UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

HELOÍSA CIOL

Septina de Chlamydomonas reinhardtii: estudos com foco em sua expressão e
função

São Carlos
2017

HELOÍSA CIOL

Septina de Chlamydomonas reinhardtii: estudos com foco em sua expressão e função

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 Doutora em Ciências.

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

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

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

Ciol, Heloisa

Septina de Chlamydomonas reinhardtii: estudos com
foco em sua expressão e função / Heloisa Ciol;
orientadora Ana Paula Ulian de Araújo - versão
corrigida -- São Carlos, 2017.
143 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Septina. 2. Chlamydomonas reinhardtii. 3.
Imunolocalização. I. Ulian de Araújo, Ana Paula ,
orient. II. Título.

Dedico esta tese à minha vizinha Cida, meu avô João e meu tio José Roberto, que sempre me ensinaram muito e fizeram parte de toda a minha formação pessoal. Tenho um grande caminho a percorrer ainda, mas grande parte do meu chão foi trilhado por essa família linda, que em sua passagem por esse mundo, trouxe sabedoria e serenidade a todos que os conheceram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, Luiz e Ana Ciol, por todo o apoio, palavras sábias, conforto e por serem meu pilar de vida e me ajudarem a sempre enxergar uma luz, um outro ponto de vista, um aprendizado em todas as dificuldades. Obrigada por toda a ajuda e por todo o ensinamento.

Agradeço a meu esposo, Guilherme de Guzzi Bagnato, por sempre estar presente, pelas noites que me acompanhou à universidade para realizar experimentos, por todo o apoio pessoal que me deu durante esses quase cinco anos e pela paciência. Obrigada pela sua amizade, companheirismo e por compartilhar essa vida comigo.

Também agradeço a meus sogros, Lislane e Fernando, por me acolherem, cuidarem da Chanelzinha quando precisei vir para a USP e por todo o suporte familiar que sempre nos deram.

Agradeço à minha orientadora, Ana Paula Ulian de Araújo, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela oportunidade de eu ter ido para Cambridge e por todo o auxílio durante o tempo de meu doutorado.

Muito obrigada especial a Dra. Andressa Patrícia Alves Pinto por ter me acolhido desde o primeiro contato com o laboratório e ter me ensinado grande parte do que sei hoje. Obrigada por compartilhar este projeto comigo, por toda contribuição científica, por todo apoio pessoal e por cuidar das alquinhas comigo.

Também agradeço imensamente à Dra. Juliava Sposto Avaca Crusca por ser para mim um exemplo de pesquisadora, por ter um conhecimento incrível que me iluminou o caminho nos primeiros anos de projeto e principalmente por sempre estar disponível para ajudar e ensinar.

À Dra. Joci, muito obrigada pelos ensinamentos de Duplo-Híbrido.

Agradeço também aos técnicos: Isabel, por toda a ajuda e aprendizado no laboratório; Ao José Fernando por sempre socorrer nossos equipamentos e computadores; Ao Rafael e à Patrícia pelo sequenciamento e pelos cafés.

Às minhas amigas de vida acadêmica que levarei para a vida, um muito obrigada também: Carla, Sinara, Raíssa, Heline, Aninha, Marcela, Gabriel, Everton, Raphael, Nathalya Mesquita, Natália Alves, Débora Órcia, Tatiana, Mariana... A todos que conviveram comigo nesse período, um grande abraço de agradecimento por todas os lamentos e por todas as risadas.

Aos amigos e à Dra. Alison Smith por me receber na Universidade de Cambridge, obrigada por me proporcionarem uma nova visão da ciência, por me acolherem nessa

Universidade e cidade maravilhosas e por darem cinco meses de pura satisfação, orgulho e felicidade de trabalho.

Agradeço imensamente à FAPESP pela bolsa concedida e ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura acadêmica.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

CIOL, H. *Septina de Chlamydomonas reinhardtii*: estudos com foco em sua expressão e função. 2017. 143 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Septinas fazem parte de uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina e já foram encontradas em diversos eucariontes, mas nunca em plantas. Essas proteínas têm sido descritas como atuantes na citocinese, estruturação celular e exocitose, mas pouco se conhece do seu modo de ação. Além disso, as septinas mostraram-se capazes de se polimerizar em heterofilamentos altamente organizados, a partir da interação com outras septinas, mas as referências à existência e funcionalidade de homofilamentos de septinas permanecem escassas e controversas. Este trabalho visou caracterizar a função da septina da alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, um eucarionte modelo que divergiu há muito de um ancestral comum a plantas e metazoários, e que possui uma única septina, diferente dos demais eucariontes estudados até o momento. Para tal, foram realizados ensaios de duplo híbrido para detecção de possíveis proteínas parceiras à septina de *C. reinhardtii*, além de análise de expressão gênica em diferentes pontos do ciclo celular por PCR quantitativo (qPCR), silenciamento gênico por micro-RNA artificial de interferência e imunolocalização por microscopia confocal. Os ensaios de duplo híbrido retornaram duas possíveis proteínas parceiras de interação à septina de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrSept) – S-Adenosyl-Homocysteine-Hydrolase (CrSAHH) e Subtilase-like-Serino-Protease (esporangina) – ambas relacionada à estrutura flagelar. A interação entre CrSept e CrSAHH não foi validada através das técnicas de *pulldown* e *crosslinking*, porém, os experimentos de imunolocalização da proteína *in situ* mostraram uma grande concentração de CrSept na base flagelar durante as fases G₀, e G₁, com mudança no perfil de localização para o citoplasma durante as fases S e M do ciclo celular, evidenciando uma participação da septina na estrutura flagelar e não excluindo a possibilidade de uma interação *in vivo* entre CrSept e CrSAHH. Análises do nível de expressão gênica de *CrSept* mostraram uma tendência de maior expressão do gene da septina durante o período claro, com redução na fase escura do ciclo celular, resultados que se assemelham aos observados pela análise qualitativa, por *western blot*, da expressão da proteína ao longo do ciclo celular. Os experimentos de silenciamento gênico, por fim, mostraram um possível fenótipo relacionado à redução de mRNA de CrSept, não observado no grupo controle. Estes resultados mostram que a CrSept possui caráter estrutural na alga verde *C. reinhardtii*, podendo atuar como suporte para outras proteínas durante a fase de crescimento celular. Além disso, localizações pontuais por toda a célula durante a fase de divisão celular sugerem que a CrSept desempenha um importante papel na manutenção da estrutura celular para a conclusão da divisão celular.

Palavras-Chave: Septina. *Chlamydomonas reinhardtii*.

ABSTRACT

CIOL, H. *Septin of Chlamydomonas reinhardtii*: studies focused on its expression and function. 2017. 143 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017

Septins belong to a family of proteins that bind guanine nucleotide and have been found in many eukaryotes, but never in plants. These proteins have been described in cytokinesis process, cell structure and exocytosis, but little is known about their way of action. Besides, septins are capable of polymerize in high organized heterofilaments when interacting with other septins, but references and functional studies of septins homofilaments remain controversial. This work aimed to characterize the function of the unique septin from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a model eukaryote organism that long diverged from a common ancestor to plants and Metazoans and that has a single septin. For that, yeast two-hybrid assays were conducted in search of possible partner proteins to *C.reinhardtii* septin (CrSept); also, gene expression analyses by qPCR of different points of the cell cycle helped characterize the expression profile of the *CrSept* gene and gene silencing by artificial micro-RNA (amiRNA) and immunolocalization by confocal microscopy were used to enrich functional and localization studies. The yeast two-hybrid assays returned two possible partner proteins to CrSept - S-Adenosyl-Homocysteine-Hydrolase (CrSAHH) e Subtilase-like-Serino-Protease (sporangin) – both related to the flagella structure. The interaction among CrSept and CrSAHH could not be validated *in vitro* by pulldown or crosslink assays, however, the *in situ* immunostaining showed CrSept can mostly be found in punctual concentrated spots close to the base of the flagella during G₀ and G₁ phases of the cell cycle, which differs from the profile observed during phases S and M, where the protein can be observed as punctual spots through the whole cell. These results strengths CrSept role on the flagellar structure and do not exclude the possibility of an *in vivo* interaction between CrSept and CrSAHH. Gene expression analyses showed that septin is mostly expressed during the light part of the cycle, which is also observed at the protein quantitative analysis by western blot. Gene silencing experiments showed a possible phenotype in clones expressing amiRNA against *CrSept*, which was not observed on control group. Together, these results suggest CrSept has a structural role in *C. reinhardtii* and might work as a scaffold to other proteins during cell growth stage. Besides, punctual staining observed during mitosis suggests CrSept might help maintaining cell structure until cell division is completed.

Keywords: Septin. *Chlamydomonas reinhardtii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Septinas durante o processo de divisão celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	26
Figura 2 -	Domínios estruturais das septinas humanas.	27
Figura 3 -	Estrutura do filamento formado por septinas.	29
Figura 4 -	Homofilamentos de septinas.	30
Figura 5 -	Esquema morfológico da célula de <i>C. reinhardtii</i> .	31
Figura 6 -	Esquema do ciclo celular de <i>C. reinhardtii</i> sincronizado por fotoperíodo em 24 horas.	32
Figura 7 -	Microscopia eletrônica de transmissão de <i>C. reinhardtii</i> .	34
Figura 8 -	Árvore filogenética dos domínios centrais e conservados das septinas.	37
Figura 9 -	Análise por eletroforese em gel de agarose de fragmentos reamplificados e purificados das construções CrSeptNGC (coluna 1) e CrSeptNC (coluna 2) para purificação das amostras.	63
Figura 10 -	Análise de restrição dos clones positivos das construções CrSeptNGC e CrSeptNG no vetor pBTM116*.	64
Figura 11 -	(a) Eletroforese de reação de PCR da construção CrSeptG; (b) Eletroforese para reação de PCR da construção da CrSeptNGC para ligação ao vetor pLexA_C.	65
Figura 12 -	Teste de autoativação (Ensaio da β -galactosidase) para duplo híbrido	66
Figura 13 -	Teste da β -galactosidase para as colônias transformantes com pBMT116*-CrSeptNGC + biblioteca de cDNA de <i>C. reinhardtii</i> .	67
Figura 14 -	Ensaio da β -galactosidase para as 148 colônias selecionadas	68
Figura 15 -	Ensaio da β -galactosidase para os cinco clones positivos encontrados no ensaio de duplo-híbrido com a construção do domínio G da proteína CrSept.	69
Figura 16 -	Teste de expressão e purificação da proteína SAHH.	72
Figura 17 -	Teste de <i>pulldown</i> entre a CrSeptG e a SAHH, com imobilização da E(86) na resina de níquel pela fusão com a proteína SUMO.	72
Figura 18 -	Ensaio de <i>pulldown</i> , com imobilização da SAHH-SUMO na resina de níquel.	73
Figura 19 -	(a) Purificação da construção GST-CrSAHH(79 kDa) por cromatografia de afinidade de resina Glutathione-Sepharose.	74
Figura 20 -	Ensaio de <i>crosslinking</i> com o agente <i>crosslinker</i> EGS.	76
Figura 21 -	Ensaio de <i>crosslinking</i> com DSS realizado a baixa temperatura.	77
Figura 22 -	Ensaio de <i>crosslinking</i> com EGS, realizado em baixa temperatura.	77
Figura 23 -	Amplificação por qPCR de cDNA de <i>C. reinhardtii</i> para determinar temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos específicos para <i>CrSept</i> (CS1 e CS2), RPL19 e RPL32	78

Figura 24 - Análise da variação da expressão do gene <i>CrSept</i> ao longo do ciclo celular de <i>C. reinhardtii</i> .	79
Figura 25 - Análise de expressão gênica de <i>CrSept</i> ao longo do ciclo celular de 24 horas.	80
Figura 26 - Imunomarcação <i>in situ</i> da proteína CrSept em <i>C. reinhardtii</i> .	81
Figura 27 - Imunolocalização da proteína CrSept <i>in situ</i> .	82
Figura 28 - Micrografias em nove diferentes planos de duas células em divisão.	83
Figura 29 - Micrografias da fase final da divisão celular de quatro células de <i>C. reinhardtii</i> .	83
Figura 30 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em três planos distintos.	85
Figura 31 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em cinco planos distintos.	86
Figura 32 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em três planos distintos.	87
Figura 33 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em três planos distintos.	88
Figura 34 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em quatro planos distintos.	89
Figura 35 - Microscopia confocal de imunomarcação <i>in situ</i> da septina de <i>C. reinhardtii</i> em divisão celular.	90
Figura 36 - <i>Western blot</i> do extrato total de proteínas de culturas sincronizadas.	91
Figura 37 - Gel espelho da membrana de <i>Western blot</i>	92
Figura 38 - As oito construções de amiRNA selecionadas para transformar <i>C. reinhardtii</i> e a representação da posição de anelamento no transcrito de CrSept.	93
Figura 39 - PCR de 10 colônias selecionadas para cada construção de amiRNA.	94
Figura 40 - Placa de 96 poços com os transformantes de amiRNA..	95
Figura 41 - Análise de microscopia óptica de clones selecionados aleatoriamente, três horas após o início da fase escura.	97
Figura 42 - Microscopia óptica de células de <i>C. reinhardtii</i> transformadas com amiRNA e sincronizadas	99
Figura 43 - Curva de crescimento dos três clones do amiRNA5	100
Figura 44 - Análise da expressão de <i>CrSept</i> em três replicatas distintas.	101
Figura 45 - Variação da expressão gênica dos genes normalizadores ao longo do ciclo celular.	108
Figura 46 - Esquema hipotético da divisão celular em <i>C. reinhardtii</i> e das forças atuantes na separação das células filhas.	112

Figura 47 - Expressão do gene PSAD durante 24 horas de um ciclo celular sincronizado de *C. reinhardtii*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeo utilizado na reação de sequenciamento dos insertos ligados ao vetor pBTM116*. <i>T_m</i> corresponde à temperatura de <i>melting</i> dos primers.	42
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação da <i>CrseptNGC</i> e <i>CrseptNG</i> . As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. <i>T_m</i> corresponde à temperatura de <i>melting</i> dos primers.	43
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação da <i>CrseptG</i> . As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. <i>T_m</i> corresponde à temperatura de <i>melting</i> dos primers.	43
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da <i>CrseptNGC</i> em pLexA_C. As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. <i>T_m</i> corresponde à temperatura de <i>melting</i> dos primers.	44
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos clones AD-presa do ensaio de duplo híbrido. <i>T_m</i> corresponde à temperatura de <i>melting</i> dos primers	48
Tabela 6 - Primers utilizados para clonagem do gene CrSAHH no vetor de expressão pGEX_5x-1	50
Tabela 7 - Sequência de primers para PCR de colônia e sequenciamento do vetor pChlamiRNA3int	58
Tabela 8 - <i>Primers</i> para ensaio de qPCR e suas especificações	60
Tabela 9 - Parâmetros dos primers para qPCR	61
Tabela 10 - Abrangência das sequências de nucleotídeos recuperadas para os clones positivos de interação no ensaio de duplo-híbrido, mostrando tanto a posição dos aminoácidos correspondentes recuperados, quanto dos nucleotídeos.	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazole, inibidor competitivo do produto do gene <i>HIS3</i>
Ago	Proteína argonauta
amiRNA	Micro-RNA artificial de interferência
amiRNA2	Construção 2 do micro-RNA artificial de interferência de <i>C. reinhardtii</i>
amiRNA4	Construção 4 do micro-RNA artificial de interferência de <i>C. reinhardtii</i>
amiRNA5	Construção 5 do micro-RNA artificial de interferência de <i>C. reinhardtii</i>
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CDC10	<i>Cell Division Cycle</i> 10 (Septina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
CDC11	<i>Cell Division Cycle</i> 11 (Septina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
CDC12	<i>Cell Division Cycle</i> 12 (Septina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
CDC3	<i>Cell Division Cycle</i> 3 (Septina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
cDNA	DNA complementar
CDS	Sequência codificante de DNA (<i>Coding DNA Sequence</i>)
CEP290	Proteína de centrôssomo de 290 kDa (<i>Centrossomal protein of 290 kDa</i>)
CrSAHH	Proteína S-Adenosil-Homocisteína-Hidrolase de <i>C. reinhardtii</i>
CrSept	Septina de <i>C. reinhardtii</i>
CrSeptG	Construção do domínio G da Septina de <i>C. reinhardtii</i>
CrSeptNG	Construção do N-terminal e domínio G da Septina de <i>C. reinhardtii</i>
CrSeptNGC	Construção do CDS de Septina de <i>C. reinhardtii</i>
CS1	Primer 1 para amplificação de CrSept por PCR tempo real quantitativo
CS2	Primer 2 para amplificação de CrSept por PCR tempo real quantitativo
CW-15	Linhagem sem parede celular de <i>C. reinhardtii</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, marcador fluorescente de zonas ricas em AT no DNA
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
DE3	Designação para linhagens de bactérias que contêm λ DE3-lisogênio, que expressam T7 RNA polymerase sob o controle do promotor lacUV5.
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DH5-α	Linhagem de <i>E.coli</i> contendo as mutações dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA	DNA dupla-fita
dsRNA	RNA dupla-fita
DSS	Disuccinimidyl suberato. Agente <i>crosslinker</i>
DTT	Ditiotreitol
EcoRI	Enzima de restrição isolada de <i>E.coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGS	Etileno glicol bis(succinimidyl succinate). Agente <i>crosslinker</i>
Fase G1	Fase de crescimento 1 (<i>growth 1</i>) do ciclo celular
Fase S/M	Fase de síntese e mitose do ciclo celular
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Domínio catalítico de trifosfato de guanosina em proteínas
HIS3	Gene codificante para a proteína Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase em <i>S. cerevisiae</i>
his3_200	Designação para deleção da ORF de HIS3 em <i>S. cerevisiae</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
iRNA	RNA de interferência
kDA	Kilodalton, unidade de massa atômica
KpnI	Enzima de restrição isolada de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
L40	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> com mutações específicas para experimentos de duplo híbrido
LacZ	Gene codificante para a proteína β -galactosidase
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
leu2_3	Designação para mutação da ORF de LEU2 em <i>S. cerevisiae</i>
LexA	Repressor do sistema SOS
miRNA	Micro-RNA de interferência
mRNA	RNA mensageiro
NotI	Enzima de restrição isolada de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
OD	Densidade óptica (<i>Optical Density</i>)
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-buffer saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
P-loop	<i>Loop</i> de ligação ao fosfato, domínio comum a proteínas ligadoras de GTP
PNK	T4 <i>polynucleotide kinase enzyme</i>
PSaD	Photosystem I reaction center subunit II
PtdIns(4,5)P	Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
2	
qPCR	PCR quantitativo
RACK1	Gene receptor de proteína C Kinase 1 ativada
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RPL19	Proteína ribossomal L19 (<i>Ribosomal Protein L19</i>)
RPL32	Proteína ribossomal L32 (<i>Ribosomal Protein L32</i>)
SAHH	S-Adenosil-Homocisteína-Hidrolase
SalI	Enzima de restrição isolada de <i>Streptomyces albus G</i>
SD-L	Meio para crescimento de leveduras sem suplementação de leucina
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SD-W	Meio para crescimento de leveduras sem suplementação de triptofano
SD-WH	Meio para crescimento de leveduras sem suplementação de triptofano e histidina
SD-WL	Meio para crescimento de leveduras sem suplementação de triptofano e leucina
SD-WLH	Meio para crescimento de leveduras sem suplementação de triptofano, histidina e leucina
SEPT10	Septina 10 de humanos
SEPT11	Septina 11 de humanos
Sept12	Septina 12 de camundongos
SEPT12	Septina 12 de humanos
SEPT13	Septina 13 de humanos
SEPT2	Septina 2 de humanos
SEPT5	Septina 5 de humanos
SEPT3	Septina 3 de humanos
SEPT4	Septina 4 de humanos
SEPT6	Septina 6 de humanos
SEPT7	Septina 7 de humanos
SEPT8	Septina 8 de humanos
SEPT9	Septina 9 de humanos
siRNA	Pequeno RNA de interferência (<i>small interference RNA</i>)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAP	Meio Tris-Acetato-Fosfato para crescimento de <i>C. reinhardtii</i>
TBS-T	Tampão tris-salino com adição de Tween-20
TE	Tris-EDTA
TIF	Transporte Intraflagelar
Tm	Temperatura de anelamento
TP	Meio Tris-Fosfato para crescimento de <i>C. reinhardtii</i>
trp1	Gente codificante para N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilate em <i>S. cerevisiae</i>
trp1-901	Designação para deleção da ORF de TRP1 em <i>S. cerevisiae</i>
UTR	Região não codificante
WT-12	Linhagem selvagem de <i>C. reinhardtii</i>
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo. Glicosídeo artificial análogo à lactose
YPD	Meio para crescimento de leveduras (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	SEPTINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS	25
1.1.1	DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS SEPTINAS	27
1.1.2	AS SEPTINAS E A FORMAÇÃO DE FILAMENTOS	28
1.2	CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	30
1.2.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	30
1.2.2	DIVISÃO CELULAR EM CHLAMYDOMONAS	32
1.2.3	OS FLAGELOS DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	33
1.3	SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	34
1.3.1	IRNA EM CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	35
1.3.2	A SEPTINA DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	36
1.4	JUSTIFICATIVA DE ESTUDO	38
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	ENSAIOS DE DUPLO-HÍBRIDO	41
3.1.1	CEPA DE LEVEDURA UTILIZADA E VETORES DE DUPLO-HÍBRIDO	41
3.1.2	TRANSFORMAÇÃO EM PEQUENA ESCALA	44
3.1.3	ENSAIO DA B-GALACTOSIDASE EM PAPEL FILTRO	45
3.1.4	TESTE 3-AT (3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOL)	46
3.1.5	TRANSFORMAÇÃO EM LARGA ESCALA: VARREDURA DA BIBLIOTECA DE cDNA	46
3.1.6	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE LEVEDURAS	47
3.1.7	EXTRAÇÃO PLASMIDIAL DE BACTÉRIAS	48
3.1.8	SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	48
3.1.9	VALIDAÇÃO DO CLONE DE INTERAÇÃO CrSAHH: CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	49
3.1.10	VALIDAÇÃO POR ENSAIO DE CROSSLINK	51
3.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DA CrSEPT NAS ETAPAS DO CICLO CELULAR POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)	52
3.2.1	PRIMEIRO ENSAIO DE qPCR	52
3.2.2	SEGUNDO ENSAIO DE qPCR	54

3.3	IMUNOMARCAÇÃO <i>IN SITU</i> DA CrSEPT	54
3.3.1	FIXAÇÃO CELULAR POR GLUTARALDEÍDO	55
3.3.2	FIXAÇÃO CELULAR POR PARAFORMALDEÍDO E METANOL	55
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE CrSEPT EM EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DE <i>C. REINHARDTII</i>	56
3.5	SILENCIAMENTO GÊNICO POR MICRO-RNA ARTIFICIAL DE INTERFERÊNCIA (AMIRNA)	57
3.5.1	DESENHO DAS SEQUÊNCIAS DE AMIRNA	57
3.5.2	CONSTRUÇÃO DE AMIRNA E CLONAGEM NO VETOR PCHLAMIRNA3INT	57
3.5.3	TRANSFORMAÇÃO NUCLEAR DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII POR ELETROPORAÇÃO	58
3.5.4	CURVA DE CRESCIMENTO DOS TRANSFORMANTES	59
3.5.5	EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR QPCR	59
3.5.6	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, QUANTIFICAÇÃO E ENSAIO DE WESTERN BLOT	61
4	RESULTADOS	63
4.1	DUPLO-HÍBRIDO	63
4.1.1	CLONAGEM DE CrSEPT NOS VETORES DE DUPLO-HÍBRIDO	63
4.1.2	ENSAIO DE DUPLO HÍBRIDO	65
4.1.3	VALIDAÇÃO DOS CLONES DE INTERAÇÃO RECUPERADOS POR DUPLO-HÍBRIDO	69
4.1.4	DUPLO-HÍBRIDO DIRIGIDO PARA VERIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO CrSEPT-CrSEPT	70
4.1.5	CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SAHH E CrSEPTG	70
4.1.6	ENSAIO DE PULLDOWN: IMOBILIZAÇÃO DA CrSEPTG+SUMO EM RESINA DE NÍQUEL	71
4.1.7	ENSAIO DE PULLDOWN: IMOBILIZAÇÃO DA SAHH+SUMO EM RESINA DE NÍQUEL	73
4.1.8	ENSAIO DE CROSSLINK	74
4.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR	78
4.2.1	PRIMEIRO ENSAIO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR	78
4.2.2	SEGUNDO ENSAIO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR	79
4.3	IMUNOMARCAÇÃO <i>IN SITU</i> DA CrSEPT	80
4.3.1	IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS FIXADAS COM GLUTARALDEÍDO	80
4.3.2	IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS FIXADAS COM PARAFORMALDEÍDO E METANOL	83
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE CrSEPT EM EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DE <i>C. REINHARDTII</i>	91
4.5	SILENCIAMENTO GÊNICO POR AMIRNA	92
4.5.1	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS DE AMIRNA	92

