, A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation, *Science* 307 (2005) 1781–1785.
- [7] M. Kinoshita, S. Kumar, A. Mizoguchi, C. Ide, A. Kinoshita, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, M. Noda, Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures, *Gene Dev.* 11 (1997) 1535–1547.
- [8] C.L. Beites, H. Xie, R. Bowser, W.S. Trimble, The septin CDREL-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 434–439.
- [9] S. Larisch, Y.S. Yi, R. Lotan, H. Kerner, S. Eimerl, W.T. Parks, Y. Gottfried, S.B. Refey, M.P. de Caestecker, D. Danielpour, N. Book-Melamed, R. Timberg, C.S. Duckett, R.J. Lechleider, H. Steller, J. Orly, S.J. Kim, A.B. Roberts, A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 915–921.
- [10] B.E. Kremer, L.A. Adang, L.G. Macara, Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7, *Cell* 130 (2007) 837–850.
- [11] M. Ihara, A. Kinoshita, S. Yamada, H. Tanaka, A. Tanigaki, A. Kitano, M. Goto, K. Okubo, H. Nishiyama, O. Ogawa, C. Takahashi, O. Ogawa, C. Takahashi, S. Itohara, Y. Nishimune, M. Noda, M. Kinoshita, Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa, *Dev. Cell* 8 (2005) 343–352.
- [12] J.D. Steels, M.R. Estey, C.D. Froese, D. Reynaud, C. Pace-Asciak, W.S. Trimble, Septin2 is a component of the mammalian sperm tail annulus, *Cell Motil. Cytoskel.* 64 (2007) 794–807.
- [13] H. Kissel, M.M. Georgescu, S. Larisch, K. Manova, G.R. Hunnicutt, H. Steller, The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice, *Dev. Cell* 8 (2005) 353–364.
- [14] B. Kartmann, D. Roth, Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 839–844.
- [15] J. Zhang, C. Kong, H. Xie, P.S. McPherson, S. Grinstein, W.S. Trimble, Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP, *Curr. Biol.* 9 (1999) 1458–1467.
- [16] M. Kinoshita, Assembly of mammalian septins, *J. Biochem.* 134 (2003) 491–496.
- [17] S. Hillebrand, W. Garcia, M.D. Cantu, A.P.U. de Araujo, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, E. Carrilho, In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 92–97.
- [18] Y.W. Huang, M.C. Surka, D. Reynaud, C. Pace-Asciak, W.S. Trimble, GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2, *FEBS J.* 273 (2006) 3248–3260.
- [19] C.M. Field, O. Al-Awar, J. Rosenblatt, M.L. Wong, B. Alberts, T.J. Mitchison, A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity, *J. Cell Biol.* 133 (1996) 605–616.
- [20] J.A. Frazier, M.L. Wong, M.S. Longtine, J.R. Pringle, M. Mann, T.J. Mitchison, C. Field, Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 737–749.
- [21] C.M. John, R.K. Hite, C.S. Weirich, D.J. Fitzgerald, H. Jawhari, M. Faty, D. Schlapper, R. Kroschewski, F.K. Winkler, T. Walz, Y. Barral, M.O. Steinmetz, The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar, *EMBO J.* 26 (2007) 3296–3307.
- [22] A. Bertin, M.A. McMurray, P. Grob, S.S. Park, G. Garcia, I. Patanwala, H.L. Ng, T. Alber, J. Thorne, E. Nogales, *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 8274–8279.
- [23] M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kuhlmann, I.G. Macara, M. Weyand, H. Stark, A. Wittinghofer, Structural insight into filament formation by mammalian septins, *Nature* 449 (2007) 311–315.
- [24] M. Nakahira, J.N.A. Macedo, T.V. Seraphim, N. Cavalcante, T.A.C.B. Souza, J.C.P. Damalio, L.F. Reyes, E.M. Assmann, M.R. Alborghetti, R.C. Garratt, A.P.U. Araujo, N.I.T. Zanchin, J.A.R.G. Barbosa, J. Kobarg, A draft of the human septin interactome, *Plos One* 5 (2010) e0013799.
- [25] M. Mendoza, A.A. Hyman, M. Glotzer, GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin, *Curr. Biol.* 12 (2002) 1858–1863.
- [26] A.M. Vrabioiu, S.A. Gerber, S.P. Gygi, C.M. Field, T.J. Mitchison, The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3111–3118.
- [27] W. Garcia, A.P.U. de Araujo, F. Lara, D. Foguel, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro, *Biochemistry-US* 46 (2007) 11101–11109.
- [28] N. Kinoshita, K. Kimura, N. Matsumoto, M. Watanabe, M. Fukaya, C. Ide, Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes, *Genes Cells* 9 (2004) 1–14.
- [29] N. Cerveira, C. Correia, S. Bizarro, C. Pinto, S. Lisboa, J.M. Mariz, M. Marques, M.R. Teixeira, SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2; 11)(q37; q23), *Oncogene* 25 (2006) 6147–6152.
- [30] R.A. Craven, S. Hanrahan, N. Totty, P. Harnden, A.J. Stanley, E.R. Maher, A.L. Harris, W.S. Trimble, P.J. Selby, R.E. Banks, Proteomic identification of a role for the von Hippel Lindau tumour suppressor in changes in the expression of mitochondrial proteins and septin 2 in renal cell carcinoma, *Proteomics* 6 (2006) 3880–3893.
- [31] K. Sakai, M. Kurimoto, A. Tsugu, S.L. Hubbard, W.S. Trimble, J.T. Rutka, Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors, *J. Neuro-Oncol.* 57 (2002) 169–177.
- [32] A.A. Khalil, P. James, Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling, *Cancer Sci.* 98 (2007) 201–213.
- [33] P. Margutti, M. Sorice, F. Conti, F. Delunardo, M. Racaniello, C. Alessandri, A. Siracusano, R. Rigano, E. Profumo, G. Valesini, E. Ortona, Screening of an endothelial cDNA library identifies the C-terminal region of Nedd5 as a novel autoantigen in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) R896–R903.
- [34] A. Kinoshita, M. Kinoshita, H. Akiyama, H. Tomimoto, I. Akiyuchi, S. Kumar, M. Noda, J. Kimura, Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1551–1560.
- [35] D.J. Selkoe, Folding proteins in fatal ways, *Nature* 426 (2003) 900–904.
- [36] P. Westermark, M.D. Benson, J.N. Buxbaum, A.S. Cohen, B. Frangione, S.I. Ikeda, C.L. Masters, G. Merlini, M.J. Saraiva, J.D. Sipe, Amyloid: toward terminology clarification – report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis, *Amyloid* 12 (2005) 1–4.
- [37] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333–366.
- [38] F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano, Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16 (2006) 118–126.
- [39] C.M. Dobson, Principles of protein folding, misfolding and aggregation, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 3–16.
- [40] F. Chiti, C.M. Dobson, Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 15–22.
- [41] A.M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano, Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1302–1306.
- [42] R. Giraldo, Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 17388–17393.
- [43] S. Maurer-Stroh, M. Debulpaep, N. Kuemmerer, M.L. de la Paz, I.C. Martins, J. Reumers, K.L. Morris, A. Copland, L. Serpell, L. Serrano, J.W.H. Schymkowitz, F. Rousseau, Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices, *Nat. Methods* 7 (2010) 237–U109.
- [44] G.G. Tartaglia, M. Vendruscolo, The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1395–1401.
- [45] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- [46] S.C. Gill, P.H. Vonnippel, Calculation of protein Extinction Coefficients from amino-acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [47] H. LeVine 3rd, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [48] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 244–249.
- [49] L.A. Munishkina, A.L. Fink, Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins, *Bba-Biomembranes* 1768 (2007) 1862–1885.
- [50] M. Lindgren, P. Hammarstrom, Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states, *FEBS J.* 277 (2010) 1380–1388.
- [51] J. Reumers, L. Conde, I. Medina, S. Maurer-Stroh, J. Van Durne, J. Dopazo, F. Rousseau, J. Schymkowitz, Joint annotation of coding and non-coding single nucleotide polymorphisms and mutations in the SNPeffect and PupaSuite databases, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D825–D829.
- [52] W. Garcia, A.P.U. de Araujo, M.D. Neto, M.R.M. Ballesterio, I. Polikarpov, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4, *Biochemistry-US* 45 (2006) 13918–13931.
- [53] R. Nelson, D. Eisenberg, Structural models of amyloid-like fibrils, *Adv. Protein Chem.* 73 (2006) 235–282.
- [54] A.P. Pawar, K.F. Dubay, J. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, Prediction of “aggregation-prone” and “aggregation-susceptible” regions in proteins associated with neurodegenerative diseases, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 379–392.
- [55] R. Lindberg, J. Schymkowitz, F. Rousseau, F. Diella, L. Serrano, A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins, *J. Mol. Biol.* 342 (2004) 345–353.
- [56] Y. Kallberg, M. Gustafsson, B. Persson, J. Thyberg, J. Johansson, Prediction of amyloid fibril-forming proteins, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12945–12950.
- [57] G.L. Ellman, A colorimetric method for determining low concentrations of Mercaptans, *Arch. Biochem. Biophys.* 74 (1958) 443–450.
- [58] D. Schomburg, V. Parthiban, M.M. Gromiha, CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) W239–W242.
- [59] J.S. Elam, A.B. Taylor, R. Strange, S. Antonyuk, P.A. Doucette, J.A. Rodriguez, S.S. Hasnain, L.J. Hayward, J.S. Valentine, T.O. Yeates, P.J. Hart, Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 461–467.
- [60] W. Garcia, N.C. Rodrigues, M.D. Neto, A.P.U. de Araujo, I. Polikarpov, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, The stability and aggregation properties of the GTPase domain from human SEPT4, *Bba-Proteins Proteom.* 1784 (2008) 1720–1727.

Cell Biochem Biophys
DOI 10.1007/s12013-011-9307-0

ORIGINAL PAPER

Septin C-Terminal Domain Interactions: Implications for Filament Stability and Assembly

Ivo de Almeida Marques · Napoleão Fonseca Valadares · Wanius Garcia ·
Julio Cesar Pissuti Damalio · Joci Neuby Alves Macedo · Ana Paula Ulian de Araújo ·
Carlos Alfonso Botello · José Manuel Andreu · Richard Charles Garratt

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Septins form a conserved family of filament forming GTP binding proteins found in a wide range of eukaryotic cells. They share a common structural architecture consisting of an N-terminal domain, a central GTP binding domain and a C-terminal domain, which is often predicted to adopt a coiled-coil conformation, at least in part. The crystal structure of the human SEPT2/SEPT6/SEPT7 heterocomplex has revealed the importance of the GTP binding domain in filament formation, but surprisingly no electron density was observed for the C-terminal domains and their function remains obscure. The dearth of structural information concerning the C-terminal region

has motivated the present study in which the putative C-terminal domains of human SEPT2, SEPT6 and SEPT7 were expressed in *E. coli* and purified to homogeneity. The thermal stability and secondary structure content of the domains were studied by circular dichroism spectroscopy, and homo- and hetero-interactions were investigated by size exclusion chromatography, chemical cross-linking, analytical ultracentrifugation and surface plasmon resonance. Our results show that SEPT6-C and SEPT7-C are able to form both homo- and heterodimers with a high α -helical content in solution. The heterodimer is elongated and considerably more stable than the homodimers, with a K_D of 15.8 nM. On the other hand, the homodimer SEPT2-C has a much lower affinity, with a K_D of 4 μ M, and a moderate α -helical content. Our findings present the first direct experimental evidence toward better understanding the biophysical properties and coiled-coil pairings of such domains and their potential role in filament assembly and stability.

Ivo de Almeida Marques and Napoleão Fonseca Valadares contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12013-011-9307-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. de Almeida Marques · N. F. Valadares ·
J. C. P. Damalio · J. N. A. Macedo · A. P. U. de Araújo ·
R. C. Garratt (✉)
Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador
são-carlense 400, São Carlos, SP 13560-970, Brazil
e-mail: richard@ifsc.usp.br

W. Garcia
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal
do ABC, Rua Santa Adélia 166, Santo André, SP 09210-170,
Brazil

C. A. Botello · J. M. Andreu
Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu, 9,
28040 Madrid, Spain

Keywords Human septin complex · Coiled-coil ·
Homo- and hetero-interactions · Linear hexameric
complex · Thermal unfolding · SPR

Abbreviations

SPR	Surface plasmon resonance
NTA	Nitrilotriacetate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
EGS	Ethylene glycol-bis
SDS/PAGE	Sodium dodecylsulfate/polyacrylamide gel electrophoresis
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
NHS	N-hydroxysuccinimide
SEC	Size exclusion chromatography

Published online: 15 October 2011

Springer

Introduction

Septins are cytoskeletal proteins that were first discovered in *Saccharomyces cerevisiae* due to their role in cytokinesis [1]. To date, members of the septin family have been identified in a wide range of eukaryotes [2, 3], and in mammals, it is well established that they exert several different roles, being involved in cytokinesis, vesicle trafficking, membrane dynamics, chromosome segregation and T-cell motility [4–9]. Moreover, recent findings implicate septins in severe pathological conditions, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, mammalian cell invasion by bacteria and tumor metastasis and progression, among others [4, 8–13].

The 14 human septins described to date generally possess an N-terminal domain, a central GTP binding domain and a C-terminal domain, although the former and the latter may be rather small or nonexistent in some cases [4, 14, 15]. They can be divided into four groups based on sequence similarity, and it has been suggested that members of these groups can associate to form different, possibly redundant, complexes [2, 9, 15, 16]. Indeed, septins are known to associate as homodimers and as hetero-oligomers, assembling into so-called septin filaments [5, 17, 18]. Different septin complexes have been isolated in vivo [19–21], although the structural determinants of the rules that dictate the assembly of septins into higher oligomeric states are still poorly understood [9, 15].

The X-ray structure of the human SEPT2/SEPT6/SEPT7 complex presents an invaluable contribution to the field [18]. The crystal structure shows a linear hexameric complex presenting the following arrangement: SEPT 7/6/2/2/6/7. The hexamer is 5 nm wide and 25 nm long and may polymerize to form a continuous nonpolar filament. In this filament, each septin interacts with its two neighboring septins via a G interface and an NC interface. Both the SEPT2–SEPT6 and SEPT7–SEPT7 interactions form G interfaces while the SEPT2–SEPT2 and SEPT6–SEPT7 interactions take place through NC interfaces. These are so named because the G interface involves the GTP binding site of the GTP binding domain while the NC interface involves the N- and C-terminal regions of this same domain. Intriguingly, crystal structures of different SEPT2 constructs alone, lacking the C-terminal domain, also interact through both interfaces in order to form filaments, strengthening the hypothesis that septins may be capable of interacting in a promiscuous way ([18], see also pdb code 2QNR). Furthermore, it has been suggested that septins within a given group are substitutable, giving rise to a large number of potential filaments many of which may be tissue specific [15].