4.5.2	PCR DE COLÔNIA E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS	93
4.5.3	TRANSFORMAÇÃO NUCLEAR POR ELETROPORAÇÃO	94
4.5.4	IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPO POR MICROSCOPIA ÓPTICA	95
4.5.5	CURVA DE CRESCIMENTO DOS TRANSFORMANTES DE AMIRNA	99
4.5.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS CLONES DE AMIRNA POR QPCR	100
4.5.7	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	102
5	DISCUSSÃO	103
5.1	ENSAIO DE DUPLO HÍBRIDO	103
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E QUANTIFICAÇÃO DE CrSEPT NO EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS	106
5.3	IMUNOLOCALIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DA CrSEPT	109
5.4	SILENCIAMENTO GÊNICO POR AMIRNA	111
6	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICES	123
	APÊNDICE A - OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA O GENE <i>CrSEPT</i> E OS GENES NORMALIZADORES <i>RPL19</i> , <i>RPL32</i> E <i>RACK1</i> PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR	123
	APÊNDICE B - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA NOVAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA. AS SEQUÊNCIAS FORAM DESENHADAS ATRAVÉS DO SOFTWARE BEACON DESIGNER™ E ANALISADAS PARA MANTER 20 ± 2 BASES, $T_M = 60 \pm 2^\circ\text{C}$ E TEOR DE GC INFERIOR A 60%.	125
	APÊNDICE C - SEQUÊNCIAS DE AMIRNA, ENERGIA DE HIBRIDIZAÇÃO E OLIGONUCLEOTÍDEOS DESENHADOS PARA CLONAGEM DO AMIRNA NO VETOR pCHLAMIRNA3INT	127
	APÊNDICE D - VALIDAÇÃO DOS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR DO GENE CRSEPT.	129
	APÊNDICE E - VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE QPCR	131
	ANEXOS	133

ANEXO A - VETOR PBTM116*, MODIFICADO A PARTIR DO VETOR PBTM116 PARA CONFERIR UM MARCADOR DE RESISTÊNCIA À CANAMICINA.	133
ANEXO B - MAPA DO VETOR pLexA_N, UTILIZADO COM A CONSTRUÇÃO CrSEPTG PARA O ENSAIO DUPLO HÍBRIDO	135
ANEXO C - MAPA DO VETOR pLexA_C, UTILIZADO COM A CONSTRUÇÃO CrSEPTNGC PARA LIGAÇÃO DO PROMOTOR PELO DOMÍNIO C-TERMINAL, PARA O ENSAIO DUPLO HÍBRIDO	137
ANEXO D - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA SELETIVOS PARA LEVEDURAS	139
ANEXO E - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA TRANSFORMAÇÃO EM LARGA ESCALA NO ENSAIO DE DUPLO HÍBRIDO	141
ANEXO F - VETOR pCHLAMI RNAINT UTILIZADO PARA TRANSFORMAÇÃO DE AMIRNA EM <i>CHLAMYDOMONAS</i>	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPTINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Septinas fazem parte de uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina e foram descritas pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae*. A identificação das septinas ocorreu através de um rastreamento genético, o qual buscava linhagens da levedura que continham mutações que resultavam em um defeito na citocinese, na morfologia celular, e consequentemente na progressão do ciclo celular.¹ As linhagens mutantes em qualquer um dos loci gênicos CDC3, CDC10, CDC11 ou CDC12 comumente formavam células multinucleadas que apresentaram defeito no processo de brotamento, pois não eram capazes de organizar um “anel de septinas”.¹ Na Figura 1a estão mostrados os filamentos de septinas, responsáveis pela demarcação e separação entre as membranas das células mãe e filha.²⁻³

Posteriormente, as septinas foram descritas em outros fungos,⁴⁻⁵ nematoides,⁶ moscas⁷ e mamíferos.⁸⁻⁹ Até 2011, as septinas pareciam estar presentes somente no supergrupo dos Opisthokonta (composto por animais, fungos e organismos próximos), mas com o genoma de *C. reinhardtii*, publicado em 2007,¹⁰ e de alguns ciliados em 2006,¹¹⁻¹² foi observada a presença de septinas em protozoários e algas verdes.¹² Em 2011, septinas também foram descritas em algas marrons, organismos bastante distantes de algas verdes e ciliados. Até o momento, não foram encontradas septinas no grupo Amoebozoa e nem em plantas terrestres.¹³

O aparecimento de septinas em quase todos os grupos eucariotos sugere ter sido um evento bastante primitivo e que talvez envolva um organismo ancestral comum a todos os eucaritos, exceto os excavatas (organismos unicelulares de dois ou mais flagelos representados por parasitas como tripanossomas e giárdia).¹³ Ainda, é possível que os excavatas tenham divergido anteriormente ao tronco que deu origem a outros grupos eucariotos superiores, indicando que as septinas possam ter aparecido logo após essa divergência.¹³

Outros estudos comprovaram a importância das septinas na citocinese e na formação do citoesqueleto.¹⁴⁻¹⁵ Além do papel na citocinese, as septinas mostraram ser importantes em outros processos celulares, incluindo a determinação da polaridade celular,¹⁶⁻¹⁷ reorganização do citoesqueleto,¹⁸ dinâmica de membranas,¹⁹ tráfego de vesículas,²⁰ exocitose²¹ e apoptose.²²

Avanços nos estudos da arquitetura de septinas em leveduras mostraram um novo modelo de organização estrutural no septo formado pelo broto emergente. Nos primeiros estágios de divisão celular é possível encontrar septinas organizadas em uma estrutura

semelhante a uma ampulheta. Com a evolução da divisão celular, estas proteínas se reorganizam em um anel duplo de septinas para permitir a citocinese (Figura 1b). Durante a mitose, os filamentos em estrias paralelas ao eixo de brotamento da célula mãe são formados unicamente por septinas Shs1; enquanto os filamentos perpendiculares ao eixo são compostos por octâmeros de septinas (Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11). Para a conclusão da citocinese, as duplas de filamentos octaméricos se desmontam e se rearranjam paralelos ao eixo do brotamento.²³

Figura 1 - Septinas durante o processo de divisão celular em *S.cerevisiae*. (a) Localização das septinas durante a citocinese, visualizado por microscopia de fluorescência²⁴; (b) Organização dos filamentos de septina durante a mitose em *S. cerevisiae*, mostrando o remodelamento dos filamentos de septina nas diferentes etapas do processo de divisão celular.²³

Fonte: (a) Adaptada de GLADFELTER et al.²⁸; (b) Adaptada de ONG et al.²⁷

Septinas também foram observadas no ânulus dos espermatozoides de mamíferos, formando complexos octaméricos com outras proteínas e mantendo a função do flagelo da célula. Em camundongos, observou-se que a expressão da Sept12 é restrita a células espermato gênicas. Já em homens inférteis, foram encontradas mutações no domínio GTPase da SEPT12 relacionadas a deformidades específicas dos espermatozóides, como

ânulus defeituoso e cauda dobrada. As duas mutações no domínio de ligação ao GTP anulam a atividade catalítica do GTP e interferem na motilidade do flagelo do espermatozoide.²⁵

1.1.1 Domínios estruturais das septinas

Os membros da família de septinas são compostos tipicamente por três regiões: um N-terminal variável, um domínio central GTPase e uma região C-terminal que geralmente inclui sequências características *coiled-coil* (Figura 2 A; adaptado de Kartmann e Roth, 2001).²⁶ Devido ao domínio central de ligação a GTP, o qual é caracterizado pela presença do motivo *P-loop*, as septinas são agrupadas na superclasse das *P-loop GTPases*.²⁷⁻²⁸ O *P-loop* é definido pelos motivos G1 (GxxGxGKST), G3 (DxxG) e G4 (xKxD), sendo este último específico para ligação ao GTP.²⁹

Figura 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 (adaptado de Kartmann e Roth, 2001)²⁶. (b) Classificação das septinas de mamíferos em grupos, considerando seus domínios estruturais (Martinez et al., 2006).³⁰ SEPT14, não representada no esquema, pertence ao grupo II³⁰ (Peterson et al., 2007).³¹

Fonte: Adaptada de KARTMANN; ROTH²⁶; MARTINEZ et al.³⁰ PETERSON et al.³¹

Atualmente são conhecidos 13 genes que codificam septinas em humanos, sendo que a maioria deles pode codificar um ou mais polipeptídeos, seja por *splicing* alternativo ou por múltiplos sítios de início da tradução.¹⁵ As septinas são proteínas de 40-60 kDa, com estrutura primária 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

variação.³² A identidade sequencial entre os domínios GTPase de septinas da mesma espécie é consideravelmente alto, com uma similaridade mínima de 75%.²⁶ A classificação das septinas de mamíferos, considerando seus domínios estruturais, pode ser observada na Figura 2B.³⁰

Algumas septinas ainda contém uma região polibásica conservada (Figura 2A), que é responsável pela ligação a fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂).³² A ligação de PtdIns(4,5)P₂ ou GTP na Septina 4 foi mostrada ser mutuamente exclusiva,³² o que pode conferir a algumas septinas uma função regulatória.²⁶ Recentemente, foi demonstrado que a presença de PtdIns(4,5)P₂ promove a polimerização e organização dos filamentos de septinas em levedura.³³

1.1.2 As septinas e a formação de filamentos

As septinas possuem a característica de se polimerizarem, *in vivo* e *in vitro*, formando complexos hetero-oligoméricos altamente organizados. Esses complexos já foram isolados a partir de leveduras, mosca, camundongo e humano e também formam heterofilamentos. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas, embora sua função ainda não esteja bem estabelecida.^{7,18,34-35} Evidências sugerem que os filamentos de septinas fazem parte do citoesqueleto, sendo capazes de se organizar em estruturas mais complexas.¹⁵

Complexos de septinas 2, 6 e 7 foram isolados de *Drosophila*⁷ e levedura³⁴ e mostraram a possibilidade de polimerização em filamentos de aproximadamente 7-9 nm de espessura. O complexo dessas proteínas recombinantes pode ser co-purificado em uma proporção de 1:1:1.^{34,36} Sheffield e colaboradores em 2003 também verificaram a interação entre SEPT2, SEPT6 e SEPT7, e seus estudos em mamíferos indicaram que essas três septinas formam um heterotrímero ou, em pares, heterodímeros.³⁵

Sirajuddin e colaboradores em 2007 resolveram a primeira estrutura de uma septina e também do complexo formado pelas septinas humanas 2, 6 e 7 (Figura 3). No complexo, SEPT2 forma um homodímero pela região NC (N-terminal e C-terminal), deixando livre o domínio GTPase para interagir com a SEPT6. Esta está ligada à SEPT7 pela sua região NC. SEPT7 também forma homodímeros pelo domínio GTPase, o que faz o hexâmero crescer longitudinalmente, formando os filamentos.³⁷

Com base na similaridade sequencial do domínio GTPase, Kinoshita propôs em 2003 a divisão dos membros da família das septinas de mamíferos em quatro grupos, como mostrado no painel B da Figura 2.¹⁵ O complexo das septinas 2, 6 e 7 deixou claro que as septinas preferem interagir com septinas de outros grupos para a montagem de heterofilamentos. Porém, as observações em relação a este complexo ainda não esclareceram como o grupo

I, das septinas 3, 9 e 12, faz parte dos heterofilamentos. Os complexos observados até agora obedecem a regra estabelecida por Kinoshita, no que diz respeito à interação entre septinas de grupo diferentes. Um mapa de interações para septinas foi montado pelo nosso grupo, a partir de dados do duplo híbrido³⁸, o que permitiu confirmar a preferência das septinas por interagirem com septinas pertencentes a outros grupos, concordando com a regra estabelecida por Kinoshita.

Figura 3 - Estrutura do filamento formado por septinas. (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 setas³⁷

Fonte: SIRAJUDDIN et al.³⁷

Vários estudos têm sido realizados visando entender o papel celular das septinas e observou-se que essas proteínas recrutam várias outras para desempenharem suas funções. De fato, muitas destas funções foram atribuídas às septinas após a identificação de possíveis parceiros protéicos, ampliando a atuação dessas moléculas na célula e comprovando que seu papel não está restrito ao processo de divisão celular, como se pensava no início.

Em contraste aos complexos formados por mais de uma septina, há evidências de outras estruturas formadas por septinas individuais. O primeiro relato da existência de homofilamentos foi descrito para septina 2 de *Xenopus* (Figura 4 A).³⁹ Neste estudo, foram observados filamentos de aproximadamente 20 nm de espessura, formados apenas quando Sept2 recombinante estava ligada ao GTP, mas não ao GDP. Por outro lado, para a septina 2 humana foram observados homofilamentos tanto na presença de GTP quanto de GDP

(Figura 4 B).⁴⁰ Esses homofilamentos formavam feixes de 20-40 nm de espessura. Ainda, homofilamentos caracterizados como amilóides (20-50 nm de espessura) foram observados pelo nosso grupo para a SEPT4 humana em condições *in vitro* (Figura 4 C),⁴¹ bem como para SEPT2.⁴²

Figura 4 - Homofilamentos de septinas. (A) SEPT2 de *Xenopus*.³⁹ A escala representa 100 nm; (B) SEPT2 humana.⁴⁰ A escala representa 100 nm⁴³; (C) SEPT4 humana.⁴¹ A escala representa 1000 nm.

Fonte: (A) MENDOZA et al.³⁹; (B) HUANG et al.⁴³; (C) GARCIA et al.⁴¹.

1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

1.2.1 Características morfológicas

A alga verde *C. reinhardtii* é um organismo unicelular pertencente ao filo das Clorófitas, ordem das Volvocales e família das Chlamydomonadaceae. O gênero *Chlamydomonas* foi descrito pela primeira vez em meados do século XIX por C.G. Ehrenberg ao observar um organismo envolto por um manto (do grego, *chlamys*) e solitário (do grego, *monas*), e atualmente engloba espécies de algas unicelulares que possuem dois flagelos anteriores de igual comprimento, que emergem de um corpo basal localizado no corpo celular; uma parede celular e um único cloroplasto contendo um ou mais pirenídeos (Figura 5).⁴⁴

Inicialmente, acreditou-se que a parede celular das *Chlamydomonas* pudesse ser composta por celulose, assim como nos vegetais superiores. No entanto, posteriormente descobriu-se que as glicoproteínas eram a única semelhança entre os organismos, uma vez que os açúcares presentes (arabinose, manose, galactose e glucose) e a organização

molecular tornavam a estrutura das *Chlamydomonas* singular e completamente distinta das plantas terrestres.⁴⁴

As algas unicelulares utilizam seus flagelos como motores propulsores em direção à luz. O estigma (*eyespot*) é a organela responsável por direcionar o movimento da célula para a luz, sendo composto por duas ou mais camadas de grânulos repletos de elétrons e pigmentos carotenoides. O aparelho neuromotor das *Chlamydomonas* é composto pelos corpos basais e fibras que os conectam ao núcleo. Os corpos basais são constituídos por microtúbulos tipicamente encontrado em centríolos, comum a todos os organismos. A região de transição entre os flagelos e corpos basais se organiza em forma de “X”, estrutura já observada em outras algas e gametas masculinos de plantas terrestres, mas não em protozoários ou animais. As fibras que dão origem aos flagelos são compostas por quatro grupos de microtúbulos que seguem da margem anterior da célula em direção aos corpos basais.⁴⁴

Figura 5 - Esquema morfológico da célula de *C. reinhardtii*. A alga apresenta dois flagelos (F) anteriores que emergem dos corpos basais, localizados próximos à membrana celular. O núcleo (N) central é envolto pelo cloroplasto (C), que apresenta uma concentração maior de pigmentos na porção basal da célula, o pirenóide (P), responsável pela fixação de CO₂ do meio. Além disso, possui uma organela de fototaxia, chamada de estigma ou mancha ocelar (*eyespot*) (E), localizado anteriormente ao lado esquerdo da alga, além de outras organelas comumente encontrados em eucariotos, como mitocôndrias (M), vacúolos (V) e Golgi (G).

Fonte: HARRIS.⁴⁴

Chlamydomonas apresenta um único cloroplasto que ocupa toda a porção basal da célula e adquire uma forma de “U”, envolvendo o núcleo. No centro desse cloroplasto, encontra-se o pirenóide, região relacionada ao mecanismo de concentração de carbono para fixação de CO₂, capaz de manter um ambiente rico em CO₂ próximo à enzima Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase).⁴⁴

1.2.2 Divisão Celular em *Chlamydomonas*

Chlamydomonas pode apresentar tanto ciclo celular sexuado, quanto assexuado, variando entre eles conforme a ausência ou presença de nitrogênio no meio, respectivamente. Para a grande maioria dos estudos envolvendo *C. reinhardtii*, a manutenção da alga é feita mantendo-a sempre no ciclo assexuado, uma vez que os ciclos de mitose podem ser sincronizados por fotoperíodo, alternando a exposição da alga entre presença e ausência de luz a cada 12 horas.⁴⁵ Em nosso estudo, somente o ciclo celular assexuado foi utilizado.

Um esquema representado na figura 6 ilustra as etapas do ciclo celular sincronizado de *C. reinhardtii*. O início do ciclo se dá na hora zero, quando as células adentram o período de luz, e durante todo esse período as células permanecem na fase G1, crescendo e se preparando para a próxima etapa de divisões celulares. Ao final de G1, as células perdem o nucléolo e o núcleo começa a se aproximar da membrana plasmática, adentrando a fase S/M. Na fase de S/M, a célula pode alternar ciclos de S e M por até quatro vezes, resultando em múltiplas divisões celulares, que dependem diretamente das condições de crescimento celular: quanto maior a intensidade de luz e a temperatura, dentro das condições ideais para o crescimento de *Chlamydomonas*, maior o número de células filhas resultantes.⁴⁴

Figura 6 - Esquema do ciclo celular sincronizado por fotoperíodo em 24 horas. As primeiras 12 horas correspondem ao período de luz, onde as células permanecem na fase G1 do ciclo celular, crescendo em tamanho. Após o início do período de 12 horas de escuro, as células começam a sintetizar proteínas e organelas para adentrar a fase de mitose, onde podem ocorrer de duas a quatro divisões nucleares, o que pode resultar em até 16 células filhas após a conclusão da divisão celular. Após liberadas no meio, as células filhas permanecem em G0 até o final do período escuro e entrarão em G1 com um novo período de luz.

Fonte: Adaptada de HARRIS.⁴⁴

Durante a prófase, os corpos basais que originam os flagelos começam a se replicar e a migrar para os polos nucleares, adquirindo a função de centríolos. Já em metáfase, o núcleo adquire uma forma alongada, os cromossomos se alinham e os microtúbulos associados a ele se direcionam aos polos, havendo então a formação do anel de actina no centro do fuso celular. Em *C. reinhardtii*, o plano de clivagem da divisão celular não é longitudinal, como ocorre em outras espécies de *Chlamydomonas*, mas sim transversal à inserção flagelar da parede celular original e uma vez ocorrida a divisão, as células filhas são liberadas no meio e permanecem na fase G0 até o final do período escuro, adentrando em G1 na hora zero do ciclo celular, quanto as células são expostas novamente à luz.⁴⁴

1.2.3 Os flagelos de *Chlamydomonas reinhardtii*

A estrutura celular simples, a facilidade de manipulação e manutenção e o potencial para estudos de biomoléculas tornaram *Chlamydomonas* um organismo modelo para o estudo da biogênese e função flagelar eucarionte, além do conhecimento mais profundo de ciliopatias em humanos.

Os flagelos tem origem no par de corpos basais anteriores da célula e se prolongam até o meio extracelular. Entre a estrutura propulsora do flagelo e a região de brotamento nos corpos basais está a região de transição, considerada um portão regulatório de proteínas de transporte que entram e saem do flagelo.⁴⁶ Acima da zona de transição está o axonema, formado por um par central de microtúbulos que se estende logo acima da zona de transição até o final do flagelo, envolto por nove pares de microtúbulos, que se conectam diretamente aos corpos basais (figura 7).

Em contato com condições adversas, como baixo pH e estímulos mecânicos ou químicos, o flagelo é rapidamente excisado da célula logo após o fim da zona de transição.⁴⁴ Isto ocorre para proteger a célula de agentes tóxicos, diminuindo a superfície de contato da membrana com o meio. Além da excisão flagelar, *Chlamydomonas* também reabsorve seus flagelos durante o período de mitose, reutilizando os microtúbulos que os compõem para organizar as fibras do fuso. A regeneração flagelar, em ambos os casos, é iniciada rapidamente e pode se completar em até duas horas.⁴⁴

Tanto para a regeneração do flagelo, quanto para o batimento e manutenção há uma constante movimentação de proteínas pelo espaço entre as duplas de microtúbulos que compõem o flagelo. Esse movimento de proteínas é chamado de transporte intraflagelar (TIF). Inicialmente descoberto em *Chlamydomonas*, o TIF foi posteriormente observado universalmente em cílios e flagelos e consiste no carregamento de proteínas sintetizadas no corpo celular para a ponta final do flagelo.⁴⁴

Figura 7 - Microscopia eletrônica de transmissão de *C. reinhardtii*. (1) Corpos basais; (2) Zona de Transição; (3) Flagelo.

Fonte: SMITH et al^{*}

1.3 SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA

RNA de interferência (iRNA) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional utilizado por diversos eucariotos como meio de controlar a transcrição de suas proteínas.⁴⁷ A primeira descrição de iRNA ocorreu em 1998, por Fire e colaboradores, no nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Os pesquisadores buscavam compreender a inibição da expressão gênica por RNA e para isso fizeram uma mistura de RNA's complementares (*sense* e *antisense*), que gerou um RNA dupla-fita (dsRNA) com potencial de silenciar genes pelo menos 10 vezes mais potente do que os RNA's *sense* ou *antisense* sozinhos.⁴⁸

Os estudos de Fire expandiram as possibilidades de estudos de iRNA em outros organismos. Até então, tinha-se conhecimento de que genes e transgenes adicionados em plantas sofriam algum tipo de supressão da expressão,⁴⁹ mas pouco se sabia dos mecanismos e maquinarias utilizados pela célula para impedir que a proteína fosse transcrita corretamente ou em abundância. Os iRNA's podem afetar a expressão gênica através de diversos mecanismos: em *C. elegans*, descobriu-se que o silenciamento gênico era pós-transcricional e resultava na redução de RNA mensageiro (mRNA) do gene

^{*} Disponível em: <<http://remf.dartmouth.edu/images/algaeTEM/index.html>>. Acesso em: 23 Jan. 2017.

correspondente; em algumas plantas, a presença de dsRNA induz metilação no gene correspondente ao RNA silenciador.

A maquinaria proteica responsável por esse silenciamento por RNA foi primeiramente isolada de extratos celulares de *Drosophila* e recebeu o nome de RISC (*RNA-induced silencing complex*).⁵⁰ Posteriormente, descobriu-se que ela era parte de complexo mecanismo de processamento de iRNA que resulta em silenciamento gênico por desestabilização do mRNA.

Primeiramente, o dsRNA produzido é enviado para o citoplasma, onde sofre a ação da RNase Dicer e é clivado em um RNA de interferência menor com aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse dsRNA pode ser considerado precursor tanto de um pequeno RNA de interferência (siRNA), caso o duplex de RNA formado tenha uma dupla-fita com ligações parciais, ou pode ser um precursor de micro-RNA de interferência (miRNA), em que todas as ligações da dupla fita são.⁵¹ O siRNA ou miRNA é linearizado, gerando um RNA de fita única, e agregado aos complexos de silenciamento (RISC) que mediam a clivagem do mRNA. Uma vez montada a maquinaria, uma proteína de clivagem conhecida como Argonauta (Ago) realiza a clivagem do mRNA e impede que ele seja transcrito em proteína.^{47,50}

1.3.1 iRNA em *Chlamydomonas reinhardtii*

A publicação do genoma de *C. reinhardtii* por Merchant e colaboradores, em 2007,⁵² revelou a presença da maquinaria proteica necessária para realizar silenciamento gênico, por possuir genes codificantes tanto para as nucleases Dicer e Argonauta. A partir desse estudo, Molnar e colaboradores⁵¹ mostraram que a alga possui miRNA, precursores de miRNA e espécies de siRNA além da maquinaria para silenciamento gênico, sinalizando que o silenciamento por RNA é uma característica primitiva em eucariotos, anterior ao aparecimento de organismos multicelulares.

A descoberta de miRNA em *Chlamydomonas* foi um precursor para o desenvolvimento de micro-RNA's de interferência artificiais (amiRNA), como uma nova maneira de inativar a expressão de um gene no organismo. Em 2009, Molnar e colaboradores⁵³ e Tao Zhao e colaboradores⁵⁴ propuseram maneiras de se utilizar o amiRNA como uma técnica de manipulação genética de *Chlamydomonas*, inativando genes por silenciamento de RNA. Ambos desenvolveram vetores capazes de superexpressar um amiRNA correspondente a um gene de interesse e mostraram a eficiência do silenciamento gênico pela redução na quantidade da proteína de interesse.

O delineamento das sequências de amiRNA contra um gene de interesse pode ser realizado na plataforma Web MicroRNA Designer (Ossowski e Fitz, Web MicroRNA

Designer^{2**}), capaz de gerar sequências de amiRNA específicas contra a sequência de um gene de interesse para clonagem nos vetores desenvolvidos no estudo de Molnar.

1.3.2 A septina de *Chlamydomonas reinhardtii*

As Clorófitas (algas verdes, incluindo *Chlamydomonas*) divergiram dos Streptófitos (plantas terrestres e parentes próximos) há cerca de 1 bilhão de anos. Com a disponibilização do genoma de *C. reinhardtii*,⁵² análises genômicas comparativas permitiram que muitos genes fossem rastreados e relacionados a seus ancestrais. A partir dessas análises, observou-se que muitos genes de *Chlamydomonas* e de angiospermas são derivados de genes de um vegetal ancestral, incluindo aqueles associados às funções de fotossíntese.⁵² Por outro lado, há certos genes compartilhados entre *Chlamydomonas* e animais, atribuídos ao último ancestral comum vegetal-animal. Claramente, muitos destes genes foram perdidos em angiospermas, o que deve ter sido o caso do gene para septina, ausente nos vegetais.