The SEPT2/SEPT6/SEPT7 complex structure also shows SEPT2 and SEPT7 bound to GDP, while SEPT6 is

bound to GTP. GTP binding and hydrolysis have been experimentally demonstrated for several septins in vitro [17, 19, 22, 23], and it has been proposed that one of the main roles of nucleotide binding is to propitiate the assembly of hetero-oligomeric septin complexes [24]. Recent structural data show that nucleotide binding produces conformational changes in the GTPase domain and suggests that the nature of the nucleotide may control septin filament assembly [25].

One question that the structure of the SEPT2/6/7 complex sheds little light upon is the role of the coiled-coil regions within the C-terminal domains, which are completely disordered within the crystal lattice [18]. Coiled-coils are formed by two or more amphipathic α -helices that classically present a heptad repeat pattern (*abcdefg*) characterized by hydrophobic residues at positions *a* and *d*. These are often interspersed by charged residues at positions *e* and *g*, giving extra stability to the coiled-coil [26]. Computer-based prediction of coiled-coil motifs are frequently successful because of the characteristic pattern of the heptads repeats [27], and the C-terminal domains of many septins, including SEPT2, SEPT6 and SEPT7, present a region predicted to adopt such a conformation [4, 14, 15]. Despite the absence of electron density for the C-terminal domains in the crystal structure, the proximity of these regions at the SEPT6–SEPT7 and SEPT2–SEPT2 NC interfaces suggests that the domains would be expected to pair up accordingly via dimeric coiled-coils. These would be expected to aid in stabilizing the complex and/or to play a role in determining preferential interactions between different septins. Indeed, in solution the GTP binding domain of SEPT2, when expressed in isolation, utilizes the G interface for dimerization rather than the native NC interface observed in the SEPT2/6/7 complex. This suggests that the presence of the C-terminal domain may play a role in building the appropriate interactions necessary for physiologically relevant filament formation.

Although the existence of a coiled-coil within the C-terminal domain and its involvement in septin–septin interactions have been reported [19, 28–30], the precise role of these domains in oligomerization and filament assembly is still poorly understood. Indeed, the detailed structure of this domain has been largely ignored up until now. Filament and paired filament assemblies involving the C-termini have been proposed [31], although a mechanism detailing how individual septins are recruited into the filament is yet to be proposed and experimentally verified.

In the present work, the C-terminal region of human SEPT2 (SEPT2-C), SEPT6 (SEPT6-C) and SEPT7 (SEPT7-C) were subcloned, expressed in *E. coli* and purified to homogeneity. The secondary structure content and the thermal stability of homo and hetero coiled-coils were studied by circular dichroism spectroscopy (CD), and

these interactions were further characterized by size exclusion chromatography and chemical cross-linking. Analytical ultracentrifugation showed that the heterodimer SEPT6-C/SEPT7-C was the main species present in solution under our experimental conditions (more than 90% of total material) and that the shape of the heterodimer was elongated. Surface plasmon resonance (SPR) studies revealed these species to interact to form a specific high-affinity complex, providing direct experimental evidence for some of the conjectures raised by the crystal structure.

Experimental Procedures

Materials

The bacterial expression vector pET28a(+), thrombin protease, benzamidine Sepharose column, the Superdex-75, Mono S HR, and nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resins, research grade CM5 and NTA sensor chips, coupling reagents (EDC, NHS and ethanolamine HCl), 50 mM NaOH, 10 mM sodium acetate buffer and HBS-P buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.005% P20, pH 7.4) were purchased from GE Healthcare. Restriction endonucleases, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and T4 DNA ligase were obtained from Invitrogen, Inc. Ethylene Glycol-Bis (EGS) and protein standards used as tricine sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (tricine/SDS–PAGE) markers were purchased from Sigma–Aldrich. All other chemicals were of analytical grade.

Plasmid Construction

Recombinant DNA techniques were performed using conventional protocols. cDNA corresponding to the C-terminal domains of human SEPT2, SEPT6 and SEPT7 were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using an Eppendorf Mastercycler gradient thermal cycler, using full SEPT2, SEPT6 and SEPT7 as a DNA template. The DNA encoding the SEPT2 C-terminal domain, residues 308–361 (SEPT2-C), SEPT6 C-terminal domain, residues 307–434 (SEPT6-C) and SEPT7 C-terminal domain, residues 299–418 (SEPT7-C) were amplified, producing three fragments of 180, 380 and 380 bp, respectively. In all cases, the amplification products and the expression vector pET28a(+) were digested and used to transform *E. coli* DH5 α after ligation with T4 DNA ligase. For SEPT2-C and SEPT7-C restriction sites for *Nde* I and *Bam* HI were used, while for SEPT6-C sites for *Nhe* I and *Not* I were employed. For SEPT2-C and SEPT6-C, an extra codon to add a tryptophan to the beginning of the domain was introduced in order to make them visible by UV absorption spectroscopy. The new vector constructs were

named pET-SEPT2-C, pET-SEPT6-C and pET-SEPT7-C and produced the target proteins in fusion with a His-tag. Transformants were confirmed by PCR and restriction analysis. All plasmids were sequenced by the dideoxy chain termination method [32] using an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin–Elmer) following the protocol of the manufacturer.

Protein Expression and Purification

The expression plasmids carrying the SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C gene fragments were used to transform *E. coli* strain BL21 (DE3) competent cells. A total of 5 mL of an overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) harboring the pET-SEPT2-C, pET-SEPT6-C or pET-SEPT7-C plasmid was inoculated into 500 mL of fresh LB medium containing kanamycin (50 μ g/mL). The culture was agitated at 37°C until reaching an optical density of between 0.5 and 0.6 at $\lambda = 600$ nm, prior to incubation with agitation, at 18°C for 30 min. Subsequently, IPTG was added to a final concentration of 0.4 mM and the cultures incubated overnight at 18°C. After centrifugation, the pelleted cells were resuspended in buffer A (20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 1 M NaCl) and disrupted by sonication. The suspension was then centrifuged at 20,000 $\times g$ for 30 min at 4°C, and both the pellet and supernatant were analyzed on tricine/SDS–PAGE to check the solubility of the recombinant fusion protein. The supernatant, containing the recombinant SEPT2-C, SEPT6-C or SEPT7-C domains, was applied to a nickel affinity column equilibrated with buffer A and the resin extensively washed with the same buffer containing increasing concentrations of imidazole (0–60 mM). After the unbound proteins were washed out, the recombinant proteins were eluted from the column in the presence of 300 mM imidazole in the following buffers; SEPT6-C in buffer A, SEPT2-C in buffer B (20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 50 mM NaCl) and SEPT7-C in buffer C (20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 200 mM NaCl). After elution, it was found to be sufficient to dialyze the solutions containing SEPT2-C and SEPT6-C in order to remove the excess imidazole, while in the case of SEPT7-C further purification was necessary on a Mono S HR column. The ion exchange column was washed and the protein loaded in buffer C and then subsequently eluted in buffer A. The recombinant fusion proteins were cleaved overnight with thrombin (20 U/mg), at 4°C. Subsequently, they were applied firstly to the nickel affinity column (Ni-NTA), in the presence of 30 mM imidazole, and secondly to a benzamidine Sepharose column, in order to remove the His-tag and thrombin, respectively. Finally, the solutions were dialyzed into buffer B and the purified recombinant products analyzed by 16% tricine/SDS–PAGE. The final products were then frozen and stored at –80°C, and melted on ice before use.

Protein Concentration

The concentrations of the recombinant proteins were determined by UV absorbance at $\lambda = 280$ nm using a U-2001 spectrophotometer (Hitachi) and employing a theoretical extinction coefficient based on the amino acid composition [33]. The theoretical extinction coefficients employed were $\epsilon_{280} = 5,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for SEPT2-C and $\epsilon_{280} = 6,990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for SEPT6-C and SEPT7-C.

Chemical Cross-Linking

Chemical cross-linking was used to verify the oligomeric state of SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C, as well as a mixture of SEPT6-C and SEPT7-C, by incubating the protein in buffer B in the presence of 2 mM EGS for SEPT2-C and 0.5 mM for the remainder, in a final reaction volume of 40 μL at room temperature for 30 min. The final protein concentration was 10 μM for SEPT6-C and SEPT7-C. For SEPT2-C, the protein concentrations used were 25 and 100 μM . The reactions were quenched by addition of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and subsequently analyzed by 16% tricine/SDS-PAGE.

Size Exclusion Chromatography (SEC)

Size exclusion chromatography was performed on an ÄKTA HPLC system, using a Superdex-75 analytical size exclusion column equilibrated with buffer B. The samples were injected and the relative elution volume was compared to that of molecular mass standards. A protein concentration of 10 μM was employed in all cases with the exception of the SEPT6-C/SEPT7-C complex for which 5 μM was used. The relative elution volume was calculated as $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_e - V_c)$, where V_e is elution volume, V_0 is the void volume and V_c is the geometric column volume. A calibration curve was plotted of K_{av} versus $\log(\text{MW})$ and the molecular weights of the constructs estimated from this curve.

CD Spectroscopy

CD spectra were measured using a Jasco J-815 spectropolarimeter equipped with a temperature control. All data were collected using 1-mm path length quartz cuvettes, and the spectra were recorded over a wavelength range from 195 to 250 nm and were determined as an average of 4 accumulations, using a scanning speed of 20 nm min^{-1} , a spectral bandwidth of 1 nm and a response time of 0.5 s. CD spectra were obtained on a degree ellipticity scale. For SEPT6-C and SEPT7-C, the protein concentration used was 10 μM and in the case of SEPT2-C, 25 μM . The CD measurements were performed on buffer B, and the buffer

contribution was subtracted in all of the experiments, which were carried out in triplicate. All spectra were smoothed by Fourier filtering using the FFT option of Origin 7.0 prior to subsequent analysis. To obtain structural information, the CD data were analyzed by three alternative programs, SELCON3, CONTIN and CDS, using different databases [14, 34].

Thermal Stability

The thermal denaturation of SEPT2-C, SEPT6-C, SEPT7-C and the SEPT6-C/SEPT7-C complex was characterized by measuring the ellipticity changes at 222 nm induced by heating the sample from 4 to 90°C at a rate of 10°C/h. For SEPT6-C, SEPT7-C and the SEPT6-C/SEPT7-C complex, the protein concentration used was 10 μM . In the case of SEPT2-C, the protein concentration used was 25 μM . To assess whether the thermal denaturation process is reversible or not, samples were also monitored while cooling over the same temperature range and at the same rate.

The ellipticity data obtained from the study of thermal denaturation were analyzed assuming this to be a reversible transition. The fraction of denatured protein (f_d) is calculated from the following relationship:

$$f_d = \frac{(\theta_n - \theta_{\text{obs}})}{(\theta_n - \theta_d)} \text{ and } f_d + f_n = 1 \quad (1)$$

in which θ_{obs} is the ellipticity at 222 nm obtained at a particular temperature, θ_d and θ_n are the corresponding values of the characteristic ellipticities of the denatured and native states, respectively, and f_n is the fraction of protein in the native state. All experiments were carried out in triplicate.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

All measurements were performed at 15°C with a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$ on a Biacore X[®] instrument (Biacore AB, Uppsala, Sweden), and all samples were diluted in running buffer (10 mM HEPES, 300 mM sodium chloride, 50 μM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH = 7.4) by serial dilution. Buffers were filtered and degassed before use.

The SPR experimental setup and the amino coupling procedures were performed as previously described [35]. The His-tagged protein surfaces were prepared using standard His-tag capture procedures. Briefly, the NTA sensor chip was primed and a 1-min injection of a solution containing 500 μM NiCl_2 dissolved in running buffer was used to load the chip with nickel followed by a wash procedure. The capture of the His-tagged SEPT6-C or SEPT7-C was achieved by a 15- μL injection of a 100 nM solution of the desired septin C-terminal domain over flow cell 2 only. This procedure yields a stable surface, as

shown by the flat baseline at the beginning of each sensorgram. Finally, the binding data were obtained by the injection of SEPT6-C or SEPT7-C without His-tag over the chip surface. After each measurement cycle, the surface was fully regenerated by a 30 s injection of a solution containing 0.35 M EDTA dissolved in running buffer followed by a wash procedure.

In order to correct the data for bulk refractive index changes, the reference surface responses were subtracted from the responses of the active surface with the immobilized septin C-terminus. All kinetic data were also submitted to double referencing [36], a process in which the response from a blank injection is subtracted from all binding curves, correcting the data by removing artifacts that may systematically occur in every injection. All kinetic data were analyzed by global fitting of at least six different sensorgrams including duplicates, using the BIAevaluation software 4.1, and employing the simple 1:1 Langmuir model.

Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium Measurements

All experiments were carried out using an Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA) equipped with a UV-visible absorbance detector system. A Ti50 eight-hole rotor and standard (12-mm optical path) double sector centerpieces of Epon-charcoal were used. The buffer for the measurements was 20 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl at pH 7.4. In sedimentation velocity experiments, 14, 28, 75 and 150 μ M SEPT2-C and 8.5, 10, 20 and 35 μ M SEPT6-C/SEPT7-C complex samples were centrifuged at 48 Krpm at 20°C. SEPT2-C and SEPT6-C/SEPT7-C sedimentation coefficient distributions were determined by direct linear least-squares boundary fitting of the sedimentation velocity profiles using the software SEDFIT [37]. For the correction of *S* values to standard conditions (20°C and water), the software SEDNTERP (retrieved from the RASMB server [38]) was used. The same software was used to estimate the partial specific volume of SEPT2-C and the SEPT6-C/SEPT7-C complex from their amino acid sequences, and the buffer viscosity and density at different temperatures. The friction coefficient ratio, f/f_0 (where f and f_0 stand, respectively, for the experimental friction coefficient and the minimum friction coefficient assuming a spherical shape for the protein) was also calculated with the SEDNTERP program for different association state models.