Em um trabalho de análise filogenética usando sequências de septinas, baseada na conservação do domínio central, a septina de *Chlamydomonas* foi incluída num ramo junto às septinas de Protistas como *Tetrahymena* e *Paramecium* (Figura 8).¹²

Todos os organismos incluídos neste clado, chamado Protista-específico, apresentam mais de uma septina, exceto as algas *C. reinhardtii* e *Nannochloris* ssp., as quais possuem uma única septina.⁵⁵⁻⁵⁶

Um trabalho foi publicado destacando a importância da alga *C. reinhardtii* no estudo das septinas, uma vez que este organismo possui apenas uma proteína deste grupo.⁵⁶ Neste trabalho foi revelado que a septina de *C. reinhardtii* apresenta os motivos conservados G1, G3 e G4 do *P-loop* e possui uma baixa probabilidade de apresentar estruturas do tipo *coiled-coil* no C-terminal, comum para muitas septinas. Além disso, a septina de *C. reinhardtii* apresenta uma conservação dos elementos necessários para formação de filamentos descritos por Sirajuddin e colaboradores em 2007, o que sugere a possibilidade de polimerização desta septina.⁵⁶

Recentemente, a estrutura do domínio GTPase da septina de *Chlamydomonas* foi resolvida por cristalografia de raios-x em nosso grupo, revelando características únicas desta molécula, como a taxa de hidrólise mais rápida em relação às demais septinas descritas e a presença de um *arginine finger* na interface de interação entre os monômeros, sugerindo que a CrSept atue como autoativadora da hidrólise GTP.⁵⁷ Além disso,

** Disponível em: <<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>>. Acesso em: 23 Jan. 2017.

comparações entre sequência da CrSept com outras septinas mostraram similaridade alta somente com organismos próximos evolutivamente, sendo de 80% para *Volvox carteri* e 55% para *Monoraphidium neglectum*. Para outras algas como *Nannochloris baccilaris* e *Chlorella variabilis*, a similaridade chega a 33% e 36%, respectivamente, caindo para cerca de 30% quando comparada a septinas de *opisthokont* mais distantes, como *Homo sapiens*, *Schistosoma mansoni* e *Caenorhabditis elegans*.⁵⁷

Figura 8 - Esquema da árvore filogenética dos domínios centrais e conservados das septinas.

Fonte: WLOGA et al.¹⁴

1.4 JUSTIFICATIVA DE ESTUDO

As septinas fazem parte de uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina e já foram descritas em protozoários, fungos, animais e recentemente em algas. Estudos estruturais revelaram a formação de heterofilamentos de septinas, porém a formação desses heteropolímeros e sua relação com ligação e hidrólise de GTP é ainda incerta.³⁵ Além disso, a possibilidade de formação de homofilamentos de septinas nesses organismos e sua funcionalidade são controversas até o momento. A alga *C. reinhardtii* é um organismo modelo que divergiu a muito do ancestral comum a plantas e metazoários e possui uma única septina (CrSept), permitindo assim estudos voltados à existência e funcionalidade de homofilamentos destas proteínas.¹²

Há poucos trabalhos na literatura sobre as septinas dos Protistas e, além disso, somente *C. reinhardtii* e outras algas aparentadas apresentam uma única septina, tornando-a um organismo muito atraente para o estudo de homofilamentos de septinas. Neste contexto, conhecer o papel que esta septina desempenha num organismo primitivo como *C. reinhardtii* e, principalmente, se tal função envolve a formação de homofilamentos, é relevante para o entendimento de como essas proteínas trabalham e a quais funções fundamentais podem ser associadas.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo central caracterizar a função dessa proteína analisando sua rede protéica de interações e sua localização intracelular permitindo inferir sobre a função primordial desempenhada pelas septinas. Com isso, os objetivos específicos traçados para esse estudo foram:

- Realizar experimentos de duplo híbrido em leveduras em busca de parceiros protéicos de interação.
- Realizar experimentos de silenciamento do gene CrSept em *C. reinhardtii* e analisar os possíveis fenótipos.
- Monitorar a expressão do gene CrSept numa cultura de *C. reinhardtii* com ciclo celular sincronizado para determinar se CrSept tem expressão restrita ou alterada em alguma fase do ciclo celular, a fim de correlacionar estes dados com sua função.
- Verificar a localização *in situ* da proteína CrSept por imunomarcação e análise por microscopia confocal. Estes experimentos também foram realizados com células sincronizadas e visaram detectar os locais de maior concentração da proteína no interior da célula, correlacionando à fase do ciclo celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ENSAIOS DE DUPLO-HÍBRIDO

3.1.1 Cepa de levedura utilizada e vetores de duplo-híbrido

A cepa de levedura *S.cerevisiae* L40 (*trp1*-901, *his3*_200, *leu2*-3, *ade2* LYS2::(*lexAop*)4-HIS3 URA3::(*lexAop*)8-lac) foi utilizada para os ensaios de duplo híbrido neste trabalho. A L40 possui *trp1*, *leu2*, e *ade2* como marcadores genéticos, além de uma cópia cromossomal dos genes *HIS3* e *LacZ*, cuja atividade é controlada pelo promotor LexA.

Os três vetores (pBTM116*, pLexA_N e pLexA_C) utilizados nos ensaios de duplo híbrido tem como marca de seleção o gene *TRP1*, um marcador nutricional utilizado em leveduras com genótipo *Trp*⁻. Além disso, os três plasmídios possuem o domínio LexA de ligação ao DNA. Os sítios de restrição utilizados em todas as construções foram os das enzimas *EcoRI* e *SalI*, e todos os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que as sequências *Forward* fossem flanqueadas pela sequência GAATTC, correspondente à enzima *EcoRI*, e todas as sequências *Reverse* foram flanqueadas pela enzima *SalI* (GTCGAC).

De forma geral, todas as construções foram amplificadas por reação de PCR específica, e após confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE, todas as construções foram purificadas do gel com o auxílio do kit de purificação *Wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega) e ligadas ao vetor pGEMT-Easy através de reação de ligação com a enzima T4 ligase, conforme orientação do fabricante. As reações de ligação permaneceram a 4°C por 16h e foram utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com cloreto de cálcio.⁵⁸ As células foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina [100 µg/mL], IPTG [0,5 mM] e X-Gal [100 µg/mL]. As placas foram incubadas a 37°C por 16h.

Colônias brancas (positivas) de cada uma das construções foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina [100 µg/mL] e deixadas sob agitação constante a 37°C, por 16h. O DNA plasmidial foi extraído e analisado através de uma reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*.

As análises de restrição foram feitas com cerca de 500 ng de DNA, 1U de enzima *EcoRI fast digest*, 1U de enzima *SalI fast digest*, tampão *fast digest* [1x] e água para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 2h, e analisadas em gel de agarose 0,8% em tampão TAE após eletroforese. As bandas de interesse e correspondentes ao tamanho do fragmento esperado foram purificadas e quantificadas.

Cerca de 45 ng de cada fragmento purificado foi utilizado para ligação nos vetores pBTM116*, pLexA_N e pLexA_C, abertos pelas enzimas *EcoRI* e *Sall*, através de uma reação com a enzima T4 ligase. O volume das reações de ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, células DH5 α , que foram plaqueadas em meio LB contendo 50 μ g/mL do antibiótico de seleção canamicina.

Após selecionar quatro colônias de cada construção, o DNA plasmidial foi extraído e quantificado, e a confirmação da ligação foi feita por análise de restrição, seguida de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE.

Os clones positivos para a reação de ligação foram sequenciados com o oligonucleotídeo detalhado na tabela 1 e, posteriormente, utilizados no ensaio de duplo híbrido.

Tabela 1 - Oligonucleotídeo utilizado na reação de sequenciamento dos insertos ligados ao vetor pBTM116*. *T_m* corresponde à temperatura de *melting* dos primers.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' a 3')	<i>T_m</i> (°C)
pBTM116*_Fw	CAGGATGTACGTAACGG	54,6°C

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Joci Neuby Alves Macedo.

3.1.1.1 Vetor pBTM116*

O vetor pBTM116* foi delineado no laboratório do Dr. Nilson Zanchin (LNLS) e gentilmente cedido para os ensaios de duplo híbrido pela Dra. Joci Neuby. O vetor pBTM116* corresponde ao plasmídeo pBTM116 cuja marca de seleção foi substituída de ampicilina por canamicina (Anexo A).

Após confirmação da identidade sequencial da *CrSept* à sequência depositada no banco de dados, o gene foi amplificado com oligonucleotídeos específicos para obtenção da região codificante de CrSeptNGC e da construção truncada CrSeptNG, contendo somente os domínios N-terminal e GTPase, no vetor pBMT116* de duplo híbrido (tabela 2). A versão CrSeptNG possui 393 aminoácidos (aminoácido 1 ao 393), cuja amplificação de seu fragmento codificante foi realizada com um oligo *Reverse* específico em conjunto com o oligo CrseptNGC-Fw (*EcoRI*) (tabela 2).

Para a reação de PCR, utilizou-se a enzima *High Fidelity Enzyme Mix* (*Thermo Scientific*), aproximadamente 70 ng de DNA molde, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM dNTP, tampão HF [1x], 3% DMSO, 1U de enzima *High Fidelity Enzyme Mix* e água para volume final de 50 μ L de reação. A amplificação por PCR constituiu um ciclo inicial de 94°C por 10 min; seguido de nove ciclos a 94°C por 1min, gradiente de temperatura 62°C, 64°C,

66°C, 68°C por 30 s e 72°C por 1 min; seguido por mais 24 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C, 66°C, 68°C ou 70°C por 30 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 10 min.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação da *CrseptNGC* e *CrseptNG*. As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. *T_m* corresponde à temperatura de *melting* dos primers.

Oligonucleotídeo e enzima de restrição correspondente	Sequência (5' a 3')	<i>T_m</i> (°C)
CrseptNGC-Fw (<i>EcoRI</i>)	<u>CGAATTC</u> ATGTCCAGCACCTATCAGAAGTTTGCTGC	67,8
CrseptNGC-Rv (<i>SaII</i>)	CGT <u>CGAC</u> TTAGAAGCCCCAGCCCTTCTTGG	70,2
CrseptNG-Rv (<i>SaII</i>)	CGT <u>CGAC</u> TTAGCCCAGGGTGGTGCGGCG	73,7

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Joci Neuby Alves Macedo.

3.1.1.2 Vetor pLexA_N (Dualsystems Biotech)

A versão truncada da CrSept codificando somente o domínio GTPase - CrSeptG - foi ligada ao vetor de duplo-híbrido pLexA_N (Anexo B), adquirido em conjunto com o kit *DUALhybrid kit P01004 (Dualsystems Biotech)*.

Os oligonucleotídeos estão detalhados na tabela 3 em conjunto com a enzima *Phusion (BioLabs)*, em uma reação contendo 20 ng de DNA molde, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM dNTP, tampão *Phusion* [1x], 3% DMSO, 1U de enzima *Phusion* e água para volume final de 50 µL de reação.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação da *CrseptG*. As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. *T_m* corresponde à temperatura de *melting* dos primers.

Oligonucleotídeo e enzima de restrição correspondente	Sequência (5' a 3')	<i>T_m</i> (°C)
CrseptG(E86)-Fw (<i>EcoRI</i>)	AGAATTCGAGATGGTGTTCGGCAAGGAC	62,1
CrseptG(K107)-Rv (<i>SaII</i>)	ATGTCGACTTAGCCCAGGGTGGTGC	64,7

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Andressa Patrícia Alves Pinto.

O ciclo de amplificação foi de: 30 s a 98°C, seguido de 10 ciclos de 10s a 98°C, 20s a 63°C, 1min a 72°C, seguido de mais 20 ciclos de 10s a 98°C, 20s a 65°C e 1min a 72°C, finalizando com uma extensão final a 72°C por 5min. O fragmento amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE, e a banda de interesse foi purificada e quantificada.

3.1.1.3 Vetor pLexA_C (Dualsystems Biotech)

O vetor pLexA_C (o kit *DUALhybrid kit P01004 - Dualsystems Biotech*), diferentemente dos vetores pBTM116* e pLexA_N, permite que a isca esteja fusionada ao domínio de ligação do DNA (DBD) pela porção C-terminal, enquanto nos vetores convencionais a fusão é feita pela porção N-terminal (Anexo C). Visando uma construção que permitisse fusionar a proteína CrSept inteira ao DBD pela porção C-terminal, foi preciso delinear oligonucleotídeos especiais, para uma construção que permitisse expressar o DBD ligado ao domínio C-terminal da proteína CrSept.

A adaptação para expressão no vetor pLexA_C foi feita com a retirada do *Stop codon* da sequência codificante da CrSept, além da adição de uma quadra se adeninas ao início da sequência gênica da proteína, a fim de permitir o anelamento e transcrição do gene de interesse na levedura. Os oligonucleotídeos delineados para clonar o gene *Crsept* sob as condições necessárias para expressão no vetor pLexA_C (tabela 4) foram utilizados para amplificar o fragmento de interesse por uma reação de PCR.

A reação de PCR foi feita com a enzima *High Fidelity Enzyme mix*, em uma reação de 50 µL contendo 20 ng de DNA molde, 0,2 µM de cada um dos oligos, 0,2 mM dNTP, DMSO 3%, tampão *HF* + MgCl₂ [1x], 1U de enzima e água para completar o volume. A amplificação ocorreu em termociclador, sendo o ciclo inicial a 94°C por 3min, seguido de sete ciclos a 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 1,5min, seguido por mais 20 ciclos a 94°C por 30s, 65°C por 30s e 72°C por 1,5min, finalizando com uma extensão final a 72°C por 10min.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da CrseptNGC em pLexA_C. As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição. *T_m* corresponde à temperatura de *melting* dos primers.

Oligonucleotídeo e enzima de restrição correspondente	Sequência (5' a 3')	<i>T_m</i> (°C)
CrSept_C_Fw (<i>EcoRI</i>)	AGAATT <u>C</u> AAAAATGTCCAGCACCTATCAGAAG	59,3°C
CrSept_C_Rv (<i>SalI</i>)	AGT <u>CGAC</u> GGAAGCCCCAGCCCTTCTTG	64,3°C

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2 Transformação em pequena escala

As diversas construções da CrSept para expressão em leveduras pelo ensaio de duplo-híbrido tiveram como finalidade aumentar as possibilidades de encontrar interações

entre proteínas parceiras à septina após a cotransformação com a biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii*.

O protocolo abaixo foi utilizado para as quatro construções da CrSept, os vetores fechados (sem inserto) foram utilizados como controle positivo da transformação e água foi utilizada como controle negativo.

Inoculou-se uma colônia isolada da cepa L40 de *S.cerevisiae* em 50 ml de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose), mantido sob agitação constante de 150 rpm, a 30°C, por cerca de 24 horas, até atingir a absorbância maior ou igual que 1,5 a 600 nm. Para cada reação de transformação, uma alíquota de 1 mL da cultura crescida em meio YDP teve as células coletadas por centrifugação a 500 rpm por 3 minutos. As células foram ressuspensas 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), com adição de 100 µg de esperma de salmão desnaturado (95°C por 10 minutos seguidos de 10 minutos em gelo) e cerca de 200 ng de DNA plasmidial. Em seguida, a suspensão celular foi incubada a 45°C em banho-maria por 40 minutos, sendo homogeneizada a cada 10 minutos por agitação leve. As células foram espalhadas em placas de *petri* (140 x 15 mm) contendo o meio seletivo SD-W (Anexo D) e incubadas a 30°C por 4 dias.

3.1.3 Ensaio da β -galactosidase em papel filtro

Após a transformação em baixa escala, as leveduras expressando o domínio de ligação ao DNA - isca (construção CrSept) foram submetidas ao ensaio da β -galactosidase para confirmar que a isca, por si só, não era capaz de ativar o sistema de transcrição.

Colônias isoladas de leveduras transformadas foram repicadas em meio SD-W e incubadas a 30°C por 3 dias. Após este período, iniciou-se o ensaio por recortar duas folhas de papel filtro com o diâmetro da placa onde as leveduras haviam sido repicadas. Uma das folhas de papel foi colocada sobre as colônias da placa de *petri* e levemente pressionada com uma alça de vidro para que as células aderissem ao papel. Em seguida, este papel foi imerso em nitrogênio líquido por 5 minutos para promover a lise celular. Decorridos 5 minutos, o papel foi retirado do nitrogênio líquido e cuidadosamente posicionado em uma placa de *petri*, com a face contendo as células voltada para cima, sobre o outro papel de filtro, umedecido em 5 mL de tampão Z (16,1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g/L KCl, 0,246g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0), 13,5 µL de β -mercaptoetanol e 0,8 mM de X-Gal. O papel filtro foi incubado a 37°C por cerca de 2 horas, até o aparecimento de colônias azuis. O controle positivo utilizado neste ensaio foi a construção pGAD424-SEPT4,

identificada como autoativadora do sistema de transcrição³⁸ e gentilmente cedido pela Dra. Joci Neuby.

3.1.4 **Teste 3-AT (3-amino-1, 2, 4-triazol)**

O 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) é um inibidor do produto do gene *HIS3* e é utilizado para evitar que escapes de expressão do gene repórter *HIS* ocorram. O teste do 3-AT delimita a quantidade mínima do competidor necessária para inibir o crescimento de escapes, mas que não comprometa o crescimento das leveduras que possam ter interação com outras proteínas.

Para determinar a mínima concentração de 3-AT antes de dar continuidade à transformação em larga escala com a biblioteca de *C. reinhardtii*, as mesmas colônias que foram submetidas ao ensaio da β -galactosidase foram também plaqueadas em meio SD-W contendo 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mM de 3-AT e incubadas a 30°C por 7 dias, a fim de determinar a mínima concentração do composto na qual as proteínas BD-isca mantivessem colônias com crescimento menor a 1 mm.

3.1.5 **Transformação em larga escala: Varredura da biblioteca de cDNA**

Para a busca de proteínas de interação à CrSept, foi utilizada uma biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii* para duplo-híbrido adquirida da empresa DualSystem Biotech™ (*Chlamydomonas reinhardtii* DUALhybrid cDNA library P02111). Esta biblioteca foi sintetizada em vetor pGAD-HÁ a partir de sequências de RNA poli-adenilados.

Três colônias pré-transformadas com pBTM116*_CrSeptNGC, pBTM116*_CrSeptNG, pLexA_N_CrSeptG ou pLexA_C_CrSeptNGC foram transferidas para 1 mL de meio SD-W e ressuspensas por agitação vigorosa, para depois serem inoculadas em 75 mL de meio SD-W. O inóculo foi incubado a 30°C sob agitação constante de 150 rpm, por cerca de 24h, até atingir a absorbância maior ou igual a 1,5 a 600 nm. As células foram coletadas por centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos, a 21°C, e posteriormente inoculadas em 500 mL de meio YPD, onde permaneceram incubadas a 30°C, sob agitação constante de 150 rpm, por cerca de 2 horas, até atingir a concentração determinada pela absorbância entre 0,4 e 0,6 a 600 nm. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos a 21°C e ressuspensas em 200 mL de tampão TE [1x] (Anexo E), e novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores. O precipitado formado foi então ressuspenso em 4 mL de tampão TE/LiAc [1x] (tabela 6) e duas alíquotas de 200 μ L foram retiradas para serem utilizadas como transformação controle. Ao volume celular foram adicionados 10 mg de DNA de esperma de salmão desnaturado (95°C por 15

minutos seguido de 10 minutos em gelo), 20 µg da biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii* (Dualsystems Biotech) e 30 mL de PEG/LiAc (Anexo E). A mistura foi novamente incubada a 30°C, sob agitação constante de 150 rpm, por 30 minutos e posteriormente as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 15 minutos seguido de 3 minutos em gelo. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm, 21°C por 5 minutos e ressuspensas em 5 mL de tampão TE [1x] (Anexo E). Como o teste do 3-AT revelou que não havia necessidade de suplementar o meio de seleção SD-WLH com o composto, alíquotas celulares de 250 µL foram espalhadas em cerca de 20 placas de *petri* (140 mm x 15 mm) contendo o meio de seleção SD-WLH. Paralelamente, a eficiência da transformação foi analisada em placas SD-WL através de titulações de 1:10, 1:100 e 1:1000 da suspensão celular. As placas foram incubadas a 30°C por 6 dias e o crescimento de colônias foi monitorado diariamente para seleção daquelas que apresentavam diâmetro maior que 2 mm.

Em conjunto com a transformação utilizando-se o cDNA da biblioteca de *C. reinhardtii*, foram feitas transformações controle adicionando-se 600 µL de PEG/LiAc, 100 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado e 10 µL de água ou 200 ng do vetor pGAD-HA às alíquotas de 200 µL retiradas da suspensão celular. O processo de transformação ocorreu da forma descrita acima e as células foram ressuspensas em 250 µL de TE [1x]. A transformação com pGAD-HA foi espalhada em meio seletivo SD-WL, e a transformação com água foi plaqueada em meio SD-WLH.

Seis dias após a transformação, as colônias transformantes foram repicadas em meio SD-WLH para realização do teste da β-galactosidase, com o intuito de encontrar colônias azuis para certificação da interação entre as proteínas isca e presa.

3.1.6 Extração do DNA plasmidial de leveduras

A extração do DNA plasmidial de leveduras foi modificada a partir do método descrito por Ling e colaboradores (1995),⁵⁹ no qual utiliza-se liticase para digestão da parede celular, seguida de tratamento com SDS.

Os clones de levedura positivos para o ensaio da β-galactosidase foram inoculados em meio SD-L a fim de se retirar a pressão seletiva para o aminoácido triptofano, dessa maneira permanecendo somente o plasmídio contendo a presa, proveniente da biblioteca, para a extração. O inóculo em SD-L foi incubado a 30°C, por 24 horas, sob agitação constante a 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e posteriormente ressuspensas em 60 µL de Tris 50 mM, pH 8,0. À suspensão celular foram adicionados 100 ng de liticase. Após agitação vigorosa, a suspensão foi incubada a 37°C por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos. Decorrido este período, 20 µL

de SDS 20% foram adicionados à solução, seguido de agitação vigorosa por 1 minuto. As amostras foram submetidas a 10 ciclos de 20 segundos em nitrogênio líquido e 20 segundos de banho-maria a 42°C e posteriormente adicionou-se 100 µL de água estéril e 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v). A mistura foi agitada vigorosamente por 1 minuto e logo após separou-se a fase aquosa da fase orgânica por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto. A fase aquosa (aproximadamente 300 µL) foi transferida para um novo microtubo, com adição de 10 µL de LiAc 8M e 300 µL de etanol absoluto gelado. Após homogeneizada, a mistura foi armazenada a 20°C por 20 minutos e o DNA foi precipitado por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto. A lavagem do precipitado foi feita com 500 µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação por 1 minuto a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, após secar à temperatura ambiente, foi ressuspensão em 30 µL de água estéril.

Metade do volume da suspensão de DNA plasmidial de levedura (15 µL) foi utilizada para transformar células *E. coli* DH5α por choque térmico, e as células transformadas foram espalhadas em meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina.

3.1.7 Extração plasmidial de bactérias

Os clones bacterianos positivos foram inoculados em 5 mL de meio LB sob seleção de 50 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 16 horas para posterior extração plasmidial por lise alcalina (Sambrook, 2001).⁵⁸

3.1.8 Sequenciamento de DNA e análise das sequências

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos clones AD-presa do ensaio de duplo híbrido. *T_m* corresponde à temperatura de *melting* dos primers

Oligonucleotídeo para vetor pGAD-HA	Sequência (5' a 3')	<i>T_m</i> (°C)
pBTM116*_Fw	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACC	56,7°C

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Dra. Joci Neuby Alves Macedo.

Após a extração do DNA plasmidial de bactérias, as amostras foram sequenciadas com o oligonucleotídeo apresentado na tabela 5 e as sequências de nucleotídeos foram submetidas a análise de similaridade a sequências depositadas no *GeneBank*. Primeiramente identificou-se a sequência do adaptador (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3') presente no vetor da biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii* adquirida da empresa *Dualsystems Biotech*. A sequência de nucleotídeos imediatamente após o fim da sequência do adaptador foi

utilizada para a análise de similaridade através da plataforma *blastx*^c. Apenas os clones que se apresentaram na fase aberta de leitura (*frame +1*) foram utilizados posteriormente.

3.1.9 Validação do clone de interação CrSAHH: Clonagem, expressão e purificação

A sequência de nucleotídeos correspondente ao CDS dos genes para a proteína CrSAHH foi isolada a partir do cDNA total por uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos. Após confirmação de identidade por sequenciamento, os possíveis clones de interação foram inseridos no vetor de expressão pET-SUMO e transformados na linhagem Rosetta (DE3) de *E.coli* por choque térmico. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 0.5 mM de IPTG. Após a incubação, a cultura foi centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm e o *precipitado* foi ressuspensão em tampão Tris-HCl pH 8.0, 0,3 M NaCl, 10% glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol. A lise celular foi feita por sonicação com intensidade de 15% em intervalos de 30 segundos e repouso em gelo, por 5 minutos. As células lisadas foram centrifugadas por 20 minutos a 16000 g a 4°C, separando a parte solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado).

A porção solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel, lavada com 10 volumes do mesmo tampão, 10 volumes de tampão contendo de 0,1% de Triton X-100 e 10 volumes de tampão acrescido de 5 mM de imidazol. A resina foi então ressuspensa com 4 mL de tampão contendo a enzima Sumo protease (0,2 mg de protease para 10 mg de proteína de fusão) e incubada a 4°C, por 16 horas. Posteriormente, a proteína CRSAHH foi eluída sem a fusão.

O eluato da proteína purificada foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 (10/300 GL, GE HealthCare)* acoplada ao sistema AKTA purifier (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 8.0, 0,3 M NaCl, 10% glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol. Foram aplicados 1 mL de eluato de proteína e somente o pico correspondente à proteína foi coletado.

3.1.9.1 Expressão e purificação da construção CrSeptG

A construção CrSeptG foi inserida no vetor pET-SUMO e clonada em *E.coli*, linhagem *Rosetta* (DE3) para expressão. A expressão da proteína recombinante foi induzida por 0.5 mM de IPTG e as células foram coletadas por centrifugação se forma semelhante à CrSAHH.

O lisado (extrato bruto) foi submetido à cromatografia por afinidade em resina de níquel e eluído, em fusão com a SUMO, em 4 mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8, contendo 0,3M de NaCl, 10% glicerol, 5mM de β -Mercaptoetanol e 2mM de $MgCl_2$, com

adição de 500 mM de imidazol. O eluato foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 (10/300 GL, GE HealthCare)* acoplada ao sistema AKTA purifier (GE Healthcare) e o pico referente à proteína foi coletado. As amostras foram quantificadas por absorbância direta a 280 nm.

3.1.9.2 Ensaio de *pulldown* com imobilização de CrSeptG+SUMO

A proteína CrSeptG+SUMO foi imobilizada em resina de níquel e deixada incubar a 4°C por duas horas. Posteriormente, o dobro em concentração (μ M) da proteína CrSAHH purificada foi adicionada à coluna e deixada incubar a 4°C por duas horas e uma solução de tampão contendo SUMO-protease foi adicionada à resina. O eluato foi coletado e analisado em SDS-PAGE.

3.1.9.3 Ensaio de *pulldown* com imobilização da CrSAHH-SUMO

De forma semelhante, a proteína CrSAHH+SUMO foi imobilizada em resina de níquel, onde permaneceu em incubação por duas horas a 4°C antes da adição da proteína purificada CrSeptG. As proteínas foram incubadas por duas horas a 4°C antes de serem eluídas com 500 mM de imidazol e analisadas em SDS-PAGE.

3.1.9.4 Ensaio de *pulldown* por cromatografia de afinidade com imobilização da fusão GST-CrSAHH

O teste de *pulldown* com imobilização da fusão GST-SAHH na resina de Glutathione-Sepharose foi feito a partir da clonagem do CDS do gene *CrSAHH* no vetor de expressão pGEX_5x-1, que permite a expressão do gene fusionado à *tag* GST. Os oligonucleotídeos utilizados para a construção estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Primers utilizados para clonagem do gene CrSAHH no vetor de expressão pGEX_5x-1

Oligonucleotídeo	Restrição	Sequência	Tm (°C)
SAHH_pGEX_Fw	BamHI	5' GGATCcttATGGCCCTCTCCGTCGACCAC 3'	64
SAHH_Rv	XhoI	5' CTCGAGTTAGTAGCGGTAGTGGGCGGGCT 3'	64

Fonte: Elaborada pela autora.

A construção de CrSAHH em pGEX_5x-1 foi propagada em células DH5 α de *E. coli* e sua identidade à sequência de CrSAHH foi confirmada por sequenciamento. A construção,

então, foi transformada em células de *E.coli* Rosetta (*DE3*). A expressão da fusão GST-CrSAHH foi induzida com 500mM de Imidazol e a purificação foi realizada em resina de Glutathione-Sepharose. O tamanho estimado da fusão GST-CrSAHH é de 79 kDa. O tampão utilizado para purificação da fusão GST-SAHH, Tampão A, contém 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 5% Glicerol, 5mM β -Mercaptoetanol. O volume de coluna utilizado para a purificação foi de 700 μ L e o volume de eluição da fusão GST-SAHH foi de 2 volumes de coluna.

Posteriormente, o ensaio de *pulldown* foi realizado com 100 μ L de resina Glutathione Sepharose, à qual foram adicionados 5 μ M de GST-SAHH. O ensaio foi realizado a 4°C. A fusão GST-SAHH foi adicionada à resina e mantida em incubação com agitação leve e constante por 60 minutos. A amostra foi centrifugada a 1500 g por 3 minutos para retirada do eluato não ligado de GST-SAHH e a resina foi lavada com 10 vc de tampão B (50mM Tris pH8.0, 150 mM NaCl, 2mM $MgCl_2$, 5mM β -Mercaptoetanol e 5% Glicerol), 10vc tampão B + 0,1% Triton e 10vc de tampão B novamente antes da adição da construção CrSeptG. Após a adição, a resina foi mantida a 4°C sob agitação por 30 minutos antes do eluato não ligado ser removido. A resina foi lavada com 10vc de coluna por três vezes antes da eluição da GST-SAHH com 2vc contendo 10 mM de glutathione reduzida.

3.1.10 Validação por ensaio de Crosslink

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em resina de níquel seguidas de cromatografia de exclusão molecular e eluídas em tampão A. Para o ensaio, foi feito o processo de *dessalting* em coluna *HiTrap Desalting*, trocando o tampão contendo o agente tamponante Tris para o tampão C (20 mM Fosfato pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoetanol e 5% glicerol).

O ensaio de *crosslink* foi realizado primeiramente com 20 μ M de cada uma das proteínas (CrSeptG e CrSAHH). Foram utilizadas cinco concentrações variadas do agente *cross-linker Ethylene glycol-bis (succinic acid N-hydroxysuccinimide ester)* (EGS), Thermo Scientific®, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a concentração final do reagente 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mM. Foram feitos 3 ensaios, em temperatura ambiente, para cada condição, sendo eles: a) Interação entre CrSeptG e CrSAHH; b) Controle de interação entre CrSeptG x CrSeptG; e c) Controle de interação CrSAHH x CrSAHH. Em cada ensaio, as proteínas foram coletadas nos tempos de 1min, 2min, 5min, 10min, 15min, 30min, adicionadas a tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 12,5% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2% SDS, 0,003% azul de bromofenol) e fervidas para posterior eletroforese em SDS-PAGE 15%.

Em paralelo, foi realizado um ensaio de Crosslink com o agente DSS (disuccinimidyl suberate), utilizando-se 5 μ M de cada proteína. As concentrações do reagente utilizadas foram de 1, 5, 10 e 15 mM. Os tempos de coleta foram 1 min, 5 min, 10 min, 15 min e 30 min e as reações foram realizadas a 0°C (gelo), ao contrário da primeira tentativa com EGS.

Um terceiro ensaio de *Crosslink* foi realizado com 7,5 μ M das proteínas lisadas e purificadas em cromatografia de afinidade em tampão D (20 mM Fostato de Sódio pH 8.0; 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol; 10% glicerol) e eluídas em tampão C após cromatografia de exclusão molecular. O ensaio foi feito realizado em baixa temperatura (gelo) nas concentrações de EGS de 1 mM, 5 mM e 10 mM e as proteínas foram coletadas nos tempos 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min.

3.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DA CrSEPT NAS ETAPAS DO CICLO CELULAR POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

As etapas do ciclo celular de *C. reinhardtii* podem ser determinadas se a cultura estiver sincronizada através da alternância entre períodos de luz e escuro (revisado por Harris, 2009).

Um inóculo da linhagem *WT-12* de *C. reinhardtii* em meio TP (Tris- Fostato) foi incubado a 24°C, sob agitação constante de 150 rpm por sete dias, com alternância de períodos de luz (12 horas claro/ 12 horas escuro) até atingir um volume celular médio de 10⁵ células/ mL. Esta cultura sincronizada foi utilizada para gerar quatro novas culturas, que foram incubadas sob as mesmas condições anteriores, por cinco dias, até atingirem uma concentração média de 10⁵ células/ mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos em quatro períodos do ciclo celular: 0 hora, ou primeira hora do período claro; 8 horas (ainda no período claro); 14 horas (duas horas após o início da fase escura); e 16 horas (quatro horas após o início da fase escura). As células foram congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA total.

3.2.1 Primeiro ensaio de qPCR

A sincronização das algas pelo ciclo celular foi feita em duplicata e a extração do RNA total foi feita manualmente: as células foram maceradas em almofariz, com constante adição de nitrogênio líquido, até adquirirem uma coloração esbranquiçada (aproximadamente por 5 minutos). Adicionou-se 1 mL de reagente *TRI Reagent®* (Sigma) e a solução foi macerada até a mistura liquefazer. Após adição de 500 μ L de clorofórmio, toda a mistura foi transferida a um microtubo de 2 mL, seguido de agitação vigorosa por 30 segundos. Após descansar em bancada por 2 minutos, a mistura foi centrifugada a 12000 g

por 15 min a 4°C, e o volume da camada aquosa (superior) foi transferido para um novo microtubo, com adição de mesmo volume de isopropanol. A mistura foi homogeneizada e deixada descansar por 5 minutos. Precipitou-se o RNA por centrifugação por 10 minutos sob as mesmas condições anteriores, e após descartar o sobrenadante, foi feita uma lavagem com 500 µL de etanol 75%, preparado com água tratada com DEPC. Após outra centrifugação por 5 minutos a 12000 g e 4°C, a amostra foi deixada secar em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, seguido de ressuspensão do precipitado em 70 µL de água DEPC. As amostras foram aliquotadas e congeladas a -80°C, para posterior síntese de cDNA.

Os RNAs congelados foram tratados com o kit *Ambion® turbo DNase* (Life Technologies) para remoção de DNA genômico, e posteriormente o produto da reação foi utilizado como molde para síntese de cDNA com *oligo (dT)* e *random hexamers* do kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR®* (Invitrogen). O cDNA foi utilizado para análise de qPCR.

A análise de expressão gênica por qPCR neste estudo foi feita pelo método comparativo e, devido a isso, foram eleitos três genes de referência, ou normalizadores (*RPL19*, *RPL32*, *Rack1*)^{40,60} cujas expressões mantêm-se constante durante todo ou boa parte do ciclo celular. Posteriormente, foram delineados um par de oligonucleotídeos para cada um dos genes de referência e dois pares para a gene *CrSept* (CS1, localizado na região correspondente ao C-terminal da proteína; CS2, localizado na região correspondente ao domínio GTPase) de modo que todos tivessem de 19 a 21 bases, gerassem *amplicons* de 80 a 150 pb, tivessem temperaturas de *melting* em torno de 60°C e possuísem cerca de 60% do conteúdo de bases GC (Apêndice A). As sequências selecionadas para amplificar os fragmentos de interesse foram analisadas pelas plataformas *Repeat Masker*¹ e *Blast*² para evitar homologia com outros genes.

As análises de qPCR foram realizadas com o sistema de detecção pelo fluorocromo intercalante de DNA EvaGreen, através do kit *SsoFast™ EvaGreen®* (Bio-Rad). A eficiência (E) de amplificação dos pares de nucleotídeo utilizados foi determinada pela fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Rasmussen, 2001). A concentração ótima dos pares de oligonucleotídeos foi definida utilizando-se um *pool* de RNA de todos os tempos de coleta de sincronização e uma variação da concentração dos oligonucleotídeos de 0,25 µM; 0,4 µM; 0,5 µM e 0,7 µM. A validação dos mesmos foi realizada com um *pool* de cDNA em diferentes concentrações (100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,75 ng), gerando uma curva padrão que revelou a eficiência dos pares de oligonucleotídeos, e os valores de *slope* e R^2 da qPCR. Os valores de eficiência dos pares de oligonucleotídeos foram utilizadas nos cálculos de expressão gênica como descrito por Pfaffl em 2001. Os dados dos níveis de expressão foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde Ct representa o ciclo de amplificação

no qual o nível de fluorescência torna-se significativo na fase exponencial do ciclo de amplificação.⁶¹

Para determinar a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados, a curva padrão, validar os *primers* utilizados e analisar a expressão gênica dos grupos experimentais, por reação foram utilizados 1 µL de cDNA de *C. reinhardtii*, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 10 µL de mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) e água para um volume final de reação de 20 µL. A placa de qPCR foi amplificada por um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido por 39 repetições de 95°C por 15 segundos, gradiente de temperatura (58°C, 60°C ou 63°C) por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidos de uma curva de *melting* com aumento de 0,5°C a cada 30 segundos (65°C a 90°C).

3.2.2 Segundo ensaio de qPCR

Para um segundo ensaio da análise de expressão gênica de CrSept, foi adotado um novo método de extração de RNA total, através do kit de extração SV Total RNA Isolation System (Promega). Para cada extração foram utilizados 10 mL de cultura crescida em meio TP por sete dias e o protocolo foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante. Também foram desenhados novos oligonucleotídeos para genes normalizadores, baseados no estudo de transcriptoma de Zones e colaboradores (2015),⁶² onde foi possível identificar genes cuja expressão se mantém mais estável durante o ciclo celular de células sincronizadas por fotoperíodo. Os primers foram desenhados e analisados através do software Beacon Designer™ para que o teor de GC não ultrapasse 60%, a temperatura de anelamento fosse 60°C ± 2°C e o tamanho fosse de 20 ± 2 bases (Apêndice B).

3.3 IMUNOMARCAÇÃO *IN SITU* DA CrSEPT

A imunomarcação da proteína CrSEPT foi realizada com a identificação da proteína por anticorpo primário produzido em coelhos (Rabbit Anti-CrSEPT) e adquiridos da empresa Rhea Biotech. A marcação da proteína tubulina foi realizada com anticorpo primário comercial adquirido da empresa Sigma, produzido em camundongos (Mouse Anti- α -tubulin, Sigma Aldrich®). Os anticorpos secundários utilizados foram ambos adquiridos da empresa Thermo Scientific®: Anti-Rabbit IgG conjugado a AlexaFluor® 555, para reconhecimento de Rabbit Anti-CrSEPT e Anti-Mouse IgG conjugado a AlexaFluor® 488, para reconhecimento de Mouse Anti- α -tubulin). Para marcação de DNA nas amostras, foi utilizado o marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), que se liga fortemente às regiões ricas em nucleotídeos A-T no DNA.

As amostras fixadas e imunomarcadas foram analisadas em Microscópio Confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) com utilização dos lasers de Diodo para excitação do marcador DAPI (405 nm), Argônio, para excitação de AlexaFluor® 488 (488 nm) e HeNe para excitação de AlexaFluor® 555. As imagens foram tratadas através do software ZEN lite (Zeiss®).

3.3.1 Fixação celular por Glutaraldeído

Para a imunolocalização *in situ* da septina de *C. reinhardtii*, 2 mL de cultura na fase log de crescimento foram coletadas a 1500 g por 3 minutos e fixadas com glutaraldeído 0,5% diluído em PBS, por 20 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação constante. As células foram lavadas com PBS e centrifugadas duas vezes antes da incubação em solução de bloqueio (1% BSA, 5% Goat Serum, PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram ressuspensas em solução de PBS com anticorpo primário anti-CrSept (1:20) e foram mantidas a 4°C, sob agitação constante por 16 horas. Foram feitas duas lavagens com PBS, seguida de incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado ao fluoróforo Alexafluor-555 (1:200) a 37°C por 2 horas. Após mais duas lavagens, as células foram depositadas em lâminas e seladas com *fluoromount* e lamínula para análise.

3.3.2 Fixação celular por Paraformaldeído e Metanol

Para novos experimentos, o protocolo adotado foi modificado de Keller e colaboradores (2010).⁶⁰ Lamínulas 22 mm x 22 mm foram lavadas por sonicação em solução de 0,5% de extran por 15 minutos e lavadas com água destilada e etanol 90%. Após secagem completa, 200 µL de poly-L-lysine 0,1% (Sigma Aldrich®) foram adicionados a uma das superfícies da lamínula e deixados por 10 minutos à temperatura ambiente. O excesso de solução foi retirado e a lamínula foi deixada secar por completo.

As células de *C. reinhardtii* cresceram por sete dias em meio TAP ou TP. 1 mL de células em meio líquido foi centrifugado a 1,5 g por 3 minutos e o *precipitado* foi ressuspenso em 200 µL de paraformaldeído 3,7%. A solução das células em paraformaldeído foi adicionada à superfície da lamínula tratada com poly-L-lysine e deixadas aderir por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de células foi removido e a lamínula foi imersa em um recipiente contendo metanol absoluto a -20°C e mantida em freezer por cinco minutos, quando então foi transferida para outro recipiente contendo metanol:PBS (1:1), também a -20°C, e mantida em freezer por mais

cinco minutos. Após o banho de metanol, a lamínula foi lavada duas vezes em PBS por cinco minutos e bloqueada por 30 minutos em temperatura ambiente com solução de bloqueio 100% (5% BSA, 1% *cold water fish gelatin*), seguida de um novo bloqueio por 10% de soro de cabra feito em solução de bloqueio 100%. Após as etapas de bloqueio, a lamínula foi incubada com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio 20% (diluída em PBS) e mantida em câmara úmida a 4°C por 16 horas. O excesso de anticorpo primário foi retirado com quatro lavagens de imersão da lamínula em PBS, para então incubação com anticorpo secundário por duas horas em temperatura ambiente. Após mais quatro lavagens em PBS, as lamínulas foram coradas por com DAPI (1µg/mL) diluído em água por 5 minutos, lavadas mais duas vezes em PBS e montadas em lâmina com FluoroShield™ (Sigma Aldrich).

Os anticorpos primários foram utilizados foram Rabbit Anti-CrSept e Mouse Anti- α -tubulin (Sigma Aldrich), ambos em uma diluição de 1:20, e os secundários foram Anti-Rabbit IgG conjugado a AlexaFluor® 555 e Anti-Mouse IgG conjugado a AlexaFluor® 488.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CRSEPT EM EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DE *C. reinhardtii*

A fim de analisar a relação entre quantificação de RNA mensageiro e de proteína, foi realizado um ensaio de *Western Blot* por quimioluminescência. Células da linhagem WT-12 de *C. reinhardtii* foram cultivadas em 50 ml de meio TP por 7 dias, sob agitação constante e sincronização por fotoperíodo (12h claro, 12h escuro). Três alíquotas de 10 mL foram utilizadas para extração de RNA total e os 20 mL restantes foram utilizados para extração de proteína total.

As células foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0,5% (m/v) Deoxicolato de Sódio) com adição de coquetel de inibidor de protease (*Calbiochem*) e deixadas sob agitação constante por 1 hora a 4°C. A solução foi centrifugada a 16000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato total de proteínas) foi transferido para um novo microtubo. O extrato total foi quantificado pelo método colorimétrico de BCA e as amostras foram normalizadas e adicionadas em gel de SDS-PAGE 15%.

Após a eletroforese, o conteúdo do gel foi transferido a uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com uma solução de 5% de leite desnatado em tampão TBS-T (100mM Tris; 154mM NaCl; 0,1% Tween-20) por 16 horas a 4°C sob agitação constante, lavada quatro vezes com solução TBS-T e incubada por duas horas com anticorpo primário Rabbit-Anti-CrSept (1:4000). Após mais quatro lavagens com TBS-T,

a membrana foi incubada por mais duas horas com anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG conjugado a HRP (1:10000) e revelada por solução ECL por 1 minuto.

3.5 SILENCIAMENTO GÊNICO POR MICRO-RNA ARTIFICIAL DE INTERFERÊNCIA (amiRNA)

3.5.1 Desenho das sequências de amiRNA

As sequências de amiRNA foram desenhadas usando o *software* “Web microRNA Designer”^{**}, de acordo com as recomendações. O CDS completo do gene *CrSept* contendo as regiões não transcritas 5'-UTR e 3'-UTR foi utilizado para gerar possíveis sequências de amiRNA. A análise do programa retornou 300 possíveis sequências de amiRNA, classificadas em ordem crescente da chance de ocorrer um erro de pareamento entre o amiRNA e a sequência do mRNA. Dessas 300 sequências, somente as classificadas com menor risco de ocorrer um *mismatch* foram utilizadas para refinamento, que resultou em oito sequências diferentes de acordo com a posição de anelamento do amiRNA no mRNA.

Além de delinear as sequências de amiRNA, o programa também desenha os oligonucleotídeos para cloná-los no vetor desejado. Essas sequências possuem 90 pares de base (Apêndice C) e possuem uma sequência que dará origem a um *hairpin*, ajudando o recrutamento das proteínas envolvidas no silenciamento gênico.

3.5.2 Construção de amiRNA e clonagem no vetor *pChlamiRNA3int*

Os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* foram anelados um ao outro de acordo com o protocolo gentilmente cedido pelo Dr. Adrian Valli. 10 µL de cada um dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, a 100 µM foram adicionados a 20 µL de 2x *Annealing Buffer* (20 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl) e anelados por PCR: 95°C por 5 minutos seguido de uma rampa entre 95°C e 37°C na qual a temperatura diminui 0.1°C por segundo. O DNA dupla-fita (dsDNA) gerado foi então purificado pelo kit Wizard® SV Gel and PCR clean up system (Promega) e eluído em água. O dsDNA foi fosforilado utilizando-se tampão de T4 DNA ligase e T4 *polynucleotide kinase enzyme* (PNK), seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. A PNK foi inativada a 65°C por 20 minutos. O vetor selecionado para a construção do amiRNA foi *pChlamiRNA3int*, desenvolvido por Molnar e colaboradores (Anexo F).

O vetor foi linearizado pela ação de digestão da enzima *SpeI*, purificado e defosforilado pela enzima *Antarctic Phosphatase* (New England BioLabs), para em seguida

^{**} ^{**} Disponível em: <<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>>. Acesso em 23 de Janeiro de 2017.

ser utilizado para a inserção dos dsDNA de amiRNA. A ligação foi realizada com enzima T4 DNA ligase, 75 ng do vetor digerido e 1:10 do dsDNA sintetizado, diluído em água. O produto da ligação foi utilizado para transformar DH5- α *E.coli* e 10 colônias de cada construção de amiRNA foram selecionadas para PCR de colônia. A reação de PCR foi realizada utilizando-se os primers descritos na tabela 7, responsáveis por amplificar um fragmento de 600 pb.

Tabela 7 - Sequência de primers para PCR de colônia e sequenciamento do vetor pChlamiRNA3int

Primer Name	Primer Sequence	Tm (°C)	Specifications
pChlamiRNA3int_Fw	5' TACGACCGAGATGGCTTG 3'	63	Anela ao promoter PSAD
pChlamiRNA3int_Rv	5' CCATCCCGGCAAGTAAAGCTC 3'	68	Anela ao 3'UTR do PSAD

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o PCR de colônia, cada reação de 25 μ L conteve: 1x Buffer NH₄, 2 mM MgCl₂, 0.5 μ L 0.2 mM dNTP, 0.2 mM de cada primer e 2.5 U de enzima Biotaq. As reações tiveram início com uma desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguidas de 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e resfriadas a 4°C.

Das colônias positivas para a amplificação de um fragmento no PCR de colônia, quatro de cada construção de amiRNA foram sequenciadas para checar a integridade e orientação do fragmento. As colônias positivas de cada amiRNA foram utilizadas para transformar células de da linhagem CW-15 de *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.5.3 Transformação nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii* por eletroporação

Os plasmídeos contendo os amiRNA foram linearizados antes da transformação. Para isso, o amiRNA2 foi linearizado com a enzima NotI, enquanto os outros amiRNAs foram linearizados com a enzima KpnI em reações de 50 μ L contendo 2 μ g dos plasmídeos. O vetor vazio, sem amiRNA ligado, foi utilizado como controle positivo da transformação.

A linhagem CW-15 de *C. reinhardtii*, deficiente de parede celular, foi cultivada em 200 mL de meio TAP sob agitação e iluminação contínuas até atingir a concentração de $1-5 \times 10^6$ células por mL. A cultura foi centrifugada a 1500 g por 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de TAP + 60 mM de Sucrose. 250 μ L dessa suspensão de células em sucrose foram misturados com os 50 μ L da reação de digestão e colocados em uma cubeta de eletroporação, onde permaneceram por 10 minutos em gelo. Posteriormente, as cubetas foram submetidas a um pulso elétrico de 800 V e 25 de capacitância e mantidas em gelo até

a ressuspensão em 10 mL de TAP + 60 mM de sucrose. As células transformadas foram mantidas sob agitação de 120 rpm, a 25°C e protegidas da luz por cerca de 16 horas, até serem peletadas novamente e ressuspensas em 1 mL de TAP + 60 mM de sucrose. Quatro alíquotas de 250 µL foram plaqueadas em meio TAP sólido contendo 10 µg/mL de paromomicina. As placas foram mantidas a 24°C e colônias começaram a despontar no quinto dia. No décimo dia, todas as transformações totalizaram 160 colônias, que foram transferidas para placas de 96 poços contendo meio TAP líquido e 5 µg/mL de paromomicina e deixadas crescer por mais 10 dias sob luz contínua.

As culturas das placas foram transferidas para o meio TP em uma diluição de 1:10 para sincronização do ciclo celular pelo fotoperíodo (12 horas claro, 12 horas escuro). Posteriormente, foram analisadas por microscopia óptica de campo claro em busca de alterações fenotípicas. As análises microscópicas foram feitas nas horas 13, 14 e 15 do ciclo celular.

3.5.4 Curva de crescimento dos transformantes

As culturas que apresentaram alteração fenotípica das células durante o processo de divisão celular foram mantidas em meio TAP por seis dias e quantificadas por espectrometria de luz visível (OD_{750nm}). A massa celular foi normalizada para uma densidade óptica a 750 nm de 0,02 e a diluição foi feita em meio TAP. As culturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm, 25°C, e a densidade óptica foi medida uma vez por dia, durante 10 dias.

3.5.5 Extração de RNA e análise de expressão por qPCR

As culturas selecionadas por apresentarem fenótipo atípico foram cultivadas em 50 mL de meio TAP por sete dias, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio TP, centrifugadas novamente e ressuspensas em 1 mL de TP. Esse volume foi dividido em três frascos contendo 50 µL de meio TP, que foi mantido por sete dias sob agitação constante e sincronização de por fotoperíodo (12h claro, 12h escuro). Ao final do sétimo dia, a cultura foi dividida em duas alíquotas de 25 µL, centrifugada e o precipitado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até a extração de RNA ou proteína.

A extração de RNA seguiu o método de precipitação de RNA por cloreto de lítio: o precipitado foi descongelado e ressuspenso em 0,5 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, 5% SDS) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido da adição de 50 µL de NaOAc a 3 M, pH 5,2 ao microtubo e mantido por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de uma mistura 1:1 de

fenol saturado de baixo pH (pH 4.3) e clorofórmio, gelados, e a mistura foi vortexada por 15 segundos, seguido de centrifugação por 5 minutos a 4000 g e 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 500 µL de isopropanol por 15 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada a 4000 g por 30 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80% gelado. Após uma centrifugação rápida de 5 minutos, o precipitado foi dissolvido em 250 µL de H₂O mais 250 µL de Cloreto de Lítio 4M. A mistura foi mantida a 4°C por 16 horas e centrifugada novamente, por 20 minutos, a 16000 g e 4°C. O precipitado foi lavado novamente com etanol 80%, centrifugado por 5 minutos e finalmente ressuspenso em 30 µL de H₂O livre de nuclease tratada com DPEC.