Sedimentation equilibrium experiments were performed with 85 μ L of 9, 36 and 181 μ M SEPT2-C and 85 μ L of 1.5, 14 and 53 μ M SEPT6/7-C at 17, 23, 32 Krpm and 20°C. After the equilibrium scans, a high-speed centrifugation run

(48 Krpm) was performed to estimate the corresponding baseline offsets. Sample average weight-average buoyant molecular masses of the samples were calculated by fitting a single species model to the experimental data using the Hetero-Analysis program [39]. Conservation of total absorbance in the cell was checked in all of the experiments. The corresponding molecular masses were determined from the experimental protein buoyant values using 0.715, 0.729 and 0.726 mL/g, as the partial specific volume of SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C, respectively (partial specific volumes were calculated from their corresponding amino acid compositions using the SEDNTERP program). The dependence of SEPT2-C molecular mass on protein concentration was modeled by a monomer/*n*-mer association scheme using the Hetero-Analysis program [39].

Results

DNA amplification produced 180-, 380- and 380-bp fragments, corresponding to the C-terminal regions of SEPT2, SEPT6 and SEPT7, respectively. The expression vectors containing these fragments were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells, which expressed SEPT2-C, SEPT6-C or SEPT7-C, with a His-tag, after IPTG induction. Additional bands on tricine/SDS-PAGE corresponding to each construct were observed in the crude bacterial lysates, consistent with that expected for the recombinant proteins (data not shown). In all cases, the majority of the protein was found in the soluble fraction after lysis, and for SEPT2-C and SEPT6-C was readily isolated by nickel affinity chromatography, while for SEPT7-C a second step using ion exchange chromatography was needed.

It is worth noting that attempts to obtain SEPT6-C or SEPT7-C at concentrations above 20 μ M resulted in protein precipitation at low salt concentrations. On the other hand, an equimolar mixture of SEPT6-C and SEPT7-C can be prepared at low salt concentration (50 mM NaCl) and concentrated up to 500 μ M with no signs of precipitation. This is the first evidence that SEPT6-C and SEPT7-C may interact directly. Upon 16% tricine/SDS-PAGE under denaturing conditions, the final purified SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C migrated as largely homogeneous bands with molecular weight of 6.7, 15 and 15 kDa, respectively, consistent with that expected for monomers (Fig. 1).

The apparent molecular weights of SEPT2-C, SEPT6-C, SEPT7-C and SEPT6-C/SEPT7-C in solution as determined by gel filtration were estimated to be 16, 56, 51 and 59 kDa, respectively. These results are compatible with the formation of oligomers in solution, as might be expected due to the presence of the coiled-coil. Given that such oligomers may differ greatly from a globular structure, it is difficult to accurately assess their nature directly from size

Fig. 1 Size exclusion chromatography and Coomassie-stained gel electrophoresis under denaturing conditions (16% tricine/SDS-PAGE). **a** Size exclusion chromatography on Superdex-75 of purified SEPT2-C (10 μ M), SEPT6-C (10 μ M) and SEPT7-C (10 μ M) as well as a mixture of the latter two, SEPT6-C/SEPT7-C (5 μ M). The calibration curve is given in the inset. **b** Coomassie-stained gel showing SEPT6-C, SEPT7-C and SEPT6-C/SEPT7-C after purification. Lane 1 molecular-weight standards. Lanes 2, 4 and 6: SEPT6-C, SEPT7-C and SEPT6-C/SEPT7-C after final purification. Only a

single strong band is present in each lane, indicating the purity of the samples. Lanes 3, 5 and 7: SEPT6-C, SEPT7-C and SEPT6-C/SEPT7-C at a concentration of 10 μ M, in the presence of EGS. Lane 8: repeat of lane 7 using a protein concentration of 25 μ M. **c** Coomassie-stained gel showing SEPT2-C after purification. Lane 1 molecular-weight standards. Lane 2 SEPT2-C 25 μ M. Lane 3 SEPT2-C 25 μ M in the presence of EGS. Lane 4 SEPT2-C 100 μ M in the presence of EGS

exclusion chromatography. For this reason, chemical cross-linking with EGS was employed. The existence of dimers in all cases was unambiguously confirmed by subsequent gel electrophoresis (Fig. 1b, c). In addition to the monomer bands that were observed for SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C in the absence of the cross-linker, additional bands appeared in the presence of EGS. These new bands migrate with masses corresponding to the dimeric forms of SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C (Fig. 1b, lanes 3, 5 and 7, and Fig. 1c lanes 3 and 4). Furthermore, no bands corresponding to higher order oligomers were observed in any of these cases (data not shown). Taken together, the results of both techniques were consistent with the existence of stable dimers in solution in all cases.

CD spectroscopy was used to probe all three domains in order to assess their secondary structure content as well as to monitor their thermal unfolding/refolding transitions and thereby estimate their thermal stability. Figure 2 shows the CD spectrum of SEPT6-C. At low temperature, the spectrum is characterized by two minima at 208 ± 1 and 222 ± 1 nm, a maximum near 195 ± 1 nm, and a negative to positive crossover at 200 ± 1 nm. The same values were observed for the CD spectrum of SEPT7-C (Supplemental Data Figure 1A).

The negative ellipticities exhibited around 208 and 222 nm are indicative of the presence of α -helical structure, and spectra with minima of roughly equal intensity at these wavelengths, as observed here, are characteristic of coiled-coils [40]. Deconvolution of the experimental spectra using three independent methods (see "Experimental Procedures") yielded 60–70% α -helix and less than 5% β -sheet for SEPT6-C, SEPT7-C and the SEPT6-C/SEPT7-C heterodimer,

Fig. 2 Thermal unfolding of human SEPT6-C. CD spectra of the recombinant protein at 4, 30, 40 and 90°C at a concentration of 10 μ M. The isodichroic point can be observed at 203 nm. Inset thermal denaturation of SEPT6-C was monitored by measuring the ellipticity at 222 nm as a function of temperature

indicating that in all cases the domains are composed predominantly of α -helix with no significant β -sheet content. Figure 3 shows the CD spectrum of SEPT2-C which, at low temperature, is characterized by the same two minima at 208 ± 1 and 222 ± 1 nm, a maximum near 195 ± 1 nm, and a negative to positive crossover at 199 ± 1 nm. In this case, deconvolution yielded 40–50% α -helix with a similar absence of β -structure (less than 5%).

The thermal unfolding/refolding transition of the proteins was also studied by circular dichroism. Figure 2 and Supplemental Data Figure 1A show the fraction of SEPT6-C and SEPT7-C unfolded as a function of

Fig. 3 Thermal unfolding of human SEPT2-C domain. CD spectra of the recombinant SEPT2-C at 4, 30, 50, 70 and 90°C at a concentration of 25 μ M. *Inset* thermal unfolding/refolding denaturation of SEPT2-C monitored by measuring the ellipticity at 222 nm as a function of temperature

temperature, respectively. When the temperature was increased from 4 to 90°C, the shape of the CD spectra of SEPT6-C and SEPT7-C domains showed a decrease in the overall ellipticity. The presence of a well-defined isodichroic point at approximately 203 nm indicates a cooperative loss of the α -helical structure and a two-state transition. This behavior is expected for a system in which only two conformations are present (α -helix and random coil). In other words, the content of α -helix is a maximum at temperatures below the transition region, but decreases to effectively zero at temperatures above the transition region. Both curves suggest that no intermediates are present in detectable amounts during the unfolding transition. Furthermore, the thermal unfolding process was very nearly completely reversible in both cases (Fig. 2 and Supplemental Data Figure 1A), since samples that were heated above 90°C returned to approximately 99% of their original state when cooled slowly to 4°C. Similar results were observed for SEPT2-C (Fig. 3).