Após quantificação, 5 µg de RNA foram utilizados para tratamento com TURBO DNase (Ambion™) antes da síntese de cDNA, realizada com a enzima SuperScript™ III *Reverse Transcriptase*. Para a síntese de cDNA, a primeira etapa da reação foi realizada com 9 µL of RNA tratado com DNase, 1 µL dNTP Mix 10 mM, 0.5 µL *Random Hexamers* 50 ng/µL, 0.5 µL de OligoDT₁₈ 50 mM e 2 µL de água, para um volume final 13 µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos, resfriada em gelo por 1 minute e finalizada conforme recomendação do protocolo fornecido pelo fabricante.

Os *primers* utilizados para quantificar a expressão do gene *CrSept* foram CS2, RPL19, RPL32, descritos no Apêndice A, além de um novo normalizador selecionado, o gene *THI4* (*primers* descritos na tabela 8). A otimização dos *primers* foi realizada com diferentes concentrações (0.25 µM, 0.4 µM, 0.5 µM, 0.7 µM) em uma reação de 10 µL, contendo 5 µL SYBR Green (QIAGEN™), 0,5 µL de cDNA total, *primers forward* e *reverse* na concentração final desejada e água livre de nucleases. A reação de qPCR foi realizada no equipamento Rotor Gene Q (QIAGEN™), seguindo o ciclo: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5s, 60°C por 30s, leitura da placa e rampa de temperatura 72°C a 90°C, com aumento de 0,5°C a cada 30s.

Tabela 8 - Primers para ensaio de qPCR e suas especificações

Nome	Sequência	T _m (°C)	GC %	Tamanho primer	Tamanho amplicon
THI4-F	5' CGCTGTAACGCAAGAACCTTCT 3'	57.7	50.0	22 bp	56 bp
THI4-R	5' AGGCGAGGTTTCATCTTGATG 3'	54.8	50.0	20 bp	

Fonte: Elaborada pela autora.

As reações para validação dos *primers* foi realizada com variadas concentrações de cDNA por reação. Diluições de 15%, 12.5%, 6.25%, 3.125% e 1.56% foram utilizadas para gerar a curva padrão e determinar a eficiência (E) e o *slope* da curva (tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros dos primers para qPCR

	CS2	R19	R32	THI4
Eficiência	1.09	0.99	1	0.956
Slope	-3,132	-3.357	-3.318	-3.432

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5.6 Extração de proteínas totais, quantificação e ensaio de western blot

A segunda alíquota de células sincronizadas dos 25 mL de cultura foi descongelada e ressuspensa em 250 µL de tampão de extração de proteínas para *Chlamydomonas* (97.1 mM K-phosphate buffer pH 7.5, 5 mM DTT, 2 mM EDTA pH 8.0), vortexada com esferas de vidro por um minuto, seguido de um minuto de banho de gelo, por três vezes. O extrato total foi centrifugado a 13000g, por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

As proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de BCA (Bio-Rad Protein Assay™). Uma diluição seriada de proteína de BSA foi utilizada para gerar a curva de calibração, conforme indicações do fabricante, e as proteínas foram quantificadas por espectroscopia de luz visível (OD_{595nm}).

Após quantificação, adicionou-se tampão de carregamento para SDS-PAGE (300 mM Tris-HCl pH 6.8, 12 mM DTT, 24% [v/v] glycerol, 12% [m/v] SDS, 0.06% [m/v] bromophenol blue) e as proteínas foram fervidas para então serem aplicadas em gel de acrilamida. Foram feitos dois géis com as mesmas amostras e quantidades de proteína, e a eletroforese correu com uma corrente de 100 V até o corante sair do gel. Em seguida, um dos géis foi utilizado gerar uma membrana de western blot. Esse gel foi incubado em tampão de transferência (25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% [v/v] metanol) por uma hora. Os papeis de filtro e a membrana de nitrocelulose foram incubados no mesmo tampão por 10 minutos. A transferência foi realizada em cuba úmida, preenchida com tampão de transferência e realizada a uma voltagem de 100 V por uma hora. A membrana foi corada com Ponceau-S para checar a eficiência da transferência, lavada com água deionizada até a retirada total do corante e então incubada com solução de bloqueio (0.5% de Gelatin from cold water Fish em TBS-Tween-Triton - 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 1% Triton X-100) por uma hora, em temperatura ambiente. A membrana foi lavada quatro vezes por cinco minutos com TBS-Tween-Triton e incubada por 16 horas a 4°C com anticorpo primário (Anti-CrSept, rabbit polyclonal) na diluição de 1:3000 em solução de bloqueio. Posteriormente, a membrana foi lavada mais quatro vezes com TBS-Tween-Triton e incubada por uma hora

com anticorpo secundário (*Goat anti-Rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor solution*) na titulação de 1:3000 em solução de bloqueio.

4 RESULTADOS

4.1 DUPLO-HÍBRIDO

4.1.1 Clonagem de CrSept nos vetores de duplo-híbrido

4.1.1.1 Vetor pBTM116*

A sequência de DNA codificante (CDS) de CrSeptNGC foi utilizada como molde numa reação de amplificação com os *primers* delineados exclusivamente para o vetor pBTM116*, utilizando-se o aditivo DMSO devido ao alto percentual de bases guanina e citosina no DNA molde.

As bandas esperadas para os amplicons de CrSeptNGC (1446 pb) e para CrSeptNG (1179 pb) foram observadas em todas as reações do gradiente de temperatura e reamplificadas a partir do produto de PCR (Figura 9).

Para a amplificação da construção CrSeptNGC foi necessária a adição de DMSO à reação de PCR, o que não foi fundamental para a amplificação de CrSeptNG.

Figura 9 - Análise por eletroforese em gel de agarose de fragmentos reamplificados e purificados das construções CrSeptNGC (coluna 1) e CrSeptNG (coluna 2) para purificação das amostras.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra Andressa Patrícia Alves Pinto

Com os parâmetros definidos, as amostras foram reamplificadas sob as mesmas condições e protocolos anteriores, utilizadas para uma reação de ligação ao vetor de propagação *pGEMT-Easy*. A reação de ligação foi usada para transformar células de *E.coli* DH5- α . Os clones positivos foram sequenciados para verificar a integridade da sequência da CrSept, e aqueles que apresentaram 100% de identidade com a sequência depositada no banco de dados (*GenBank*) foram utilizados em uma reação de digestão de maior volume para purificação das bandas correspondentes às construções CrSeptNGC ou CrSeptNG.

Quatro clones de cada construção foram selecionados e a ligação foi confirmada por reação de restrição com as enzimas *EcoRI* e *SalI*. Somente dois mostraram-se positivos quando analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para CrSeptNG, somente um clone apresentou as duas bandas esperadas (CrSeptNG, 1200 pb; pBTM116*, 5000 pb) (figura 10).

Figura 10 - Análise de restrição dos clones positivos das construções CrSeptNGC e CrSeptNG no vetor pBTM116*. a) Clones positivos, nas colunas 3 e 4, apresentando uma banda em torno de 1500 pb, correspondente ao inserto CrSeptNGC, e banda com cerca de 5000 pb, referente ao vetor pBTM116*; b) Clone positivo na coluna 3, com uma banda em torno de 1200 pb, correspondente ao inserto CrSeptNG, e outra com 5000 pb, correspondente ao vetor pBTM116*

Fonte: Elaborada pela autora.

As três amostras positivas observadas foram sequenciadas, e após confirmação da identidade sequencial, uma amostra correspondente à construção pBMT116*-CrSeptNGC e a amostra pBMT116*-CrSeptNG foram utilizadas para a transformação em pequena escala em leveduras *S.cerevisiae*, cepa L40.

4.1.1.2 Clonagens no vetor pLexA_N e pLexA_C

Foram amplificadas as CDSs de CrSeptG e CrSeptNGC para ligação ao vetor pLexA_C. A figura 11 mostra o resultado da amplificação, com uma banda de aproximadamente 950 pb para CrSeptG (figura 11a) e 1500 pb para CrSeptNGC (figura 11b).

Após a transformação de células de *E. coli* DH5- α com a reação de ligação, oito colônias foram selecionadas e tiveram o DNA plasmidial extraído para análise de restrição. Todas as colônias apresentaram duas bandas distintas, uma correspondendo ao vetor, na altura de aproximadamente 5500 pb, e outra referente ao inserto (CrSeptG), com cerca de 950 pb.

Figura 11 - **(a)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% de reação de amplificação por PCR da construção CrSeptG (seta, aproximadamente 950 pb); **(b)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para reação de amplificação por PCR da construção da CrSeptNGC para ligação ao vetor pLexA_C.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Ensaio de Duplo híbrido

Todas as construções para duplo híbrido foram transformadas individualmente e seguiram o mesmo protocolo, detalhado no procedimento experimental. Para as quatro transformações, o controle negativo (transformação com água) não mostrou crescimento algum de colônias, após cinco dias de incubação a 30°C e todas as placas cujas transformações foram feitas com os vetores fechados (sem ligação ao inserto) apresentaram crescimento em meio SD-W. Paralelamente, uma alíquota de levedura também foi transformada com a construção pBMT116*-SEPT4 (SEPT4, *Homo sapiens*), posteriormente utilizada como controle positivo no teste de autoativação do sistema de transcrição na levedura.³⁸

Nos testes para as variadas concentrações de 3-AT, observou-se não ser necessário adicionar o competidor ao meio de nenhuma das quatro construções de BD-isca utilizadas neste experimento.

Visto que as construções BD-isca não autoativam o sistema de transcrição na levedura (figura 12) e definido que não seria necessário adicionar 3-AT ao meio das transformações, os ensaios prosseguiram para a transformação em larga escala com a biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii*. Para isso, uma das três colônias de cada uma das quatro construções BD-isca foi inoculada em meio líquido SD-W e utilizada para transformação com a biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii*.

Figura 12 - Teste de autoativação (Ensaio da β -galactosidase) para duplo híbrido, mostrando que as construções não ativam o sistema de transcrição na levedura sem que haja interação com alguma proteína parceira. a) Teste de autoativação para as construções pBMT116*-CrSeptNGC, pBMT116*-CrSeptNG e para o vetor pBMT116* vazio (todos negativos) e o controle pBMT116*-SEPT4 (positivo - azul); b) Teste de autoativação para as construções pLexA_N-CrSeptG, pLexA_C-CrSeptNGC e pLexA_C (todos negativos) e o controle positivo pBMT116*-SEPT4 (positivo - azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2.1 Transformação em larga escala: pBMT116*-CrSeptNGC

Após sete dias de crescimento a 30°C, foram observadas 132 colônias transformantes para a transformação com a construção pBMT116*-CrSeptNGC e a biblioteca cDNA, com coloração rosa e de tamanho aproximado de 3 mm de diâmetro. As colônias selecionadas cresceram a 30°C por cinco dias e foram submetidas ao teste da β -galactosidase para detectar possíveis interações entre proteínas isca e presa. Porém, não foram observadas colônias azuis após o teste (figura 13), exceto no controle positivo utilizado (interação entre SEPT5 e SEPT8, descrita por Nakahira e colaboradores).

O resultado negativo motivou uma segunda tentativa de transformação em larga escala, e mesmo após o rastreamento de aproximadamente 500 novas colônias, não foram observadas interações positivas para a isca CrSeptNGC (resultado não mostrada).

Figura 13 - Teste da β -galactosidase para as colônias transformantes com pBMT116*-CrSeptNGC + biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii* mostrando nenhuma colônia com possível interação entre proteínas (ausência da cor azul). Em destaque indicado pela seta vermelha, no canto inferior esquerdo, controle positivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2.2 Transformação em larga escala: pBMT116*-CrSeptNG

A construção CrSeptNG, sem o domínio C-terminal da septina de *C. reinhardtii*, foi delineada como uma opção de expressão, visto que a porção C-terminal da proteína da CrSept possui baixa complexidade estrutural e uma grande concentração de prolinas, o que poderia acarretar em problemas de enovelamento. Esta construção pode afetar a interação da CrSept com outras proteínas, embora comumente as septinas interajam com outras proteínas pelo domínio GTPase.¹⁵ No entanto, a transformação em larga escala com esta construção também não resultou em colônias positivas para interação de outras proteínas com a CrSept. As colônias transformantes cresceram em torno de 3 mm de diâmetro, mas não apresentaram coloração azul quando submetidas ao ensaio da β -galactosidase (imagem não mostrada).

4.1.2.3 Transformação em larga escala: pLexA_N-CrSeptG

Uma das construções alternativas à CrSeptNGC e CrSeptNG foi para a expressão somente do domínio GTPase da septina, numa tentativa de resgatar parceiros de interação com esta região.

O vetor pLexA_N-CrSeptG foi utilizado para a transformação em larga escala da levedura com a biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii*. Após sete dias de crescimento em meio SD-WLH, foi possível observar cerca de 150 colônias com 3 mm de diâmetro ou mais. Inicialmente, apenas cinco colônias ficaram azuladas no papel de filtro após o teste da β -galactosidase. Decorridas algumas horas, mais colônias apresentaram coloração levemente azul no papel filtro. As primeiras cinco colônias a ficarem azuis e mais 15 colônias com coloração azul tardia (figura 14) no papel filtro foram selecionadas e inoculadas em meio SD-L para extração do DNA plasmidial da levedura. O DNA extraído dessas 20 colônias foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5 α , para extração do DNA plasmidial e sequenciamento. A análise de sequenciamento mostrou que das 20 colônias selecionadas, somente cinco apresentavam sequência *in frame* de genes codificantes para proteínas parceiras de interação.

Figura 14 - Ensaio da β -galactosidase para as 148 colônias selecionadas por crescimento em meio SD-WLH após transformação de levedura L40 previamente transformada com pLexA_N-CrSeptG com biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii*. Setas pretas indicam colônias que adquiriram cor azulada após uma hora de incubação a 37°C, enquanto setas vermelhas indicam colônias que se tornaram azuis após três horas de incubação a 37°C. Todas as colônias marcadas foram selecionadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído para a busca de proteínas parceiras à CrSept.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2.4 Transformação em larga escala: pLexA_C-CrSeptNGC

O experimento foi realizado de forma análoga ao dos outros vetores. O ensaio da β -galactosidase e o teste do 3-AT mostraram, respectivamente, que não houve autoativação do sistema de transcrição no interior da levedura, e que não houve crescimento das células mesmo na mínima concentração de 3-AT. Após a transformação com a biblioteca de cDNA de *C. reinhardtii* e o ensaio da β -galactosidase foram resgatadas duas colônias que ficaram azuladas, mas o sequenciamento dessas colônias mostrou serem falsos positivos.

4.1.3 Validação dos clones de interação recuperados por duplo-híbrido

Para validar os clones positivos de interação com a construção do domínio G da proteína CrSept, os plasmídeos contendo a isca (CrSept) e a presa foram co-transformados na levedura L40. Das colônias resultantes, três foram selecionadas para um novo ensaio da β -galactosidase. No ensaio “Teste (1)”, as colônias ficaram cerca de 2 horas incubando a 37°C, enquanto no ensaio “Teste (2)”, o tempo de incubação foi de 45 minutos (figura 15). Os controles de interação foram realizados com vetores adquiridos no *kit* DUALhybrid kit (DualSystems Biotech, descontinuado): Para controle positivo, utilizou-se a interação da proteína p53 com o antígeno T do vírus simian (SV40).⁶³ O controle negativo de interação foi realizado com a co-transformação dos vetores pGAD-HA e pLeXA-p53.

Figura 15 - Ensaio da β -galactosidase para os cinco clones positivos encontrados no ensaio de duplo-híbrido com a construção do domínio G da proteína CrSept. Teste (1) corresponde ao ensaio cujo período de incubação a 37°C foi de 2 horas; **Teste (2)** corresponde a um período de incubação de somente 45 minutos. Os clones 1-56 e 1-6 retornaram *Blast* para a proteína *S-Adenosyl-Homocysteine-Hydrolase*, enquanto os clones 1-1, 2-2 e 2-45 retornaram resultados para a proteína *Subtilase-like serine-protease*.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível notar que somente o clone 1-56 teve uma leve mudança na coloração após 45 minutos de incubação, enquanto os outros 4 clones apresentaram tonalidade azulada somente após um tempo maior a 37°C. Usualmente, interações proteicas fortes podem ser observadas em até quatro horas de incubação, mas interações mais fracas foram observadas com até oito horas de incubação.⁶⁴

Após o sequenciamento dos clones recuperados, duas possíveis proteínas parceiras à CrSEPT foram recuperadas: S-Adenosyl-Homocisteína-Hidrolase (clones 1-56 e 1-6),

anotada como SAH1 e de número de acesso XP_001693339.1; e Subtilase-like Serino-Protease (clones 1-1, 2-2, 2-45), também chamada de esporangina, de número de acesso XP_001693855.1. A posição dos nucleotídeos recuperados do vetor pGAD-HA, após sequenciamento, está descrita na tabela 10, assim como a correspondência aos aminoácidos da proteínas.

Tabela 10 – Abrangência das sequências de nucleotídeos recuperadas para os clones positivos de interação no ensaio de duplo-híbrido, mostrando tanto a posição dos aminoácidos correspondentes recuperados, quanto dos nucleotídeos.

Clone DH	Proteína (Presa)	Abrangência na Proteína (AA)	Abrangência na presa (nt)
1-56	SAH1	01 ao 323	67 ao 1029
1-1	Esporangina	588 ao 712	22 ao 396
1-6	SAH1	01 ao 314	67 ao 1002
2-2	Esporangina	669 ao 832	10 a 501
2-45	Esporangina	577 ao 706	46 ao 435

Fonte: Elaborada pela autora

A proteína SAH1 possui 483 aminoácidos, não há predição de porção transmembrana e a análise de localização subcelular mostrou maior probabilidade da proteína encontrar-se no citoplasma. Já a proteína esporangina 1117 aminoácidos, com predição de porção transmembrana e maior probabilidade de localização subcelular em membrana. Devido às características da esporangina, somente a proteína SAH1, a partir deste momento chamada de CrSAHH, foi utilizada para validação de interação.

4.1.4 Duplo-híbrido dirigido para verificação da interação CrSEPT-CrSEPT

A fim de verificar a possibilidade da interação entre CrSEPTe CrSEPT por duplo-híbrido em leveduras, uma vez que esta interação não foi resgatada após a transformação em larga escala com a biblioteca, a construção CrSeptG foi clonada no vetor pGAD-424 e co-transformada em leveduras da cepa L40 com a construção pLexA_N-CrSeptG, constatando a interação entre os domínios GTPase da CrSept (dados não mostrados).

4.1.5 Clonagem e expressão das proteínas SAHH e CrSeptG

O cDNA correspondente a ORF codificando a proteína SAHH foi amplificado, sequenciado e posteriormente ligado ao vetor pET-SUMO. Este vetor foi usado na transformação de células *E. coli* Rosetta (DE3), as quais expressaram a proteína SAHH-SUMO, com massa aproximada de 65 kDa. Na análise em SDS-PAGE (Figura 16 a) é possível observar a expressão da fusão na porção solúvel do extrato depois da expressão. A partir do extrato solúvel, a SAHH-SUMO foi purificada por cromatografia de afinidade, seguida de clivagem na resina, permitindo assim a eluição da SAHH sem a SUMO (Figura 16 b). Posteriormente, o eluato purificado foi submetido à cromatografia de exclusão

molecular para obtenção da proteína SAHH com maior grau de pureza e para determinação de sua massa molecular aparente. É possível observar, dois picos sobrepostos (Figura 16 c), cujas massas moleculares aparentes, obtidas por curva de calibração (Figura 16 d), são de cerca de 120 KDa e 43 KDa, respectivamente. Os picos foram confirmados como sendo da mesma proteína por análise em SDS-PAGE, mostrando que há duas populações conformacionais de SAHH coexistindo na amostra: monômeros e dímeros.

4.1.6 Ensaio de pulldown: Imobilização da CrSeptG+SUMO em resina de níquel

Para o primeiro ensaio de *pulldown*, a proteína CrSeptG-SUMO, em tampão Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5 mM e MgCl 5 mM foi imobilizada em resina de níquel e incubada a 4°C por no mínimo duas horas antes da aplicação da proteína SAHH, cujo tampão era idêntico ao utilizado para a CrSeptG, exceto pela ausência de MgCl. A proteína SAHH foi adicionada à resina e incubada por duas horas antes da eluição. É possível observar na figura 17 que o eluato após a adição da SAHH já apresentava quase que a totalidade da proteína aplicada na coluna, mostrando que não houve ligação desta porção à CrSeptG imobilizada. O domínio G da CrSept foi eluído após lavagem da coluna e adição da enzima SUMO protease, não sendo observada a co-eluição das proteínas CrSAHH e CrSept.

(continua)

Figura 16 - Teste de expressão e purificação da proteína SAHH. (a) SDS-PAGE mostrando marcadores de massa molecular (indicados à esquerda); não induzido e induzido correspondem aos extratos proteico totais de antes da indução e depois da indução com IPTG; Solúvel - Porção solúvel do extrato; Precipitado - Porção insolúvel do extrato. A banda em evidência refere-se à fusão SUMO-SAHH; (b) Purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel da proteína SAHH. SDS-PAGE mostrando marcadores de massa molecular (indicados à esquerda); as bandas destacadas pelas setas, correspondem à SAHH (52,7 kDa) fusionada a SUMO (12 kDa). A banda observada na coluna do eluato SUMO protease e o Eluato 500 mM imidazol correspondem somente à proteína SAHH; (c) Perfil cromatográfico da proteína SAHH em Superdex 200 (10/300 GL) mostrando dois picos parcialmente sobrepostos entre os volumes 12 e 17 mL de eluição. (d) Curva de calibração utilizada para o cálculo de massa molecular aparente. As proteínas utilizadas para a construção da curva de calibração estão detalhadas no gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Teste de pull-down entre a CrSeptG e a SAHH, com imobilização de CrSeptG-SUMO na resina de níquel. SDS-PAGE mostrando que a fração de CrSeptG-SUMO permaneceu ligada à coluna (fraca banda do não ligado na coluna Eluato CrSeptG pós coluna) e que toda a SAHH saiu na lavagem, não permanecendo ligada ao domínio G da CrSept imobilizado na resina.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.7 Ensaio de *pulldown*: Imobilização da SAHH+SUMO em resina de níquel

A segunda tentativa de validar a interação entre CrSEPT e CrSAHH por *pulldown*, realizada sob menores concentrações de NaCl e glicerol, foi realizada com a imobilização da construção CrSAHH-SUMO na resina de Níquel pela cauda de histidina presente na fusão. Nota-se no SDS-PAGE do teste de interação (Figura 18) que a proteína CrSeptG foi eluída após sua aplicação, mostrando que grande parte da proteína não permaneceu ligada à SAHH. Posteriormente, a eluição da fusão CrSAHH-SUMO com 500 mM de imidazol mostrou que não havia banda visível ao SDS-PAGE correspondente à CrSeptG.

Uma terceira tentativa foi realizada imobilizando-se a construção CrSeptG-SUMO na resina de afinidade, sob menores concentrações de NaCl (150mM), porém novamente as proteínas CrSeptG e CrSAHH não foram co-eluídas (dados não mostrados).

Para os ensaios de *pulldown* com imobilização da proteína CrSAHH, foi necessária a clonagem de sua região codificante no vetor pGEX_5x-1 para expressão como fusão à GST, permitindo a purificação por cromatografia de afinidade em resina de Glutathiona-Sepharose. A fusão GST-CrSAHH possui cerca de 79 kDa (Figura 19 a).

Figura 18 - Segundo ensaio de *pulldown*, com imobilização da SAHH-SUMO na resina de níquel.

SDS-PAGE das amostras. Para este segundo ensaio, foram reduzidas as concentrações de NaCl no tampão para 300 mM e de glicerol para 5%. Detalhes descritos no texto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - (a) Purificação da construção GST-CrSAHH(79 kDa) por cromatografia de afinidade de resina Glutathione-Sepharose. P - fração insolúvel, *precipitado*; S - fração solúvel; NL - não ligado; L1 - Lavagem 10 vol. de tampão A; L2 - Lavagem 10 vol. tampão A + 0,1% Triton; L3 - Lavagem 10 vol. tampão A; E1 - Eluição de 2 vol. tampão A + 10mM Glutathione Reduzida; E2 - 2 vol. tampão A; M - Marcador de massa molecular. (b) Ensaio de *pull-down* com imobilização da construção GST-CrSAHH. M - Marcador de peso molecular; NL SAHH - Fração não-ligada da fusão GST-CrSAHH; L3 - Terceira lavagem após ligação da fusão GST-CrSAHH; NL E86 - fração não ligada da construção CrSeptG; L 10vc - Série de três lavagens da resina com 10vol. de tampão B; E1- Eluato da fusão GST-CrSAHH com 2vol. de tampão B + 10mM de glutathione reduzida.

Fonte: Elaborada pela autora.

A construção GST-CrSAHH foi eluída com glutathione reduzida da resina de Glutathione-Sepharose e recromatografada em coluna de exclusão molecular. A amostra purificada GST-CrSAHH foi utilizada para realizar o ensaio de *pull-down* em microtubo. A construção permaneceu imobilizada após as lavagens e adição de excesso da proteína CrSeptG. Como é possível observar na figura 19 b, a proteína CrSeptG não interagiu e saiu já na primeira lavagem da coluna, antes da eluição da fusão GST-CrSAHH. Não foi observada nenhuma banda referente à construção da CrSeptG no eluato com 10 mM de glutathione reduzida, indicando que não houve interação *in vitro* entre as construções.

4.1.8 Ensaio de Crosslink

Os ensaios de *crosslink* foram realizados como uma alternativa aos ensaios de *pull-down*, visto que os reagentes *crosslinkers* promovem uma ligação covalente entre proteínas que interagem. O primeiro experimento foi conduzido com amostras de CrSeptG e CrSAHH que haviam sido mantidas em tampão B (que contém Tris) anteriormente à troca para o tampão C (Fosfato) em coluna HiTrap Desalting. Não foi possível observar a formação de heterocomplexos em nenhuma das condições analisadas (Figura 20).

Um segundo experimento, realizado com o agente *crosslinker* DSS foi realizado com as mesmas amostras, que haviam sido mantidas em tampão com o sal Tris. Foram utilizadas quatro concentrações do reagente e as amostras foram mantidas a 0°C durante o

experimento. Também não foram observadas formações de complexos nos géis de SDS-PAGE 12% do experimento de *crosslink* com o agente DSS (Figura 21).

Para certificar-se que a reação de *crosslink* não foi afetada pela possível presença de Tris residual no tampão, as proteínas CrSeptG e CrSAHH foram produzidas novamente e, desde a lise até ao final da purificação, foram mantidas em tampão contendo unicamente fosfato como agente tamponante. Na figura 22a é possível observar uma banda pouco intensa com tamanho entre 150 kDa e 250 kDa, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM, nos tempos 30 e 60 minutos (apontadas pelas setas vermelhas). Essas bandas se repetem na figura 22c, referente ao controle de interação da proteína CrSAHH com ela mesma, nos mesmos tempos e concentrações observados na figura 22 a, e podem ser uma organização tetramérica da proteína CrSAHH, que teria tamanho estimado de 211 kDa. No entanto, não são observadas bandas com tamanhos correspondentes à interação de CrSeptG e CrSAHH, assim como também não é possível observar homodímeros na figura 22 b, correspondente ao controle de interação da CrSeptG com ela mesma.

Foram utilizados dois reagentes *crosslinkers* distintos pelo tamanho do braço de espaçamento entre os grupos terminais. Já foi observado em nosso laboratório que algumas interações ocorrem com um agente, mas não com o outro. O agente DSS tem um braço de 11,4 Å e o agente EGS tem um braço de 16,1 Å

(continua)

(continuação)

Figura 20 - Ensaio de *crosslink* com o agente *crosslinker* EGS. Foram utilizadas as concentrações 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mM de EGS e as amostras foram coletadas nos tempos de 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos. SDS-PAGE 15% (a) Ensaio entre as proteínas CrSeptG (37 KDa) e CrSAHH (52,7 KDa); (b) Controle de interação CrSeptG; (c) Controle de interação entre CrSAHH.

Fonte: Elaborada pela autora.

(continua)

(conclusão)

Figura 21 - Ensaio de *crosslink* com DSS realizado a baixa temperatura. Foram utilizadas as concentrações 0,5, 1, 5 e 10 mM de EGS e as amostras foram coletadas nos tempos de 1, 5, 10, 15 e 30 minutos. As amostras CrSeptG x CrSAHH, CrSeptG x CrSeptG e CrSAHH x CrSAHH correspondem aos controles negativos (sem DSS) do experimento. SDS-PAGE 15% (a) Ensaio entre as proteínas CrSeptG e CrSAHH; (b) Controle de interação CrSeptG; (c) Controle de interação entre CrSAHH.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Ensaio de *crosslink* com EGS, realizado em baixa temperatura. Foram utilizadas as concentrações 0,1, 0,5 e 1 mM de EGS. As amostras foram mantidas em tampão fosfato desde a lise celular e no ensaio foram coletadas nos tempos de 5, 10, 30 e 60 minutos. SDS-PAGE 12% mostrando (a) Ensaio entre as proteínas CrSeptG e CrSAHH; (b) Controle de interação CrSeptG; (c) Controle de interação entre CrSAHH.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR

4.2.1 Primeiro ensaio de análise de expressão gênica por qPCR

Após a síntese de cDNA dos grupos de alga coletados nos quatro períodos descritos (0h, 8h, 14h e 16h), deu-se início ao experimento de qPCR para definir a temperatura de anelamento dos primers desenhados tanto para o gene *CrSept*, quanto para os outros três genes eleitos como referência. As reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1,2% para verificar a amplificação por eletroforese (figura 23), mostrando amplificação de bandas inespecíficas para o par de oligonucleotídeos CS1. Esta análise indicou a necessidade de tratar o RNA total extraído com DNase, para evitar transcrição do DNA genômico durante a síntese de cDNA. Como não houve diferença visual significativa dos níveis de amplificação com as diferentes temperaturas, determinou-se como 60°C a temperatura de amplificação nos ciclos de qPCR.

A validação dos pares de *primers*, assim como a eficiência, R^2 , *slope* e temperatura de *melting* para avaliar a expressão gênica de *CrSept* foram determinadas por experimentos de curva padrão e validação dos *primers* utilizados (tabela 9). As etapas de otimização da concentração dos pares de *primers* selecionados para o experimento determinaram que a concentração de 0,5 μ M, coincidentemente para todos os pares testados, era ideal para as reações de amplificação (dados não mostrados).

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de amplificação por qPCR de amostra não sincronizada de cDNA de *C. reinhardtii* para determinar temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos específicos para *CrSept* (CS1 e CS2), RPL19 e RPL32

Fonte: Elaborada pela autora.

Os genes normalizadores RPL19, RPL32 e Rack1 (controles endógenos) foram analisados pelo *software* do equipamento *CFX96 Real PCR System* (Bio-Rad) e mostraram-se de acordo com o que foi descrito por Vandesompele e colaboradores, 2002.⁶⁵ Os controles endógenos foram avaliados de acordo com a estabilidade nos níveis de expressão, expressa pelas medidas *M value* e *Coefficient Variance* (Apêndice D), e quanto

menores os valores de *M* e do *Coefficient Variance* mais estável o nível de expressão. Os três genes normalizadores foram considerados como controles endógenos, e o valor da média entre os três foi utilizada na normalização dos dados de expressão gênica.

Definidos os parâmetros iniciais para a análise de expressão gênica por qPCR, foram então realizados os primeiros experimentos de sincronização do ciclo celular. Três grupos de algas sincronizadas foram coletados nos quatro períodos descritos, e após a extração do RNA total e síntese do cDNA, os níveis de expressão gênica do *CrSept* foram analisados por qPCR. O resultado (figura 24) mostra uma tendência de aumento de expressão gênica de *CrSept* no segundo período de coleta (8h), mantendo-se até o período de terceira coleta (14h), que coincide com o período de divisão celular.

Figura 24 - Análise da variação da expressão do gene *CrSept* ao longo do ciclo celular de *C. reinhardtii*. A expressão do gene foi normalizada com os controles endógenos, RPL19, RPL32 e RACK1. Os dois pares de oligonucleotídeos de *CrSept* utilizados são comparados, CS1 e CS2, em ambos os casos observamos picos de expressão nos tempos 8h e 14h. Os tempos indicados no eixo x são os tempos de coletas das amostras sincronizadas.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Juliana S. A. Crusca.

4.2.2 Segundo ensaio de análise de expressão gênica por qPCR

Os novos genes de referência selecionados (PP2A, 07.g336450 e 01.g010400) foram otimizados para a análise de expressão gênica. Os valores de eficiência (*E*), R^2 e estabilidade encontram-se no Apêndice E.

Figura 25 - Análise de expressão gênica de *CrSept* ao longo do ciclo celular de 24 horas. A expressão gênica foi normalizada com base nos genes de referência PP2A, 07.g336450 e 01.g010400. A amostra da hora 3 (laranja) foi normalizada a 1 e utilizada como calibrador. A taxa de expressão diminui significativamente durante o período de escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a extração de RNA total de 10 mL de culturas sincronizadas de *C. reinhardtii*, foi realizado o experimento de análise de expressão gênica por qPCR. A concentração de RNA mensageiro referente ao gene *CrSept* foi determinada pela análise comparativa a genes normalizadores e os dados obtidos foram avaliados pelo método de Pfaffl. O tempo de 3h foi utilizado como controlador (valor normalizado a 1), e os resultados apresentados são relativos à amostra 3h.

Nos ensaios de análise de expressão gênica é possível observar uma tendência a diminuir a quantidade de RNA mensageiro de *Crsept* no período do escuro, o que permite supor que o gene da septina de *C. reinhardtii* tem sua maior taxa de expressão durante a fase de crescimento celular (Figura 25).

4.3 IMUNOMARCAÇÃO *IN SITU* DA CRSEPT

4.3.1 Imunomarcação de células fixadas com Glutaraldeído

O anticorpo policlonal gerado em coelhos contra a proteína CrSept foi utilizado para a imunomarcação da proteína *in situ* em células de *C. reinhardtii* fixadas com glutaraldeído. Para a marcação por fluorescência, foi utilizado um anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado ao fluoróforo alexa-Fluor-555, cujo comprimento de onda de emissão é de 565 nm. O controle negativo (figura 26 a) foi utilizado para estabelecer o ganho mínimo e a intensidade máxima do laser para que a autofluorescência da clorofila não interferisse na fluorescência da marcação. É possível observar, na figura 26, a imunomarcação da proteína

CrSept nas imagens b, c e d na base do flagelo da alga. Esta marcação foi observada em diferentes amostras, em grande parte das células.

A partir do resultado inicial, culturas da alga foram sincronizadas por fotoperíodo de 12h, fixadas e imunomarcadas para averiguar a localização da CrSept na célula durante o ciclo celular. As coletas foram realizadas nas horas 3, 8, 14 e 16 do ciclo celular, a fim de observar as células desde a fase G_0 (hora 16) até G_1 – horas 3 e 8 e S/M – hora 14. As imagens mostram novamente a marcação na base do flagelo durante a fase G_1 (figuras 27 a e 27 b), mas durante a fase de divisão celular, com a reabsorção do flagelo, as marcações intracelulares ficam mais difusas e desordenadas (figuras 27 c), voltando a se apresentar na base flagelar após o término da fase M e início de G_0 (figura 27 d).

Figura 26 - Imunomarcacão *in situ* da proteína CrSept em *C. reinhardtii*. (a) Controle negativo de marcação, onde as células foram incubadas somente com o anticorpo secundário (Anti-Rabbit conjugado a AlexaFluor™ 555), mas não foram incubadas com o anticorpo primário Anti-CrSept; (b), (c) e (d): Células com marcação anti-CrSept. É possível observar uma fluorescência intensa na base de cada flagelo, na alga. Imagens do autor. Excitação 555 nm.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Ana Elisa Zeraik.

Figura 27 - **Imunolocalização da proteína CrSept *in situ*.** **(a) 3h** - Marcação em células coletadas na hora 3 do ciclo celular. Nas quatro imagens é possível destacar marcações intensas na base flagelar e algumas marcações menos intensas ao redor do contorno celular; **(b) 8h** - Células coletadas na hora 8 do ciclo celular, onde também é possível observar marcações na base do flagelo; **(c) 14h** - Coleta na hora 14 do ciclo celular. Na primeira imagem é possível observar uma célula que ainda não adentrou a fase M; Na segunda imagem, quatro células filhas em processo de divisão celular; Nas terceira e quarta imagens, oito células-filhas completando a terceira mitose; **(d) 16h** - Coleta na hora 16 do ciclo celular (fase G₀). Note que a estrutura flagelar já se apresenta íntegra novamente. Excitação 555 nm.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Ana Elisa Zeraik

Uma série de imagens em nove diferentes planos de uma célula completando a primeira divisão celular (figura 28) mostram a possível formação de um anel no plano de citocinese, assim como uma marcação mais intensa e difusa nas células. Já em um grupo de quatro células passando pela segunda mitose, a imunomarcação para a CrSept mostra maior intensidade de fluorescência nas regiões corticais das células (figura 29).

Figura 28 - Micrografias em nove diferentes planos de duas células em divisão. Nas imagens 2, 3 e 4 é possível notar uma intensidade de fluorescência semelhante a um anel, enquanto nas imagens 6 e 7 nota-se uma região entre o plano de divisão das duas células com intensidade maior de fluorescência, indicando a presença da proteína septina. Excitação 555 nm.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Ana Elisa Zeraik

Figura 29 - Micrografias da fase final da divisão celular de quatro células de *C. reinhardtii*. A proteína CrSept (verde) mostra-se concentrada nas regiões corticais das células em divisão. Excitação 555 nm.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Ana Elisa Zeraik

4.3.2 ***Imunomarcação de células fixadas com paraformaldeído e metanol***

O protocolo de imunomarcação por fluorescência para microscopia confocal foi modificado, com base nos métodos utilizados por Keller e colaboradores (2010).¹¹ O novo protocolo, com fixação por paraformaldeído e metanol permite tanto uma preservação maior

das estruturas morfológicas da célula, quanto maior permeabilização e retirada de *background*, gerado pela autofluorescência da clorofila na célula.

Com o novo método de marcação da Crsept *in situ*, é possível notar não só a presença de septinas próximas ao flagelo, mas também uma disposição em grupos e difusa pela célula (Figuras 30, 31, 32 e 33). Também é possível observar que há uma incidência de fluorescência maior nos planos de corte mais externos da célula.

Na figura 34, o plano de adesão da célula à lamínula permitiu notar uma disposição mais detalhada da septina próxima aos corpos basais do flagelo. Nela, pode-se observar que a CrSept forma uma rede em forma de “X” localizada logo abaixo aos corpos basais que dão origem aos flagelos.

Ainda, em células sincronizadas e em divisão celular, pode-se observar que a CrSept apresenta-se em forma de pontos difusos entre as células filhas (Figura 35). Comparativamente com a marcação de α -tubulina, a CrSept aparenta estar mais próxima à membrana celular.

Figura 30 - Microscopia confocal de imunomarcção *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em três planos distintos. Em vermelho, as marcações em pontos difusos de septina pela célula (555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compõe o citoesqueleto (488 nm). Merge: união das imagens. Centralizado abaixo, imagem de campo claro da mesma célula.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 - Microscopia confocal de imunomarcaco *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em cinco planos distintos. Em vermelho, as marcaes em pontos difusos de septina pela clula (excitao 555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compe o citoesqueleto (excitao 488 nm). Merge: unio das imagens.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 32 - Microscopia confocal de imunomarcação *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em três planos distintos. Em vermelho, as marcações em pontos difusos de septina pela célula (excitação 555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compõe o citoesqueleto (excitação 488 nm). Merge: união das imagens. Centralizado abaixo, imagem de campo claro da mesma célula.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Microscopia confocal de imunomarcação *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em três planos distintos. Em vermelho, as marcações em pontos difusos de septina pela célula (excitação 555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compõe o citoesqueleto (excitação 488 nm); Em azul, DAPI com marcação de DNA (excitação 405 nm). Merge: união das imagens. Centralizado abaixo, imagem de campo claro da mesma célula. A seta indica uma concentração maior de septina na base do flagelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 34 - Microscopia confocal de imunomarcação *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em quatro planos distintos. Em vermelho, as marcações em pontos difusos de septina pela célula (excitação 555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compõe o citoesqueleto (excitação 488 nm). Merge: união das imagens.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 35 - Microscopia confocal de imunomarcação *in situ* da septina de *C. reinhardtii* em divisão celular. Em vermelho, pontos difusos de septina pelas células-filhas (excitação 555 nm); Em verde, a rede de tubulinas que compõe o citoesqueleto (excitação 488 nm). Em azul, a marcação de DNA por DAPI (excitação 405 nm). Merge: união das imagens.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CRSEPT EM EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DE *C. REINHARDTII*

As culturas de *C. reinhardtii* sincronizadas foram utilizadas tanto para extração de RNA total, quanto para extração de proteína total, com o intuito de ver a relação direta entre a quantidade de RNA mensageiro produzido e a quantidade de proteína CrSept presente nas células em momentos específicos do ciclo celular.

As amostras de proteínas totais foram quantificadas pela técnica colorimétrica de BCA e 32,2 µg de proteína foram aplicados a dois géis: um utilizado para transferência a uma membrana de nitrocelulose e outro como gel “espelho”. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência, que permite detectar a emissão de luz com a variação do tempo, e assim quantificar o material, o que não é possível pela revelação colorimétrica por fosfatase alcalina.

Figura 36 - Western blot do extrato total de proteínas de culturas sincronizadas. Grupo 1 corresponde a amostras cultivadas em meio TAP e depois transferidas para meio TP. Grupo 2 corresponde a culturas cultivadas unicamente em TP. As amostras foram coletadas nas horas 3h, 8h, 14h e 16h do ciclo celular e 32,2 µg de proteína foram aplicados por poço. As letras (a), (b), (c) e (d) correspondem aos tempos de exposição da membrana à câmera e detecção de quimioluminescência ao longo de 10 minutos. (a) 32,5s; (b) 221,7s; (c) 316,2s e (d) 600s.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram analisadas as amostras de dois grupos: Grupo 1, cujas células foram cultivadas em meio TAP, centrifugadas em baixa rotação e transferidas para meio TP para sincronização; e Grupo 2, cujas células foram cultivadas unicamente em meio TP. Ambos os grupos tiveram amostras coletadas nas horas 3h, 8h, 14h e 16h do ciclo celular. Na Figura

36 é possível observar a membrana após (a) 32,5s, (b) 221,7s, (c) 316,2s e (d) 600s de exposição. É possível observar nos dois grupos que as amostras correspondentes à hora 8 do ciclo celular tiveram uma intensidade de quimiluminescência maior e a 3 e 14 horas houve diminuição da intensidade.

Em paralelo à membrana de *Western blot*, um gel espelho com as mesmas concentrações de proteína foi analisado para comparação do extrato total de proteínas de todas as amostras. No gel espelho é possível notar uma pequena diferença na intensidade de algumas bandas das amostras aplicadas (Figura 37).

Figura 37 - Gel espelho da membrana de *Western blot* utilizada para análise da variação de expressão de CrSept ao longo do ciclo celular. É possível notar variação da concentração das proteínas aplicadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 SILENCIAMENTO GÊNICO POR amiRNA

4.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos de amiRNA

Para investigar o papel da proteína CrSept, utilizou-se a técnica de *knock-down*, ou silenciamento gênico, desenvolvida por Molnar e colaboradores (2009).⁵³ Para selecionar as sequências geradas pelo *software* WMB, foi considerada não somente a posição onde o amiRNA anela na CDS do transcrito de CrSept, mas também o número de *mismatches* nas posições 2 e 12, além da energia de hibridização absoluta, que deveria estar entre -35 e -38 kcal/mol. No total, oito sequências foram selecionadas, conforme mostrado na figura 38.

Figura 38 - As oito construções de amiRNA selecionadas para transformar *C. reinhardtii* e a representação da posição de anelamento no transcrito de CrSept. Os números 02 a 09 representam o nome dado a cada um dos amiRNAs; As cores das linhas abaixo dos números representam a classificação da sequência conforme a análise do software WMD; a caixa com os números abaixo da linha colorida indica a posição dos nucleotídeos do CDS aos quais o amiRNA anelam.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.2 PCR de colônia e seleção dos clones positivos

A ligação de uma cópia de cada amiRNA no vetor pChlamiRNA3int foi confirmada por PCR de colônia de bactérias *E.coli* DH5- α transformadas com o produto da ligação (Figura 39). Foram selecionadas 10 colônias referentes a cada transformação. O *amplicon* esperado (700 pb) continha a sequência do amiRNA e segmentos das porções promotora e terminadora utilizados na construção do vetor. Amplicons com 600 pb foram considerados negativos para a ligação da sequência de amiRNA (relição) e amplicons com 800 bp ou mais foram descartados por conterem duas ou mais cópias do amiRNA ligado *in tandem*.

(continua)

(continuação)

Figura 39 - Resultado do PCR de 10 colônias selecionadas para cada construção de amiRNA. Os clones contendo apenas uma cópia da sequência de amiRNA (amplicon de 700 pb) foram selecionados para sequenciamento. Amplicons com 600 pb foram considerados religação do vetor, e com 800 pb ou mais foram considerados múltiplas ligações da sequência de amiRNA e foram descartados.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.3 Transformação nuclear por eletroporação

Um clone positivo de cada amiRNA foi utilizado para transformar células da linhagem CW-15 de *C. reinhardtii* por eletroporação. O plasmídeo foi linearizado com as enzimas de restrição, sendo a enzima *KpnI* utilizada para digerir os plasmídeos contendo os amiRNA3 a amiRNA9, enquanto o amiRNA2 foi digerido pela enzima *NotI*, uma vez que a havia um sítio para a enzima *KpnI* na sequência de amiRNA2.

No total, todas as transformações resultaram em 160 colônias, que foram transferidas do meio TAP sólido para placas de 96 poços (figura 40) contendo meio TAP líquido e 5µg/mL de paromomicina. As culturas cresceram sob luz contínua por sete dias.

Figura 40 - Placa de 96 poços com os transformantes de amiRNA. No total, 160 colônias transformadas em CW15 foram selecionadas, sendo: 32 colônias para o amiRNA2, 16 colônias para o amiRNA3, 36 colônias para o amiRNA4, 39 colônias para o amiRNA5, 4 colônias para o amiRNA6, 21 colônias para o amiRNA7, 1 colônia para o amiRNA8 e 11 colônias para o amiRNA9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as culturas que cresceram em meio TAP líquido foram transferidas para meio TP para dar início à sincronização celular e então a análise por microscopia de campo claro.

4.5.4 Identificação de fenótipo por microscopia óptica

Septinas já foram descritas como participantes da divisão celular em vários organismos, portanto, o primeiro ponto de análise por microscopia óptica foi buscar alterações fenotípicas durante a divisão celular nos clones transformados com amiRNA. A

primeira varredura foi feita em oito clones para transformantes do amiRNA5. A escolha do amiRNA5 foi aleatória.

As amostras foram analisadas na 15ª hora do ciclo celular (fase escura), quando se espera ter células concluindo a etapa de divisão celular. Durante a análise, foi possível observar que boa parte das células já haviam completado a divisão celular e apresentavam tamanho reduzido comparado ao tamanho das células que estavam em processo de divisão. Em duas das oito amostras analisadas, as células ainda estavam em divisão e apresentavam um fenótipo atípico, em forma de bastão (Figuras 41b e 41c), em vez de células arredondadas, como observado no grupo de células controle (Figura 41a).

(continua)

(continuação)

Figura 41 - Análise de microscopia óptica de clones selecionados aleatoriamente, três horas após o início da fase escura. (a) Linhagem CW-15 não transformada; (b) Clone 14 do amiRNA5 (amiRNA_14). As células apresentam um fenótipo em bastão durante a divisão celular, e parecem estar conectadas uma a outra. Objetiva 100x; (c) Clone 18 do amiRNA5 (amiRNA5_18). Células em divisão apresentando uma forma oval. É possível notar a conexão entre as células.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esses achados motivaram uma análise dos transformantes por um período de acompanhamento da cultura, com início na hora 13 do ciclo celular. O primeiro acompanhamento foi feito com uma célula única em formato de bastão, encontrada na lâmina, por cerca de 20 minutos. *C. reinhardtii*, mostrando que o formato alongado era uma forma transiente, e não permanente, ocorrente na divisão celular (Figura 42 a). Outra série de imagens também mostrou que as células em forma de bastão começam a aparecer após as células-filhas terem concluído a etapa de divisão. Antes da citocinese, as células começam a desenvolver uma forma alongada antes de retornarem à forma arredondada (figura 42 b).

Os fenótipos encontrados nos oito transformantes do amiRNA5 motivaram a análise em outras linhagens de amiRNA. No total, foram analisados 72 clones (32 clones do amiRNA2, 16 clones do amiRNA3, 16 clones do amiRNA4 e 8 clones do amiRNA5) por microscopia óptica. O fenótipo alongado e em forma de bastão foi observado em 6 desses 72 transformantes, sendo três clones referentes ao amiRNA5, 2 clones referentes ao amiRNA2 e 1 clone referente ao amiRNA4.

(a)

(continua)

(continuação)

(b)

(continua)

(conclusão)

Figura 42 - (a) Célula de *C. reinhardtii* em formato de bastão, transformada com plasmídeo para gerar amiRNA contra o gene *CrSept*. O tempo zero corresponde à hora 13 do ciclo celular. Alterações fenotípicas em 30 minutos mostram que a forma alongada é um estágio transitente após a divisão celular. (b) Fase de mitose gerando quatro células filhas durante 120 minutos. As células começam a adquirir uma forma alongada após a mitose e retornam ao formato circular após 30 minutos. Na mesma lâmina, é possível observar uma única célula iniciando a divisão celular e adquirindo o formato alongado durante o processo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.5 Curva de crescimento dos transformantes de amiRNA

Para checar se o crescimento dos clones transformados foi afetado pela introdução do amiRNA contra a *CrSept*, os três transformantes do clone amiRNA5 foram diluídos a uma

DO_{750nm} de 0,016 em TAP, assim como um controle positivo transformado com o vetor vazio. As medidas de absorbância foram feitas uma vez por dia durante nove dias consecutivos. Os resultados mostram que o clone 14 do amiRNA5 (amiRNA5_14) teve um retardo para entrar na fase exponencial, enquanto os clones 15 e 24 (amiRNA5_18 e amiRNA5_24, respectivamente) se comportaram de forma similar ao controle positivo (figura 43).

Figura 43 - Curva de crescimento dos três clones do amiRNA5 selecionados por terem fenótipo alterado durante a divisão celular e de um controle positivo (C+), transformado com o vetor pChlamiRNA3int vazio. Os clones foram monitorados por 9 dias com medição da DO em 750 nm uma vez ao dia.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.6 Análise de expressão gênica dos clones de amiRNA por qPCR

A análise de expressão gênica dos clones que apresentaram fenótipo alterado durante a divisão celular foi feita a partir da extração de RNA total dos clones crescidos em meio TP e sincronizados por fotoperíodo. Como controle positivo, foi utilizado o RNA total de um clone transformado com o vetor vazio de amiRNA. Os clones selecionados foram coletados em réplicas, sendo divididos em três grupos: (1), composto pelos clones 14, 18 e 24 do amiRNA5 e um controle positivo, cujas células foram coletadas na hora 13,5 do ciclo celular; (2), composto pelos mesmos clones do grupo, mas com coleta de células nas horas 11 e 13 do ciclo celular; e (3), sendo uma repetição em amostras e tempos de coleta do grupo II.