Figure 4 shows the fraction of homodimers and heterodimers unfolded as a function of temperature. The melting temperature values (T_m) for the SEPT6-C and SEPT7-C homodimers were calculated to be 33.9 and 32.2°C, respectively. In the case of the SEPT6-C/SEPT7-C heterodimer, the melting temperature obtained was significantly higher (39.9°C), indicating a greater thermostability of the heterodimer in vitro. This was seen to be pH-dependent with the transition temperature remaining almost constant between pH 7 and 10, but severely decreasing at pHs below 7 (data not shown).

A variety of SPR experiments were designed to assess the kinetics of the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C. Both the amino coupling and the His-tag capture

Fig. 4 Thermal unfolding of SEPT6-C (squares), SEPT7-C (circles) and an equimolar mixture of SEPT6-C and SEPT7-C (triangles) at pH 7.0. The thermal unfolding profile was monitored by measuring the ellipticity at 222 nm as a function of temperature. A CD spectra of an equimolar mixture of recombinant SEPT6-C and SEPT7-C is presented in Supplemental Data Figure 1B

methods were employed to immobilize each septin C-terminal domain, and the assay orientation was reversed in each case, meaning that the kinetic rate constants and K_D values were determined in four different sets of experimental setups. All experiments were run in the presence of 300 mM NaCl in order to eliminate nonspecific electrostatic interactions (see Supplementary Data Figure 2). Figure 5 shows the kinetic data overlaid with the results of fitting to a simple 1:1 Langmuir model for the measurements made with the His-tagged constructs, and Table 1 presents the kinetic parameters derived from this analysis. It is evident that reversing the assay orientation had no influence on the derived K_D for the interaction, lending internal validation to the results. The K_D obtained for the binding of SEPT6-C to SEPT7-C and vice versa was 15.8 nM, with the association and dissociation rate constants contributing in equal magnitude for the affinity, albeit with minor differences in their absolute values for the two orientations.

Analytical ultracentrifugation was employed to further characterize the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C. The sedimentation velocity experiments of SEPT6-C/SEPT7-C in the range of concentrations from 8.5 to 53 μ M indicate the presence of a main component with a standard sedimentation coefficient, s_{20w} , of 1.95 ± 0.1 (Fig. 6a). The molecular mass expected for the heterodimer of SEPT6-C/SEPT7-C as predicted from its amino acid sequence is 30 kDa. The equilibrium sedimentation experiments confirmed that the heterodimer was the principal specie present, with an average molecular mass of 34.8 ± 2.2 kDa. A small proportion (less than 10%) of higher order oligomers occur in solution under these experimental conditions, which produces a slight deviation

Fig. 5 Overlay plots showing the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C as measured by SPR. **a** His-tagged SEPT6-C was captured onto an NTA sensor chip and a series of different concentrations of SEPT7-C without the His-tag were injected over the chip surface. **b** His-tagged SEPT7-C was captured onto a second NTA sensor chip and a series of concentrations of untagged SEPT6-C were injected over the

chip surface. All kinetic data were globally fitted to a simple 1:1 Langmuir model. The SPR response increases with concentration. Specific values are given in the legend. In the left-hand figure two virtually indistinguishable curves corresponding to 20 nM and 80 nM are given in order to emphasize data reproducibility

Table 1 Dissociation constants and rate constants for the interactions between SEPT6-C and SEPT7-C

	His-tagged domain	
	SEPT6-C	SEPT7-C
K_D (nM)	15.8	15.8
$k_a \times 10^4$ ($M^{-1} s^{-1}$)	5.69 ± 0.02	3.99 ± 0.02
$k_d \times 10^{-4}$ (s^{-1})	9.0 ± 0.1	6.3 ± 0.2

The immobilized protein bears a His-tag while the free moving analyte does not

from ideality when fitting the plot to a single protein species (Fig. 6b). The friction coefficient ratio (f/f_0) calculated for the main species, 1.8, suggests that SEPT6-C/SEPT7-C behaves as a moderately elongated protein in solution.

Since the K_D obtained by SPR for the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C was 15.8 nM, it was expected that these species would be present as a heterodimer, at micromolar concentrations. The analytical ultracentrifugation data confirm this prediction and present strong evidence that the mixture of SEPT6-C and SEPT7-C exists as an elongated heterodimer in solution under these experimental conditions. The elongated form is to be expected for a structure dominated by coiled-coil, and the fact that the complex is dimeric is consistent with the SEC data and the chemical cross-linking assays.

It has been shown that full-length SEPT2 interacts with the coiled-coil regions of SEPT6 and SEPT7, and that the interaction between SEPT2 and SEPT6 is mediated by the SEPT6 C-terminal region [30]. To further characterize these interactions, we employed SPR to verify whether the C-terminal regions of SEPT6 and SEPT7 interact with that

of SEPT2 using the same chips as those described above. The SPR data show that both SEPT6-C and SEPT7-C interact with SEPT2-C (Supplemental Data Figures 5 and 6), although the estimated affinity of these interactions are more than a 1,000-fold lower than that of the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C. These data unequivocally show these C-terminal interactions to occur, but due to their low binding affinity, even the highest concentration of SEPT2-C used (160 μM) was still unable to saturate the surface of the chip and generate a maximum response. Unfortunately, this limits the determination of the equilibrium dissociation constants, although they can be estimated from the data to be within the micromolar range.

Different reasons limit the use of SPR to quantitatively monitor self-association events, most of them derive from the fact that the measurements must be made at concentrations near the K_D value, so that the interaction actually occurs and can be monitored. In a condition near the K_D for dimerization, it is likely that the immobilized protein will assemble into dimers on the chip surface, and that part of the protein in solution will also be in a dimeric state [41], effectively reducing the population of free monomers in solution and at the chip surface.

With these constraints in mind, we opted to use analytical ultracentrifugation to analyze the interaction between SEPT2-C monomers, as this is the only construct to form stable homodimers at high concentrations. The sedimentation velocity experiments of SEPT2-C show a concentration-dependent behavior. In the range from 14 to 150 μM , there is a gradual increase in the sedimentation coefficient (Fig. 7a). The fitting of the equilibrium sedimentation data (Fig. 7b) confirmed the existence of a monomer-dimer equilibrium with a K_D of 4 μM .