As análises de expressão gênica foram comparadas a três diferentes genes constitutivos (também chamados de normalizadores), sendo: *RPL19* (Ribosomal Protein 19), *RPL32* (Ribosomal Protein 32) e *THI4* (responsável pela síntese do domínio tiazol no nucleotídeo tiamina). Esses normalizadores foram selecionados no período do experimento

por parecem ser constitutivamente expressos na célula. O método de análise empregado foi o desenvolvido por Pfaffl (2006), e mostrou variações nos níveis de expressão do gene *CrSept* (figura 44).

Figura 44 - Análise da expressão de *CrSept* em três replicatas distintas. O número acima da barra indica o valor em porcentagem da expressão em relação aos genes normalizadores e normalizadas em relação ao controle positivo (vetor vazio), cuja expressão foi considerada 100%. A cor amarela indica as amostras que foram coletadas no período claro do ciclo (hora 11), e a cor preta indica amostras que foram coletas na hora 13 do ciclo celular (escuro).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.7 Análise de expressão de proteínas por Western Blot

Os resultados de qPCR mostraram que os níveis de transcrito de CrSept eram menores em algumas amostras quando comparados ao controle positivo. Isso, no entanto, não garante que os níveis de expressão de proteína também sejam afetados pela expressão do amiRNA. Amostras de células dos grupos (1), (2) e (3) também foram utilizadas para analisar os níveis de expressão de proteína CrSept.

Para os clones do grupo (1) foram feitos dois ensaios de western blot, um contendo 5 µg de proteína e outro contendo 10 µg, ambos com as mesmas amostras, coletadas na hora 13,5 do ciclo celular. Para os grupos (2) e (3), um anticorpo contra a proteína histona-3 foi usado como marcador constitutivo e as amostras foram coletadas nas horas 11 e 13 do ciclo celular. O tamanho esperado para a proteína CrSept é de 54 KDa e para a proteína Histona-3, de 17 KDa.

É importante notar que a proteína CrSept apresenta tamanho em torno de 50 KDa quando submetida a SDS-PAGE. Essa característica foi observada anteriormente e a proteína marcada foi confirmada por espectrometria de massas como sendo CrSept.

Embora os níveis de proteína possam variar de amostra para amostra, a análise de Western Blot se mostrou inconclusiva. As proteínas foram quantificadas antes de serem aplicadas no gel de acrilamida e a mesma quantidade (em massa) foi aplicada para todas as amostras, no entanto, a marcação com Ponceau da membrana após a transferência das proteínas revelou uma disparidade na concentração das proteínas aplicadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE DUPLO HÍBRIDO

Septinas já foram descritas por formar filamentos em diversos organismos eucariotos, tendo um papel estrutural no interior da célula. A participação das septinas no ciclo celular de leveduras, formando anéis localizados no septo entre a levedura mãe e o broto,^{1,66} deu início aos estudos estruturais e funcionais destas proteínas em diversos organismos multicelulares, inclusive humanos, permitindo identificá-las como proteínas pertencentes à superfamília das GTPases. Sabe-se que septinas formam heterocomplexos com outras septinas quando na presença de GTP, mas pouco se conhece sobre a atividade GTPase desta proteína.¹⁵

Experimentos *in vitro* com a septina 2 humana (SEPT2) mostraram que essa proteína é capaz de formar homopolímeros na presença de GTP,³⁹⁻⁴⁰ e a presença de heterocomplexos de septinas foi observada *in vivo*. Experimentos de duplo híbrido com septinas humanas corroboraram a formação de heterocomplexos, mostrando que as septinas humanas tem preferência de interação com outras septinas.³⁸

Nesse trabalho, a busca por parceiros de interação pela técnica de duplo híbrido em leveduras teve como objetivo destacar possíveis proteínas parceiras à CrSept, e para isso foram feitas quatro diferentes construções, afim de driblar eventuais problemas de expressão da CrSept dentro da levedura. A primeira tentativa de ensaio ocorreu com a expressão da CrSept no vetor pBTM116*, convencionalmente utilizado em ensaios de duplo-híbrido. No entanto, após duas repetições das transformações em pequena e larga escala, nenhum clone de interação positivo foi obtido, o que motivou a repetição do experimento com construções alternativas da CrSept. Uma dessas construções correspondia à ausência do domínio C-terminal, visto que dadas suas características, sua presença poderia apresentar-se como um obstáculo à expressão no interior da levedura. Da mesma forma que anteriormente, não foram obtidos parceiros de interação após a transformação em larga escala.

Assim, um novo ensaio de duplo híbrido somente com o domínio de ligação ao GTP da CrSept foi usado como isca, o qual nos retornou duas possíveis proteínas de interação: S-Adenosil-Homocisteíno-Hidrolase (SAHH) e Subtilase-*like*-Serino-Protease. Ambas as proteínas são possíveis parceiras da CrSept não somente pelos testes com gene repórter *HIS3* e *lacZ* confirmarem a interação, mas também por serem proteínas cujas funções estão relacionadas a questões estruturais que ocorrem dentro da própria alga ou que já foram relatadas em organismos com proteínas homólogas. Tanto a proteína SAHH, quanto a

proteína Subtilase-like-Serine-Protease já foram descritas como proteínas encontradas na zona de transição do flagelo da alga.⁶⁷

A proteína S-Adenosyl-Homocysteine-Hydrolase (SAHH) é um importante membro da família das hidrolases e já foi relacionada à regeneração flagelar na alga verde *Dunaliella salina*,⁶⁸ cuja identidade com a CrSAHH é de 83%. É uma proteína de 483 aminoácidos (52,7 KDa) predita como citoplasmática, cuja função é catalisar a hidrólise de S-Adenosil-homocisteína em adenosina e homocisteína. O estudo de Qinghua Li mostra que há aumento na expressão de SAHH em *D. salina* durante o período de regeneração flagelar, propondo que esta montagem possa estar relacionada à fosforilação e metilação de proteínas componentes do flagelo.⁶⁹

Além da proteína SAHH recuperada como presa do ensaio de duplo híbrido em leveduras, também foram recuperados três clones positivos para a enzima Subtilase-like-serino protease. Denominada como *esporangina* por Kubo e colaboradores,⁷⁰ esta proteína possui um domínio serino protease da família das subtilases na primeira metade da proteína, cuja função foi relacionada à eclosão das células filhas durante a mitose. É uma glicoproteína com predição de porção transmembrana e tem ação quando excretada para o meio extracelular. Tem cerca de 120 kDa, sendo primeiramente sintetizada como uma isoforma de cerca de 130 kDa, que se acumula nas células-filhas.⁷⁰ A serino protease é capaz de mediar a quebra da parede celular da célula mãe, favorecendo a liberação das células filhas em *C. reinhardtii*. Em *Volvox carteri*, uma alga verde evolutivamente próxima de *C. reinhardtii*, uma proteína similar denominada VheA foi descrita por Fukada e colaboradores com função semelhante, de digestão da parede celular para liberação das células filhas.⁷¹

As septinas foram primeiramente descobertas em leveduras em brotamento, formando um anel ao redor do septo gerado entre a célula mãe e a célula filha. Além disso, as septinas já foram relacionadas à divisão celular de outros eucariontes, como *C. elegans*, *Drosophila* e metazoários¹⁵, e recentemente foram observadas participando da divisão celular de outras algas verdes, como *Nannochloris baccilaris* e *Marvania geminata*⁷², reforçando a hipótese de que esta proteína, em *C. reinhardtii*, possa ter um papel crucial durante a divisão celular da alga. O papel da esporangina na digestão da parede celular para liberação das células pode estar relacionada à possível atuação da CrSept durante as fases S/M do ciclo celular de *C. reinhardtii*.

A validação da interação entre o domínio G da septina de *C. reinhardtii* e a CrSAHH foi priorizada em relação à esporangina devido a atividade flagelar já descrita para a SAHH de *Dunaliella salina*, além da maior chance de sucesso para expressão da CrSAHH em sistema heterólogo, visto que sua atuação é descrita como intracelular e sua estrutura não apresenta predição de porções transmembrana. Além disso, os resultados de

imunolocalização para a CrSept, mostrando que durante as fases G₀ e G₁ do ciclo celular essa proteína encontra-se primordialmente na base do flagelo, reforçam a possibilidade de interação entre CrSept e CrSAHH.

A primeira tentativa de validação da interação da CrSept e da CrSAHH por *pulldown* foi realizada em condições de alta concentração de sal NaCl, que podiam tornar o ambiente desfavorável para interações entre resíduos carregados ou entre resíduos hidrofóbicos. Um segundo ensaio de validação priorizou a redução da concentração de NaCl para 300 mM e a de glicerol para 5%, além da imobilização da CrSAHH à resina, ao invés da CrSeptG, como feita anteriormente. Adicionalmente, estudos estruturais com a SAHH⁷³ em diferentes organismos mostraram a necessidade do cofator NADH para a sua atividade hidrolítica, mas a adição do cofator aos tampões de eluição não resultaram em interação observável entre CrSept e CrSAHH (dados não mostrados).

Como alternativa aos ensaios de *pulldown*, foram realizados três experimentos independentes de *Crosslinking*, visando estabelecer uma ligação permanente entre as proteínas caso a interação entre elas fosse fraca ou transiente. Não foi possível observar formação de heterocomplexos em nenhuma das amostras do ensaio de Crosslink feito com EGS. Os possíveis homocomplexos observados nas amostras também estavam presentes no controle negativo de interação. No entanto, a não interação entre CrSept e CrSAHH nesse experimento pode não ter ocorrido devido às etapas iniciais de purificação (cromatografias de afinidade e exclusão molecular) terem sido feitas em tampão contendo Tris.

As proteínas foram transferidas para tampão livre de Tris e contendo fosfato como agente tamponante antes do experimento de *crosslink*, utilizando gel filtração em coluna HiTrap Desalting. Porém, não foi observada formação de complexos em nenhuma das amostras.

Um terceiro experimento em que as proteínas foram purificadas unicamente em tampão fosfato foi conduzido para certificar se a falta de interação estava relacionada à resquícios de Tris na solução, ou se as condições reproduzidas *in vitro* não eram suficientes para mostrar interação entre CrSept e CrSAHH. Em concentrações maiores de agente *crosslinker* e nos tempos de 30 e 60 minutos foi possível observar uma banda fraca com peso molecular entre 150 kDa e 250 kDa tanto no gel com mistura de CrSept e CrSAHH, quanto no gel de controle de interação de CrSAHH. É possível que essa banda seja referente à forma tetramérica da proteína CrSAHH, cujo tamanho estimado seria de 211 kDa. A proteína SAHH tem um domínio bastante conservado e está presente tanto em procariotos, quanto eucariotos. Embora pouco se saiba sobre a estrutura dessa proteína em *C. reinhardtii*, estudos filogenéticos mostram que a SAHH de algas verdes e vermelhas está mais próxima da estrutura de plantas e mais distante da estrutura de metazoários e

fungos.⁷⁴ Além disso, embora a proteína SAHH seja funcionalmente ativa como homotetrâmero em animais e fungos, homodímeros já foram descritos em plantas.⁷⁵ Portanto, pode-se esperar que haja a formação de homotetrâmeros de CrSAHH no experimento de *crosslink*.

A interação da septina com outras proteínas pode ser dependente de outros adjuvantes ou mesmo de outras proteínas presentes na célula, condições não reproduzidas nos ensaios *in vitro*. Além disso, é possível que a interação entre as proteínas seja dependente da oligomerização da CrSept, condição não reproduzida *in vitro*. Como a proteína S-Adenosil-Homocisteína-Hidrolase está envolvida na reação de metilação de várias macromoléculas, incluindo proteínas⁷³, é possível que a interação entre as duas seja fraca e as condições experimentais testadas não tenham sido capazes de mimetizar o ambiente celular para promover, *in vitro*, a interação entre CrSept e CrSAHH.

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E QUANTIFICAÇÃO DE CrSEPT NO EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS

As análises de expressão gênica de *CrSept* por PCR quantitativo foram desenvolvidas com o intuito de relacionar se havia um aumento na expressão da septina em *C. reinhardtii* relacionado ao ciclo celular de algas sincronizadas. Por serem organismos fotossintetizantes e seguirem um ciclo circadiano, as células de *Chlamydomonas* podem ter seu ciclo sincronizado pelo controle da luminosidade em um período de 24h. Seguindo um ciclo alternado de 12h claro e 12h escuro, as células foram sincronizadas para posterior análise de expressão gênica.

De acordo com o descrito por Harris, em seu livro *The Chlamydomonas Sourcebook*, as células de *Chlamydomonas* encontram-se em G1 durante todo o período de claro, prolongando essa fase de crescimento até duas horas após o início da fase escura. Neste período, a célula entra em S/M e, após a divisão celular, as células filhas se acumulam no interior da parede celular, sendo liberadas cerca de duas horas após o início da mitose, ainda na fase escura. Ao final do período escuro, as células filhas já possuem flagelos e entram em G1 com o início de um novo ciclo.⁴⁴

Recentemente, a atividade das septinas em algas verdes já foi relacionada à divisão celular⁷² através de imunolocalização por fluorescência, mas nenhum estudo acerca da variação de sua expressão gênica foi feito para corroborar as imagens obtidas por microscopia. Embora em nossos experimentos fosse possível observar uma tendência de maior expressão da *CrSept* durante o final da fase G1 e início da fase S/M, descobriu-se que a sincronização celular era diretamente afetada pela presença de acetato no meio de cultura das algas. O acetato é a fonte primária de carbono para *Chlamydomonas*, e sua

presença inibe a atividade fotossintética.⁴⁴ Assim, novos experimentos foram realizados e as culturas foram sincronizadas por fotoperíodo em meio sem acetato para extração de RNA total e de proteína total das amostras.

Recentemente, Zones e colaboradores estudaram a influência da sincronização por fotoperíodo na taxa de transcrição gênica de *C. reinhardtii* e mostraram como a expressão dos genes se comporta na presença e na ausência de luz.⁶² Com base nesses estudos, foi possível determinar novos genes normalizadores para a análise de expressão gênica, visto que a expressão dos normalizadores utilizados anteriormente – RPL19, RPL32 e RACK1 – variava em até quatro vezes entre máximo e mínimo quando empregado o tratamento por fotoperíodo (Figura 45 a). De acordo com os dados fornecidos por Zones, foram escolhidos os genes classificados com expressão pouco variável e consideradas constantes durante o ciclo celular (Figura 45 b). A expressão desses genes, embora baixa, não atinge uma variação de duas vezes entre máximos e mínimos.⁶²

O painel de expressão gênica apresentado por Zones e colaboradores traz dados do transcriptoma que incluem a septina de *C. reinhardtii* (Figura 45 c).⁶² Analisando dados gerados em seu estudo, a quantificação de RNA mensageiro total da CrSept exibiu um perfil com maior taxa de expressão no período de luz, tendo um decaimento com o início do período escuro.

Embora a técnica de PCR quantitativo (qPCR) seja sensível às mínimas quantidades de fita molde na reação de amplificação, há vários fatores associados ao método que podem gerar dados inconclusivos.⁷⁶ A qualidade e integridade do RNA total extraído interferem claramente nos resultados experimentais. Somado a isso, podem ocorrer erros de pipetagem, anelamento entre primers e abundância de RNA ribossomal que também sofre transcrição reversa, diminuindo a eficiência da reação de síntese de DNA complementar (cDNA). As análises feitas com o RNA total em nossos experimentos sempre apresentaram valores de *Cycle threshold* (Ct) acima de 22 ciclos, mesmo com amostras de cDNA concentradas ou não diluídas. Embora os genes selecionados como normalizadores e o próprio CrSept não tenham valores altos de expressão conforme os dados apresentados por Zones e, para estudos de qPCR a taxa de amplificação exponencial seja tardia, ainda assim esperava-se obter valores mais baixos de Ct tanto para os normalizadores, quanto para a septina de *C. reinhardtii*.

É importante notar que os valores de qPCR apresentados foram normalizados em relação à amostra 3h, classificada como calibrador do experimento e que a quantificação da expressão gênica é relativa a genes constitutivamente expressos, e não absoluta. Ainda, somente quatro pontos do ciclo celular foram observados em nosso estudo, devido à sua relação com fases importantes do crescimento e divisão das células de *C. reinhardtii*, enquanto Zones fez um mapeamento de 24 horas para gerar o perfil de expressão de todos

os transcritos, incluindo o gene *CrSept*. Dessa forma, apesar da análise dos dados de um sequenciamento de RNA (RNA-Seq) gerar um valor de concentração molar relativo de RNA, a única possibilidade de comparação entre experimentos de RNA-Seq e de qPCR distintos é avaliar o perfil de expressão.

Figura 45 - Variação da expressão gênica dos genes normalizadores ao longo do ciclo celular de 24 horas, conforme dados gerados por Zones e colaboradores. (a) A expressão dos genes RPL19, RPL32 e RACK1, utilizados anteriormente como normalizadores, pode variar em até quatro vezes o seu valor ao longo do ciclo celular. (b) Genes normalizadores com expressão estável e contínua ao longo do ciclo celular. A variação entre os mínimos e máximos é mais amena. (c) Variação da expressão de *CrSept* ao longo do ciclo celular.

Fonte: Adaptada de ZONES et al.⁶²

Para relacionar os dados obtidos por qPCR e o estudo conduzido por Zones e colaboradores, é preciso considerar que em nossos experimentos possa ter ocorrido variação na qualidade e integridade do RNA utilizado como molde. Além disso, as taxas de expressão da amostra 3h só são menores que as de 8h se considerarmos o erro experimental. Portanto, é possível fazer a relação com o perfil apresentado na figura 45 c desde que sejam considerados os erros experimentais.

Além da expressão gênica, os resultados analisados em extrato total de proteínas para a expressão da CrSept corroboram os resultados obtidos para a análise de expressão gênica. Apesar da normalização da quantidade de proteínas não ter sido equivalente para todas as amostras, é possível, por uma análise qualitativa, notar que há maior quantidade de proteína CrSept no tempo de 8 horas do ciclo celular para os dois grupos analisados. De acordo com Zones e colaboradores, a expressão da CrSept na hora 8 do ciclo celular seria mais do que duas vezes maior do que a expressão na hora 3.

5.3 IMUNOLocalização *IN SITU* DA CrSept

Capazes de atuar como barreiras de difusão celular, septinas também já foram observadas formando estruturas em forma de anel que participam do controle de tráfego entre um compartimento e outro.⁴⁶ Além de estarem presentes no septo que se forma entre a célula mãe e o broto de levedura, elas também já foram encontradas na base ciliar e flagelar de diversos organismos.⁷⁷ Em *Homo sapiens*, complexos de septina Sept4 e Sept7 foram observados no annulus do flagelo de espermatozoides.⁷⁸ Complexos das septinas Sept2 e Sept7 também já foram descritos como importante barreira de difusão entre o citoplasma e o cilioplasma, e mutantes deficientes em Sept2 apresentaram um crescimento ciliar prejudicado e com maior entrada de proteínas em seu interior.⁷⁸

As estruturas ciliares e flagelares são compostas não somente pela organização de filamentos de tubulina, mas também por uma complexa rede proteica envolvida no controle e regulação do transporte interno nessas estruturas. Participando da barreira de difusão há não somente as fibras de transição e zona de transição, mas também um possível anel de septinas, que estaria localizado logo abaixo a membrana plasmática em eucariotos superiores.⁴⁶ Esse anel, em conjunto com a zona de transição e as fibras de transição, seria responsável por coordenar na entrada e saída de proteínas do transporte intraflagelar, regulando o tráfego proteico no interior do cílio ou flagelo.⁴⁶

As imunomarcações para a CrSept mostraram um acúmulo de septinas na base flagelar, próximas à zona de transição, padrão semelhante ao encontrado por Craige e colaboradores, no estudo da proteína CEP290 em *C. reinhardtii*.⁶⁷ A CEP290 mostrou-se responsável por ancorar os microtúbulos da zona de transição flagelar à membrana, além de

auxiliar na regulação do tráfego intraflagelar. Acredita-se que, de forma semelhante ao já descrito para septinas encontradas em outras células ciliadas/flageladas, possa haver a participação de CrSept na regulação no tráfego intraflagelar em *C. reinhardtii*. Essa possibilidade é suportada pelos resultados encontrados no ensaio de duplo-híbrido com recuperação da proteína CrSAHH. Na alga verde unicelular *D. salina*, a SAHH participa da regeneração flagelar. Ainda, SAHH foi detectada, por espectrometria de massas, na matriz flagelar de *D. salina*,⁶⁸ e pelo estudo proteômico de flagelos, conduzido por Diener e colaboradores, que detectou a presença tanto a proteína SAHH, quanto a proteína Subtilase-Like-Serine-Protease.⁷⁹

Durante a divisão celular de *C. reinhardtii*, os dois flagelos são reabsorvidos ainda em pré-prófase, voltando a ser reconstituídos somente após a citocinese e excisão das células filhas. A alga reabsorve os flagelos para utilizar os mesmos corpos basais como fusos mitóticos, dando início à divisão celular.⁴⁴ De forma semelhante, foi possível observar que, para CrSept, há uma despolarização da marcação de fluorescência quando as células estão entrando em mitose. Com a ausência dos flagelos não é mais possível identificar a imunomarcação na base flagelar, mas é possível notar que a proteína continua presente na célula, de forma difusa e concentrada em pequenos pontos.

De forma geral, a septina se apresenta em pontos de alta concentração de proteína espalhados por quase todo o corpo celular, sendo possível observar uma marcação mais evidente próxima à base dos flagelos. No entanto, os estudos mais recentes da composição de proteínas do flagelo de *Chlamydomonas* não apresentam a CrSept como parte do proteoma flagelar.⁶⁷ Com isso, pode-se considerar que a CrSept tenha um papel de sustentação e/ou de barreira de difusão na membrana plasmática-flagelar, em vez de uma participação direta na composição do flagelo.

Septinas já foram identificadas no annulus do flagelo de espermatozoides formando um anel de auxílio de motilidade celular²⁵, assim como também já foram encontradas na zona de transição de cílios de eucariotos, formando uma barreira de difusão e controlando a entrada e saída de proteínas da zona ciliar.⁸⁰ Em *Tetrahymena thermophila*, septinas estão associadas a mitocôndrias localizadas próximas aos cílios celulares¹², e mostram um padrão de marcações pontuais ao longo da cadeia de cílios da célula. Já em leveduras, septinas participam da divisão por brotamento, encontrando-se no septo entre a célula filha e a célula-mãe, mas nunca foram relatados padrões de marcações pontuais.

Em contrapartida, a disposição de actina em células de leveduras observada por Karpova e colaboradores,⁸¹ tem um padrão bastante similar ao encontrado para a septina em *C. reinhardtii* nos estudos de imunolocalização por fluorescência. A actina participa da formação do citoesqueleto e pode ser encontrada tanto na disposição de fibras, quanto na formação de aglomerados pontuais. Karpova mostra que essas zonas pontuais são

provavelmente compostas por pequenos filamentos de actina (de 50 a 100 subunidades) associados a proteínas ligadoras de actina e podem dar origem a filamentos mais longos da proteína. O padrão observado para os pontos de actina assemelha-se ao encontrado para *C. reinhardtii*, reforçando a possibilidade da CrSept ter uma função estrutural e atuar como âncora a outras proteínas.

Além das marcações pontuais, a disposição de septinas observada nos planos mais externos de microscopia (planos mais próximos à membrana celular), assemelha-se a uma rede organizada de proteínas ancorada à membrana similar à disposição de fibras de actina no citoesqueleto de leveduras.⁸¹

5.4 SILENCIAMENTO GÊNICO POR amiRNA

O ciclo celular de *C. reinhardtii* é composto por uma longa fase G_1 , que pode chegar até 80% do ciclo, seguido por alternâncias entre as fases S e M, onde ocorre a duplicação do DNA e a divisão celular.⁸² A fase G_1 também é responsável pela síntese da maioria das proteínas utilizadas no processo de divisão. Uma vez que a célula entra na fase escura do ciclo celular e inicia a divisão, as células-filhas recém-formadas permanecem em G_0 até a retomada do ciclo claro, quando entram em G_1 e começam a crescer em tamanho e volume novamente.⁴⁴

O fenótipo celular observado após a inserção do amiRNA, nos transformantes de *C. reinhardtii*, assemelha-se visualmente ao que foi descrito em leveduras por Hartwell, em 1971. Primeiramente chamadas de proteínas CDC (Cell Division Cycle), as septinas de levedura formam uma estrutura filamentosa em forma de anel no septo de divisão entre as células filha e mãe, durante o brotamento, atuando como uma barreira de difusão celular, que permite uma distribuição de membranas e proteínas associadas para a célula filha, através de um crescimento isotrópico. Além disso, o anel também é responsável por restringir o septo e finalizar a citocinese após o brotamento.⁸³ A formação do broto está intimamente relacionada à formação do anel de septinas. Mutantes nulos para qualquer uma das quatro septinas em leveduras não formam o anel filamentoso e prejudicam o processo de divisão celular.⁸⁴ Nesses mutantes, o ponto de checagem do ciclo celular evita a transição do crescimento apical para isotrópico e as células se tornam multinucleadas, resultando em um fenótipo anormal.