Fig. 6 Analytical ultracentrifugation analyses of the complex SEPT6-C/SEPT7-C in the range of concentrations from 8.5 to 53 μM . **a** Sedimentation coefficient distribution of the complex SEPT6-C/SEPT7-C in 20 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl at

pH 7.4. These data indicate the presence of the same main single species in solution for each analyzed concentration. **b** Sedimentation equilibrium analysis of the complex SEPT6-C/SEPT7-C. *Lower panel*: distribution of residuals

Fig. 7 Analytical ultracentrifugation analyses of SEPT2-C in the range of concentrations from 14 to 150 μM . **a** Sedimentation coefficient distribution of SEPT2-C in 20 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl at pH 7.4. These data indicate the presence of main

species in solution for each analyzed concentration. **b** Sedimentation equilibrium analysis of SEPT2-C. *Lower panel*: distribution of residuals

Discussion

Previous studies indicate that the connections between the GTPase domains of the septins comprising the human SEPT2/SEPT6/SEPT7 filament and their respective C-terminal domains are flexible [18]. Indeed, the latter are not visible in the electron density map, severely limiting the amount of structural information available concerning their nature. Nevertheless, the way in which the three septins interact along the filament is highly suggestive of a pairing scheme in which the C-terminal domains of SEPT6 and SEPT7 (which are juxtaposed at an NC interface) form a

heterodimeric coiled-coil. A similar argument suggests that those from neighboring SEPT2 monomers would be expected to form a homodimeric coiled-coil. These suppositions are based on the proximity of the C-termini of the GTPase domains as well as the relative sizes of the predicted coiled-coil region, which is much larger for SEPT6 and SEPT7 than for SEPT2. Several lines of evidence indicate that SEPT6 and SEPT7 do indeed interact through their C-terminal regions forming a heterodimer [19], and fluorescence resonance energy transfer (FRET) data suggest that this occurs through a parallel coiled-coil [30]. Additionally, the C-terminal domains of the septins

UNC-59 and UNC-61 from the nematode *C. elegans* have also been shown to form a parallel heterodimeric coiled-coil, and FRET data, together with electron microscopy, indicate that the link between their predicted C-terminal coiled-coils and globular GTPase domains is also flexible [42].

Little is known concerning the structural determinants of filament assembly and why particular arrangements are favored over others. It has been suggested that different septins from within a given group may substitute one another at a given position along the filament and this appears to be borne out by recent two-hybrid studies [15, 43]. For example, septins 8, 10 or 11 would be expected to be able to substitute SEPT6 at the same position along the filament. In principle, specificity could be determined by the NC and G interfaces of the GTP binding domain or by the coiled-coils of the C-termini. In the present study, which addresses the latter possibility, size exclusion chromatography and chemical cross-linking clearly demonstrate that all three species studied (SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C) are present as homodimers in solution. This is not surprising for SEPT2-C, as it is anticipated to form homodimers at the center of the hexamer. Sedimentation velocity data show that its state of oligomerization is concentration dependent and equilibrium experiments give a modest dissociation constant of $K_D = 4 \mu\text{M}$.

The detection of SEPT6-C and SEPT7-C homodimers is less obvious as the model does not anticipate such interactions but rather predicts the formation of a heterodimeric coiled-coil at an NC interface. We therefore investigated the relative stability of these homodimers compared with a heterodimer, and the data clearly show a preference for the latter over the former, with an increase in melting temperature of at least 6°C. Furthermore, surface plasmon resonance showed the heterodimer to be highly stable, with a dissociation constant of 15.8 nM and this is consistent with the observation of dimers present at all concentrations used in our ultracentrifugation experiments. Homodimers of SEPT6-C and SEPT7-C may therefore be merely promiscuous coiled-coil interactions that occur in the absence of a more specific binding partner.

Overall, the data are consistent with that predicted from the known structure of the SEPT2/SEPT6/SEPT7 heterofilament in which the heterodimeric coiled-coil between SEPT6 and SEPT7 would contribute to the stability of one of the NC interfaces while the homodimeric coiled-coil between two SEPT2 monomers would contribute to the other. More specifically, it suggests that selective interactions made by the coiled-coil region may be important determinants for correct filament assembly. For example, it seems unlikely that stable filaments would form in which two monomers of the SEPT6 group (or SEPT7 group) would juxtapose at an NC interface, as this would imply

the formation of the less stable homodimeric coiled-coil interaction. As anticipated, SPR data show that although both SEPT6-C and SEPT7-C can be seen to interact with SEPT2-C, the binding affinity is several fold lower than that of the interaction between SEPT6-C and SEPT7-C. Finally, the much lower affinity observed for the SEPT2-C homodimer compared with that of SEPT6-C/SEPT7-C may be due to its smaller size, since it is predicted to consist of only approximately 5 heptad repeats compared with approximately 8. However, even with a lower affinity, the proximity of the coiled-coil regions within the filament would be expected to guarantee its formation, where it would be expected to stabilize the NC interface during bending at this position, which has been observed in electron microscopy [18]. This bending may be related to the role of septins in remodeling cell membranes during different cellular events.

Besides aiding in increasing filament stability, it has been suggested that the C-terminal coiled-coil domains may form cross-links between two separate filaments leading to tracks or bundles. Based on electron microscopy data obtained for the *Saccharomyces cerevisiae* septins [31], it was suggested that the paired C-terminal regions of Cdc3 and Cdc12 in one filament could associate with those from another to form antiparallel four-helix bundles linking the two filaments together. We therefore looked for evidence for the formation of tetramers of the C-terminal domains studied here, including the possibility of dimers of SEPT6-C/SEPT7-C dimers. No signs of tetramer formation were observed in either the chemical cross-linking experiments, size exclusion chromatography or analytical ultracentrifugation data presented here. Either such cross-links do not occur or the affinity of the dimer–dimer interaction is too low to be observed in our experiments. However, the possibility that low-affinity interactions may be relevant within the context of a filament, where many such interaction could potentially exist simultaneously, cannot be ruled out and remains an open question.

Similar studies to those described here have been reported for the *C. elegans* septins, UNC-59 and UNC-61, which preferentially assemble into a heterodimeric coiled-coil [42]. In this case, different to the data shown here for SEPT6-C and SEPT7-C, the individual C-termini present little α -helical secondary structure on their own, as evaluated by Far-UV CD. However, in both cases heterodimer formation stabilizes the structure and is probably a common theme in septin filament stabilization. Examination of the predicted coiled-coil region of SEPT7 and SEPT6 indicates an unusual quantity of positively charged residues (principally lysine) at some but not all of the *a* positions within the heptad repeats. Inevitably, this would bring two similarly charged residues spatially close in a homodimer, which would be expected to be unfavorable. If the

a positions bearing the positive charges are staggered in SEPT6 with respect to SEPT7, such charge repulsion would not occur, thus favoring a heterodimer over a homodimer. A similar pattern is seen for other SEPT6 group members (SEPT8, SEPT10 and SEPT11) and may be at least part of the structural basis that favors heterodimer formation over homodimers and therefore part of the signal controlling filament assembly.

This fine control of septin assembly is important as it is known that some septins present so-called promiscuous behavior in the association of their GTP binding domains [18]. For example, when the GTP binding domain of SEPT2 is heterologously expressed, it associates in solution into dimers using the G interface rather than the NC interface as observed in the SEPT2/6/7 heterocomplex. Furthermore, this domain, when crystallized alone, forms filaments similar to the complex employing both NC and G interfaces (18; PDB code 2QNR). The SEPT6 and SEPT7 coiled-coil regions could play a role in determining preferential interactions between these septins during recruitment into the filament. The strong association SEPT6 and SEPT7 via an NC interaction would expose their other interface and propitiate filament growth. This could be the first step in a generic mechanism to recruit SEPT2 into the filament, reducing the possibility of SEPT2 forming promiscuous G interface dimers. The homodimeric SEPT2 coiled-coils would add additional stability to the complex.