O fenótipo observado em mutantes de amiRNA de *C. reinhardtii* mostram uma célula alongada que perdeu sua forma oval-arredondada. Esse fenótipo não foi observado no controle positivo de transformação (vetor vazio), onde as células pareceram se dividir corretamente e não se apresentaram achatadas ou em forma de bastão. É possível que a ausência da CrSept possa desestabilizar o citoesqueleto durante a divisão celular,

favorecendo o surgimento do fenótipo alongado quando as células filhas exercem forças opostas para concluir o processo de citocinese. Baseado na revisão de Faty e colaboradores,⁸⁴ uma possível explicação para o surgimento dessas células alongadas é demonstrado na figura 46. Esse esquema é baseado na hipótese de que a CrSept pode atuar ancorada à membrana e como andaime a proteínas do citoesqueleto que auxiliam na conclusão da citocinese, mantendo as fibras proteicas fixas nos polos da célula enquanto ocorre a separação das células filhas. Com a redução do número de CrSept disponíveis, o processo de citocinese é afetado com a ausência de pontos de ancoragem para as proteínas estruturais, e conforme a força de separação entre as células filhas começa a ser exercida, a célula perde sua capacidade de manter-se arredondada e se alonga. Como o fenótipo é transiente, uma vez concluída a divisão celular, as células voltam a adquirir a forma oval-arredondada.

Figura 46 - Esquema hipotético da divisão celular em *C. reinhardtii* e das forças atuantes na separação das células filhas. (a) Células não transformadas com amiRNA. A estrutura das proteínas do citoesqueleto se mantém durante a telófase e citocinese. (b) Fenótipo observado nas células transformadas com amiRNA. Pode ser que a CrSept forme uma estrutura de sustentação para proteínas do citoesqueleto que ajudariam a manutenção da forma oval-arredondada da célula, e a ausência da CrSept resultaria em um desequilíbrio das forças necessárias para a separação das células filhas, resultando no fenótipo em bastão observado.

Fonte: Elaborada pela autora.

A quantificação dos transcritos de *CrSept* nos transformantes do grupo G1, no qual as algas foram coletadas na hora 13h30 do ciclo celular, mostraram níveis de expressão de 46% a 56% menor que o controle para as amostras amiRNA5_14, amiRNA5_18 e amiRNA5_24. No grupo GII as algas foram coletadas nas horas 11 e 13 do ciclo celular, mas os níveis de expressão de *CrSept* durante o período de luz mostraram-se menor que o observado para o ciclo de escuro. A amostra amiRNA5_24 também mostrou um perfil de expressão distinto quando comparado ao grupo GI. Por fim, o grupo GIII apresentou um perfil de expressão similar ao observado em GII, exceto para a amostra amiRNA5_24, que pareceu, nesse experimento, ser a mais afetada pelas taxas de expressão do amiRNA, uma

vez que os níveis de expressão de CrSept mostraram-se menores quando comparados às amostras amiRNA5_14 e amiRNA5_24,

É interessante observar que os níveis de expressão de CrSept na hora 13 do GII são maiores que os níveis observados para as mesmas amostras coletadas no período claro (hora 11). No grupo GIII, embora esse perfil se repita para a amostra amiRNA5_14, as taxas de expressão parecem ser menores para as amostras amiRNA5_18 e amiRNA5_24.

Essa instabilidade de expressão nos diferentes grupos e não reprodutibilidade do experimento pode estar relacionada não somente à variação da qualidade do RNA extraído, mas também ao promotor (*PsaD*) utilizado no plasmídeo pChlamiRNA3int e aos genes normalizadores, cujas expressões mostraram-se variáveis ao longo do ciclo celular. O gene *PsaD* transcreve uma proteína de cloroplasto pertencente à maquinaria fotossintética, cuja expressão está relacionada à presença de luz no ambiente. O pico de expressão do gene *PsaD* ocorre por volta da hora 8 do ciclo celular, quando inicia um declínio. Na hora 13 do ciclo celular, o nível de expressão do gene é quase metade do valor observado para a hora 11 (figura 47). Como o tratamento do experimento consiste justamente na sincronização celular, o promotor PSAD no vetor de expressão de amiRNA pode resultar na variação de expressão de amiRNA ao longo do ciclo, e, de fato, a expressão da proteína PsaD se reduz durante o período de escuro. Além disso, os dados obtidos por Zones mostraram que a taxa de expressão de septinas possui um perfil semelhante ao da proteína, PsaD, com queda na expressão durante o período de escuro. Portanto, era de se esperar que os níveis de transcrito de *CrSept* no período escuro sempre fossem menores que os observados no período claro. Essa hipótese já havia sido levantada durante a execução do trabalho, anteriormente à publicação do estudo de transcriptoma feito por Zones e colaboradores.

A análise de expressão de proteínas por *western blot* dos grupos G1, G2 e G3 também se mostrou inconclusiva. Embora a quantificação das proteínas tenha sido em triplicata e a quantidade de proteína por amostra tenha sido normalizada, não foi possível quantificar ou correlacionar as amostras analisadas.

Figura 47 - Expressão do gene PSAD durante 24 horas de um ciclo celular sincronizado de *C. reinhardtii*. O promotor do gene PSAD Foi utilizado no vetor de expressão de amiRNA. A variação nos níveis de expressão do gene PSAD mostram que a força do promotor relaciona-se à presença de luz, o que pode gerar variações na expressão de amiRNA quando houver sincronização celular.

Fonte: ZONES et al.⁶²

6 CONCLUSÃO

O estudo funcional da septina de *C. reinhardtii* mostrou que a proteína está presente em todas as fases do ciclo celular da alga, o que pode ser confirmado pelos experimentos de análise de expressão quantitativa relativa, nos quais foram encontrados transcritos de CrSept em quatro pontos distintos do ciclo celular, e também pela imunomarcagem da proteína por *western blot*, também nos quatro períodos distintos do ciclo celular.

Sua função na célula ainda é incerta, mas os estudos de microscopia confocal revelaram uma possibilidade de função estrutural como suporte para outras proteínas e barreira de difusão na membrana, assim como os estudos de silenciamento gênico por amiRNA mostraram uma possível participação na citocinese durante o período de divisão celular.

A proteína CrSept foi observada em todo o corpo celular nos experimentos de imunomarcagem para microscopia confocal, o que levanta a hipótese de que a CrSept possa formar uma rede proteica próxima à membrana e que certamente atue em conjunto com outras proteínas. De fato, duas proteínas parceiras à septina foram resgatadas pelo ensaio de duplo-híbrido e, apesar da parceira selecionada para validação não ter tido comprovada a interação com CrSept *in vitro*, não se descarta a possibilidade da interação entre as proteínas ser transiente ou depender de um terceiro fator desconhecido que não foi reproduzido nos experimentos.

Por fim, além de estar presente em toda a célula, em G1 há uma incidência maior de CrSept próxima aos corpos basais, que dão origem aos flagelos da alga, permitindo indagar se a septina de *Chlamydomonas* também participa do crescimento flagelar e atua como uma barreira de difusão na membrana, de maneira semelhante ao já observado no *annulus* de flagelos de espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. genes controlling DNA replication and its initiation. *Journal of Molecular Biology*, v. 59, n. 1, p. 183-184, 1971.
- 2 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, v. 69, n. 3, p.717-721, 1976.
- 3 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *Journal of Cell Biology*, v. 112, n.4, p.535-44, 1991.
- 4 DIDOMENICO, B. J. et al. Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. *Molecular and General Genetics*, v. 242, n. 6, p. 689-698, 1994.
- 5 HARRIS, S. D.; MORRELL, J. L.; HAMER, J. E. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics*, v. 136, n. 2, p. 517-532, 1994.
- 6 NGUYEN, T. Q. et al. The *C. elegans* septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 113, pt 21, p. 3825-3837, 2000.
- 7 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.
- 8 NAKATSURU, S.; SUDO, K.; NAKAMURA, Y. Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 202, n. 1, p. 82-87, 1994.
- 9 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.
- 10 MERCHANT, S. S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, v. 318, n. 5848, p. 245-250, 2007.
- 11 AURY, J.-M. et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *paramecium tetraurelia*. *Nature*, v. 444, n. 7116 p. 171-178, 2006.
- 12 EISEN, J. A. et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biology*, v. 4, p. e286, 2006. doi:10.1371/journal.pbio.0040286.
- 13 ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. *The nonopisthokont septins: How many there are, how little we know about them, and how we might learn more*. *Methods in Cell Biology*, v. 136, p. 1-9, 2016. doi: 10.1016/bs.mcb.2016.04.003.
- 14 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.
- 15 KINOSHITA, M. Protein family review the septins. *Genome Biology*, v.4, n.11, p.236, 2003.

- 16 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.
- 17 IRAZOQUI, J. E.; LEW, D. J. Polarity establishment in yeast. *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 2169–2171, 2004. doi: 10.1242/jcs.00953.
- 18 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 of the Cell*, v. 13, n. 10, p. 3532–3545, 2002.
- 19 CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, v. 188, n. 4, p. 773–782, 2011.
- 20 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. 1111–1122, 1998.
- 21 BEITES, C. L. et al. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 5, p. 434–439, 1999.
- 22 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.
- 23 ONG, K. et al. Architecture and dynamic remodelling of the septin cytoskeleton during the cell cycle. *Nature Communications*, v. 5, p. 5698, 2014. doi: 10.1038/ncomms6698.
- 24 MESEROLL, R. A.; OCCHIPINTI, P.; GLADFELTER, A. S. Septin phosphorylation and coiled-coil domains function in cell and septin ring morphology in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 2, p. 182–193, 2013.
- 25 KUO, Y.-C. et al. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *Journal of Cell Science*, v. 128, p. 923–934, 2015. doi: 10.1242/jcs.158998.
- 26 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 114, pt. 5, p. 839–844, 2001.
- 27 SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 15, n. 11, p. 430–434, 1990.
- 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 MARTÍNEZ, C. et al. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 4, n. 6, p. 1388–1395, 2006.
- 31 RASALA, B. A. et al. Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, v. 74, n. 4, p. 545–556, 2013.

- 32 MARTINEZ, C.; WARE, J. Mammalian septin function in hemostasis and beyond. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), v. 229, n. 11, p. 1111–1119, 2004.
doi
- 33 BERTIN, A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *Journal of Molecular Biology*, v. 404, n. 4, p. 711–731, 2010.
- 34 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.
- 35 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.
- 36 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 18, n.1, p.54–60, 2006.
- 37 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, p.311–317, 2007.
- 38 NAKAHIRA, M. et al. A Draft of the Human Septin Interactome. *PLoS One*, v. 5, n.11, doi: 10.1371/journal.pone.0013799
- 39 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.
- 40 LIU, C. et al. Validation of housekeeping genes for gene expression studies in an ice alga *Chlamydomonas* during freezing acclimation. *Extremophiles*, v. 16, n.3, p.419–425, 2012.
- 41 GARCIA, W. et al. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. *Biochemistry*, v. 46, n.39, p. 11101–11109, 2007.
- 42 PISSUTI DAMALIO, J. C. et al. Self assembly of human septin 2 into amyloid filaments. *Biochimie*, v. 94, n.3, p. 628–636, 2012.
- 43 HUANG, Y. W. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS Journal*, v. 273, v.14, p.3248–3260, 2006.
- 44 HARRIS, E. H. Cell architecture. In: HARRIS, E. H. (Ed.). *Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*. 2nd ed. New York: Academic Press, 2009. v. 1, cap. 2, p. 25–64. doi:10.1016/B978-0-12-370873-1.00002-2.
- 45 SPUDICH, J. L.; SAGER, R. Regulation of the *Chlamydomonas* cell-cycle by light and dark. *Journal of Cell Biology*, v. 85, n.1, p.136–146, 1980.
- 46 MALICKI, J.; AVIDOR-REISS, T. From the cytoplasm into the cilium: bon voyage. *Organogenesis*, v. 10, n. 1, p. 138–157, 2014.
- 47 MEISTER, G.; TUSCHI, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 2004.
- 48 FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n.6669, p. 806–811, 1998.

- 49 JORGENSEN, R. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends in Biotechnology*, v. 8, n.12, p. 340–344, 1990.
- 50 HANNON, G. J. RNA interference. *Nature*, v. 418, n. 6894, p. 244–251, 2002.
- 51 MOLNÁR, A. et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, v. 447, n. 7148, p. 1126–1129, 2007.
- 52 MERCHANT, S. S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, v. 318, n. 5848, p. 245–250, 2007.
- 53 MOLNÁR, A. et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, v. 58, n. 1, p. 165–174, 2009.
- 54 ZHAO, T. et al. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant Journal*, v. 58, n.1, 157–164, 2009.
- 55 VERSELE, M. & THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends in Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 414–424, 2005.
- 56 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biological chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 681-687, 2011.
- 57 PINTO, A. P. A. et al. Filaments and fingers: novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, doi:10.1074/jbc.M116.762229.
- 58 SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. *Quarterly Review of Biology*, v. 76, n. 3, p. 348–349, 2001.
- 59 LING, M.; MERANTE, F.; ROBINSON, B. H. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, v. 23, n. 23, p. 4924–4925, 1995.
- 60 CHAMBERLAIN, K. L.; MILLER, S. H.; KELLER, L. R. Gene expression profiling of flagellar disassembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, v. 179, n. 1, p. 7-19, 2008.
- 61 HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. *Genome Methods*, v. 6, n. 10, p.986–994, 1996.
- 62 ZONES, J. M. et al. High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from *chlamydomonas reinhardtii* reveals continuous cell and metabolic differentiation. *Plant Cell*, v. 27, n. 10, p. 2743-2769, 2015.
- 63 AHUJA, D.; SAENZ-ROBLES, M. T.; PIPAS, J. M. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, v. 24, n. 52, p. 7729–7745, 2005.
- 64 MACDONALD, P. N. Two-Hybrid Systems. *Methods in Molecular Biology*, v. 177, 2001. doi: 10.1385/1592592104
- 65 VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, p. 0034.1–0034.11, 2002.

- 66 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.
- 67 CRAIGE, B. et al. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *Journal of Cell Biology*, v. 190, n. 5, p. 927–940, 2010.
- 68 SCHÖNFELD, C. et al. The nucleus-encoded protein MOC1 is essential for mitochondrial light acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 48, p. 50366–50374, 2004.
- 69 Li, Q. et al. S-Adenosyl homocysteine hydrolase (SAHH) accelerates flagellar regeneration in *Dunaliella salina*. *Current Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 249–254, 2013.
- 70 KUBO, T. et al. The *Chlamydomonas* hatching enzyme, sporangin, is expressed in specific phases of the cell cycle and is localized to the flagella of daughter cells within the sporangial cell wall. *Plant & Cell Physiology*, v. 50, n. 3, p. 572–583, 2009.
- 71 FUKADA, K.; INOUE, T.; SHIRAISHI, H. A posttranslationally regulated protease, VheA, is involved in the liberation of juveniles from parental spheroids in *Volvox carteri*. *Plant Cell*, v. 18, n. 10, p. 2554–2566, 2006.
- 72 YAMAZAKI, T. et al. Localization and evolution of septins in algae. *Plant Journal*, v. 74, n. 4, p. 605–614, 2013.
- 73 TURNER, M. A. et al. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 33, n. 2, p. 101–125, 2000.
- 74 BLABY, I. K. et al. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 10, p. 672–680, 2014.
- 75 BRZEZINSKI, K.; BUJACZ, G.; JASKOLSKI, M. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of plant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (*Lupinus luteus*). *Acta Crystallographica F*, v. 64, pt. 7, p. 671–673, 2008.
- 76 KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.
- 77 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 183–194, 2012. doi: 10.1038/nrm3284.
- 78 REITER, J. F.; BLACQUE, O. E.; LEROUX, M. R. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Reports*, v. 13, n. 7, p. 608–618, 2012.
- 79 DIENER, D. R.; LUPETTI, P.; ROSENBAUM, J. L. Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins. *Current Biology*, v. 25, n. 3, p. 379–384, 2015.
- 80 SAARIKANGAS, J.; BARRAL, Y. The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Reports*, v. 12, n. 11, p. 1118–1126, 2011.
- 81 KARPOVA, T. S. et al. Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: Relationships between cables and patches. *Journal of Cell Biology*, v. 142, n. 6, p. 1501–1517, 1998.

82 BISOVA, K.; ZACHLEDER, V. Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 10, p. 2585–2602, 2014.

83 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 478–489, 2008. doi:10.1038/nrm2407

84 FATY, M.; FINK, M.; BARRAL, Y. Septins: a ring to part mother and daughter. *Current Genetics*, v. 41, n. 3, p. 123-131, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Oligonucleotídeos específicos para o gene *CrSept* e os genes normalizadores *RPL19*, *RPL32* e *RACK1* para análise de expressão gênica por qPCR

Nome	Sequência	Tm (°C)	GC %	Tamanho primer	Tamanho amplicon
CS1-Fw	5' ATGTGGACCATCATCCCCGC 3'	60,0	60,0	20 pb	101 pb
CS1-Rv	5' ATGCGGTCCACGTTGTTGC 3'	59,2	57,9	19 pb	
CS2-Fw	5' GCAACAACGTGGACCGCAT 3'	59,2	57,9	19 pb	148 pb
CS2-Rv	5'TAGAAGCCCCAGCCCTTCTTG 3'	59,2	57,1	21 pb	
RPL19-Fw	5' GTTCTGAACTGCGGTCTGC 3'	59,6	57,9	19 pb	124 pb
RPL19-Rv	5' GCTGCTTACGGAAGATGAGG 3'	60,0	55,0	20 pb	
RPL32-Fw	5' GACTCGATCAAGACCTCATGG 3'	59,7	52,4	21 pb	147 pb
RPL32-Rv	5' GTACTTCAGGAAGCCGTTGG 3'	59,7	55,0	20 pb	
RACK1-Fw	5' CTGGGACAAGATGGTCAAGG 3'	60,5	55,0	20 pb	95 pb
RACK1-Rv	5' AGACGGTCACGGTGTTGAC 3'	59,6	57,9	19 pb	

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Juliana Sposto Avaca Crusca.

APÊNDICE B - Oligonucleotídeos utilizados para novas análises de expressão gênica. As sequências foram desenhadas através do software Beacon Designer™ e analisadas para manter 20 ± 2 bases, $t_m = 60 \pm 2^\circ\text{C}$ e teor de GC inferior a 60%.

Gene	Sequência	Tamanho (pb)	TM (°C)	GC%
PP2A	5' CTCATTCCGTTCTTAGC 3'	18	60,4°C	50%
	5' CAAGAGGTAGGCATACTG 3'	18	59,3°C	50%
07.g336450	5' CAAGTCGCACGAGATCCACG 3'	20	59°C	60 %
	5' TGTACGAGTCCATGGAGCCG 3'	20	59°C	60 %
01.g010400	5' ATGAACTCCATGCTCGT 3'	17	61,1°C	47,1%
	ATGAAGCTCCACGAGTT	17	61°C	47,1%

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE C - Sequências de amiRNA, energia de hibridização e oligonucleotídeos desenhados para clonagem do amiRNA no vetor pChlamiRNA3int

amiRNA	Sequência	Oligo Forward	Oligo Reverse
2	TAGTGGTTGTT CAGGTACCTT	5'ctagtAAGGTACCTGAACAATTACTAtctcgctgatcggcaccatgg gggtggtggtgatcagcgctaTAGTGGTTGTTTCAGGTACCTTg 3'	5'ctagcAAGGTACCTGAACAACCACTAtagcgctgatcaccaccaccc ccatggtgccgatcagcgagaTAGTAATTGTTTCAGGTACCTTa 3'
3	TTGTAGTTGGA GCAGATGCTA	5'ctagtTAGCATCTGCTCCAACAACAAtctcgctgatcggcaccatgg gggtggtggtgatcagcgctaTTGTAGTTGGAGCAGATGCTAg 3'	5'ctagcTAGCATCTGCTCCAACCTACAAtagcgctgatcaccaccaccc ccatggtgccgatcagcgagaTTGTTGTTGGAGCAGATGCTAa 3'
4	TTACTTCTTCTT CCAGGTCTG	5'ctagtCAGACCTGGAAGAAGGGGTAAAtctcgctgatcggcaccatg gggtggtggtgatcagcgctaTTACTTCTTCTTCCAGGTCTGg 3'	5'ctagcCAGACCTGGAAGAAGAAGTAAtagcgctgatcaccaccacc cccatggtgccgatcagcgagaTTACCCCTTCTTCCAGGTCTGa 3'
5	TGACTTGATGA GGGACGTCTA	5'ctagtTAGACGTCCCTCATCGGGTCAAtctcgctgatcggcaccatg gggtggtggtgatcagcgctaTGACTTGATGAGGGACGTCTAg 3'	5'ctagcTAGACGTCCCTCATCAAGTCAtagcgctgatcaccaccaccc ccatggtgccgatcagcgagaTGACCCGATGAGGGACGTCTAa 3'
6	TGAACATGTAC TTGACGTCTG	5'ctagtCCGACGTCAAGTACATCTTCAAtctcgctgatcggcaccatgg gggtggtggtgatcagcgctaTGAACATGTACTTGACGTCTGg 3'	5'ctagcCCGACGTCAAGTACATGTTCAtagcgctgatcaccaccaccc ccatggtgccgatcagcgagaTGAAGATGTACTTGACGTCTGg 3'
7	TAATGAAGCGC CGGACGTCAT	5'ctagtATGACGTCCGGCGCTTGATTAtctcgctgatcggcaccatg gggtggtggtgatcagcgctaTAATGAAGCGCCGGACGTCATg 3'	5'ctagcATGACGTCCGGCGCTTCATTAtagcgctgatcaccaccacc cccatggtgccgatcagcgagaTAATCAAGCGCCGGACGTCATa 3'
8	TCCATGACTTC AGACAACCCT	5'ctagtAGGGTTGTCTGAAGTTGTGGAtctcgctgatcggcaccatg gggtggtggtgatcagcgctaTCCATGACTTCAGACAACCCTg 3'	5'ctagcAGGGTTGTCTGAAGTCATGGAtagcgctgatcaccaccacc cccatggtgccgatcagcgagaTCCACAACCTTCAGACAACCCTa 3'
9	TAGAGGTTTCA TACTGGGCAT	5'ctagtATGCCCAGTATGAAATTTCTAtctcgctgatcggcaccatgg gggtggtggtgatcagcgctaTAGAGGTTTCATACTGGGCATg 3'	5'ctagcATGCCCAGTATGAAACCTCTAtagcgctgatcaccaccaccc ccatggtgccgatcagcgagaTAGAAATTTTCATACTGGGCATa 3'

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE D - Validação dos pares de oligonucleotídeos para análise de expressão gênica por qPCR do gene *crsept*.

Pares de oligonucleotídeos	Eficiência	R ²	slope	Stability values*	
CS1	122,4 %	0,989	-2,880	<i>Coefficient Variance</i>	<i>M value</i>
CS2	131,7 %	0,979	-2,741		
RPL19	104,0 %	0,993	-3,229	0,7380	2,1624
RPL32	110,1 %	0,990	-3,104	0,1098	1,4273
RACK1	92,5 %	0,986	-3,516	0,9211	2,0834

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com a Dra. Juliana S. A. Crusca.

APÊNDICE E - Validação dos *primers* utilizados no experimento de qPCR

Pares de oligonucleotídeos	Eficiência	R ²	slope	Stability values*	
CS2	106,2%	0,948	-3,183	<i>Coefficient Variance</i>	<i>M value</i>
PP2A	109,2%	0,990	-3,120	0,3610	1,1151
07.g336450	102,6%	0,995	-3,262	0,4678	1,7001
01.g010400	108,6%	0,987	-3,132	0,7142	1,2795

Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXOS

ANEXO A - Vetor pBTM116*, modificado a partir do vetor pBTM116 para conferir um marcador de resistência à canamicina.

Fonte: Rein Aasland, Universidade de Bergen, cedido pela Dra. Joci N. A. Macedo.

ANEXO B - Mapa do vetor pLexA_N, utilizado com a construção CrSeptG para o ensaio duplo híbrido

Fonte: Manual Dualhybrid Kit, DualSystems (descontinuado)

ANEXO C - Mapa do vetor pLexA_C, utilizado com a construção crseptngc para ligação do promotor pelo domínio C-terminal, para o ensaio duplo híbrido

Fonte: Manual Dualhybrid Kit, DualSystems (descontinuado)

ANEXO D - Composição dos meios de cultura seletivos para leveduras

Componente	SD-W	SD-L	SD-WL	SD-WH	SD-WLH
YNB (difco yeast nitrogen base)	6,7 g/L	6,7 g/L	6,7 g/L	6,7 g/L	6,7 g/L
Glicose	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
Adenina (A)	0,02 g/L	0,02 g/L	0,02 g/L	0,02 g/L	0,02 g/L
Leucina (L)	0,1 g/L	---	---	0,1 g/L	---
Histidina (H)	0,02 g/L	0,02 g/L	0,02 g/L	---	---
Triptofano (W)	---	0,02 g/L	---	---	---
Ágar ¹	18 g/L	18 g/L	18 g/L	18 g/L	18 g/L

¹ Adicionado somente para meios sólidos

Fonte: Dra. Joci N. A. Macedo.

ANEXO E - Soluções utilizadas para transformação em larga escala no ensaio de duplo híbrido

Solução	Composição
TE [10x]	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5
TE [1x]	1 mL TE [10X], 9 mL H ₂ O milli-Q
PEG 3350 50% (p/v)	50 g PEG 3350 em q.s.p. 100 mL H ₂ O
LiAc [10x]	LiAc 1M, pH 7,5 com ácido acético
PEG/LiAc	8 mL PEG 3350 50%, 1 mL TE [10x], 1 mL LiAc [10x]
TE/LiAc [1x]	1 mL TE [10x], 1 mL LiAc 10x, 8 mL H ₂ O milli-Q

Fonte: Dra Joci N. A. Macedo.

ANEXO F - Vetor pChlamiRNAint utilizado para transformação de amiRNA em *Chlamydomonas*

Fonte: Chlamy Collection^{***}

^{***} Disponível em: <<http://www.chlamycollection.org/product/pchlamirna3int/>> Acesso em 20 de Janeiro de 2017