A recent study that extensively employs electron microscopy to characterize the filament formation properties of the four septins subunits of *S. cerevisiae* suggests that an antiparallel arrangement of the coiled-coils from neighboring filaments is necessary for filament pairing in an octameric register that is typical of these wild-type septins [44]. Another remarkable finding is that the coiled-coil interaction between Cdc3 and Cdc12 was shown to be involved in the stabilization of the septin octamer. These findings highlight the functional flexibility of the septins coiled-coil domains in assisting both intra- and inter-filament interactions. We expect that our present data on the relative affinities of the human septins C-terminal domains will assist the design of experiments to further characterize these interactions.

In conclusion, we have provided a significant body of experimental evidence toward better understanding the biophysical properties of human septin C-terminal domains and their role in filament stability. We have thus provided a more solid experimental basis for hypotheses driven by the only known crystal structure of a septin complex. The data presented also allow us to speculate about how specific coiled-coil interactions may be pertinent to guaranteeing correct filament assembly. Alternatively, the C-terminal coiled-coils could act as surfaces for recognition and binding of partner macromolecules, being important for

synchronizing cytokinesis with other cellular events [7, 45]. This work is complementary to our ongoing attempts to solve atomic resolution structures for human septin C-terminal domains.

Acknowledgments We acknowledge the financial support of FAPESP (via its CEPID program to the *Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural*) and CNPq (via the INCT initiative). This work was further supported by a collaborative CSIC-CNPq grant for international exchange awarded to JMA and RCG as well as by grant MCINN BFU2008-00013 to JMA. IAM received a CAPES student-ship and NFV, WG, JCPD and JNAM held bursaries from FAPESP.

References

- Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*, 69, 265–276.
- Cao, L., Ding, X., Yu, W., Yang, X., Shen, S., & Yu, L. (2007). Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Letters*, 581, 5526–5532.
- Pan, F., Malmberg, R. L., & Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 103.
- Kartmann, B., & Roth, D. (2001). Novel roles for mammalian septins: From vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, 114, 839–844.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J., & Scheller, R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*, 20, 1111–1122.
- Shepeprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnert, G., & Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature*, 454, 728–734.
- Spiliotis, E. T., Kinoshita, M., & Nelson, W. J. (2005). A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, 307, 1781–1785.
- Tooley, A. J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W. S., Kinoshita, M., et al. (2009). Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nature Cell Biology*, 11, 17–26.
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P., & Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: Architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 478–489.
- Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Morioka, Y., Akiguchi, I., Shibasaki, H., et al. (2003). Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and others synucleinopathies. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 24012–24095.
- Hall, P. A., & Russell, S. E. (2004). The pathobiology of the septin gene family. *The Journal of Pathology*, 204, 489–505.
- Mostowy, S., Nam Tham, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerdá, J., et al. (2009). Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS One*, 4, e4196.
- Tanaka, M., Tanaka, T., Kijima, H., Itoh, J., Matsuda, T., Hori, S., et al. (2001). Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 547–553.
- Garcia, W., de Araújo, A. P., Neto, M. O., Ballesterio, M. R., Polikarpov, I., Tanaka, M., et al. (2006). Dissection of a human

- septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, 45, 13918–13931.
15. Kinoshita, M. (2003). Assembly of mammalian septins. *The Journal of Biochemistry*, 134, 491–496.
 16. Kinoshita, M. (2003). The septins. *Genome Biology*, 4, 236.
 17. Field, C. M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M. L., Alberts, B., & Mitchison, T. J. (1996). A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *The Journal of Cell Biology*, 133, 605–616.
 18. Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühlmann, D., Macara, I. G., Weyand, M., et al. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, 449, 311–315.
 19. Sheffield, P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z., & Macara, I. G. (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 3483–3488.
 20. Nagata, K., Asano, T., Nozawa, Y., & Inagaki, M. (2004). Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 55895–55904.
 21. Fujishima, K., Kiyonari, H., Kurisu, J., Hirano, T., & Kengaku, M. (2007). Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *Journal of Neurochemistry*, 102, 77–92.
 22. Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P. S., Grinstein, S., & Trimble, W. S. (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, 9, 1458–1467.
 23. Hillebrand, S., Garcia, W., Delmar Cantú, M., de Araújo, A. P., Tanaka, M., Tanaka, T., et al. (2005). In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 92–97.
 24. Nagaraj, S., Rajendran, A., Jackson, C. E., & Longtine, M. S. (2008). Role of nucleotide binding in septin–septin interactions and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 5120–5137.
 25. Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E., & Wittinghofer, A. (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 16592–16597.
 26. Lupas, A., Van Dyke, M., & Stock, J. (1991). Predicting coiled-coils from protein sequences. *Science*, 252, 1162–1164.
 27. Wolf, E., Kim, P. S., & Berger, B. (1997). MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled-coils. *Protein Science*, 6, 1179–1189.
 28. Barth, P., Schoeffler, A., & Alber, T. (2008). Targeting metastable coiled-coil domains by computational design. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 12038–12044.
 29. Shinoda, T., Ito, H., Sudo, K., Iwamoto, I., Morishita, R., & Nagata, K. (2010). Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with septin 4. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 1324–1334.
 30. Low, C., & Macara, I. G. (2006). Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 30697–30706.
 31. Bertin, A., McMurray, M. A., Grob, P., Park, S. S., Garcia, G., 3rd, Patanwala, I., et al. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8274–8279.
 32. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463–5467.
 33. Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of proteins extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182, 319–326.
 34. Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287, 252–260.
 35. Valadares, N. F., Polikarpov, I., & Garratt, R. C. (2008). Ligand induced interaction of thyroid hormone receptor beta with its coregulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 205–212.
 36. Myszka, D. G. (1999). Improving biosensor analysis. *Journal of Molecular Recognition*, 12, 279–284.
 37. Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J., & Schubert, D. (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and applications to model systems. *Biophysical Journal*, 82, 1096–1111.
 38. Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., & Pelletier, S. L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In S. E. Harding, H. C. Horton, & A. J. Rowe (Eds.), *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science* (pp. 90–125). London, UK: Royal Society of Chemistry.
 39. Cole, J. L. (2004). Analysis of heterogeneous interactions. *Methods in Enzymology*, 384, 212–232.
 40. Cooper, T. M., & Woody, R. W. (1990). The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin. *Biopolymers*, 30, 657–676.
 41. Rich, R. L., & Myszka, D. G. (2007). Survey of the year 2006 commercial biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, 20, 300–366.
 42. John, C. M., Hite, R. K., Weirich, C. S., Fitzgerald, D. J., Jawhari, H., Faty, M., et al. (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *The EMBO Journal*, 26, 3296–3307.
 43. Nakahira, M., Macedo, J. N. A., Seraphim, T. V., Cavalcante, N., Souza, T. A. C. B., Damalio, J. C. P., et al. (2010). A draft of the human septin interactome. *PLoS One*, 5, e13799.
 44. Bertin, A., McMurray, M. A., Thai, L., Garcia, G., I. I. I., Votin, V., Grob, P., et al. (2010). Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *The Journal of Biological Chemistry*, 404, 711–731.
 45. Zhu, M., Wang, F., Yan, F., Yao, P. Y., Du, J., Gao, X., et al. (2008). Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 18916–18925.