UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PAOLA LANZONI

Interação não-canônica entre septinas: a análise da interação na interface G entre SEPT3 e septinas do grupo II

São Carlos

2017

PAOLA LANZONI

Interação não canônica entre septinas: a análise da interação na interface G entre SEPT3 e septinas do grupo II

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

Área de concentração: Física Aplicada. Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt.

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)

Lanzoni, Paola

Interação não canônica entre septinas: a análise da interação na interface G entre SEPT3 e septinas do grupo II / Paola Lanzoni; orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2017.
137 p.

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

1. *SEPT3*. 2. *SEPT8*. 3. Interação não-canônica. 4. Interação proteína-proteína. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

Àquela que primeiro me ensinou o que é resiliência e a quem eu serei eternamente grata por nunca desistir de mim, minha mãe Sílvia Helena Mangutchi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar saúde e forças para completar mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador Dr. Richard Charles Garratt, por toda a paciência com os meus erros e dedicação ao meu trabalho. Serei eternamente grata por ter me ensinado que o papel de um cientista não é apenas estar em um laboratório gerando novas teorias, mas também contribuir para o desenvolvimento social através da educação. Será, com certeza, um exemplo e um espelho que levarei por toda a minha carreira.

Agradeço à minha mãe, Sílvia Helena Mangutchi, por nunca me permitir desanimar ou desistir de um sonho, mesmo quando ela mesma não fazia ideia de como iríamos alcançá-lo. Sua coragem e bravura sempre serão exemplos para minha vida e, de certa forma, sempre estarão intrínsecas em minhas ações.

Agradeço ao meu irmão Pedro Henrique Mangutchi de Souza por ser minha inspiração em todos os passos que dei na minha vida, desde o seu nascimento em 20 de Outubro de 2002.

Agradeço à minha irmã Príncia Lanzoni, por ser meu ombro amigo sempre que precisei e por me dar todas as broncas que foram necessárias.

Agradeço à minha tia, Lucia Manguti, por ser a amiga que eu sempre pude contar em todos os momentos.

Agradeço ao meu noivo, João Victor de Souza Cunha, por ter me acompanhado nas horas felizes e nas horas de dor desde a minha graduação, mostrando que a amizade do copo de cerveja pode chegar às milhares de xícaras de café em frente a um computador e, de modo sublime, levar a um champanhe em frente à Torre Eiffel.

Agradeço ao meu amigo Everton Edésio Dinis Silva, por me ajudar de todas as maneiras que um amigo pode ajudar a outro.

Agradeço a minha amiga Raissa Ferreira Gutierrez, pelos conselhos e por ser meu refúgio em São Carlos (ou em Campinas!).

Agradeço aos meus professores do LBEst Dr. Otávio Henrique Thiemann e Dr. Eduardo Horjales Reboredo, pelo carinho e atenção sempre que eu precisei discutir resultados conflitantes e pela preocupação com o meu preparo científico. O amparo dado me mostrou que o trabalho em grupo deve contemplar todas as esferas de participação.

Agradeço à Dra. Joci Neuby Alves Macedo, pelo suporte e orientação no início do meu contato com as septinas e por me tornar uma pessoa mais confiante no laboratório.

Agradeço aos meus colegas e amigos de grupo Diego Leonardo, Fernanda Sala, Dr. Ivan Rosa e Silva e Dra. Tatiana Watanabe por estarem comigo durante todo esse processo de aprendizado e descobertas, discutindo resultados e ideias e contribuindo para a minha formação como cientista e colaboradora. Também importantes para esse enriquecimento, gostaria de agradecer a Emérita Mendoza, Erick Suclupe Farro e Johan Araujo Hernani.

Agradeço aos meus colegas Dr. Max Renner, Dr. Guido Paesen, Dr. Jonathan Grimes e Dr. Tao Hsin pelas discussões sobre os meus resultados. Além disso, a confiança depositada no meu trabalho e preocupação para que eu aprendesse novas técnicas me renovaram a autoconfiança e colocaram novos horizontes na minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Michel De Groote, Suelen Camargo, Dr. Marco Túlio, Nathália Bellini, Renata Porto, Jéssica Bonomo, Dr. Vitor Hugo Serrão, Adriano Fernandes, Jéssica Fernandes, Thomás Michelana, Ana Laura Lima, Gabriela Viotto Sarro, Dra. Juliana Torini, Dra. Larissa Romanello, e aos técnicos Dr. Humberto Pereira D'Muniz e Norma Bianca Saes por todo apoio dentro e fora do nosso ambiente de trabalho. Também gostaria de agradecer aos técnicos do Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” Derminda Isabel de Moraes, Dra. Andressa Alves Pinto e Dr. Rafael Panhota pelo carinho e auxílio nos experimentos biofísicos aqui mostrados.

Gostaria de agradecer pela paciência daquelas que contribuíram para o meu primeiro contato com o laboratório e que foram peças fundamentais na minha introdução à ciência: Dra. Ilana Camargo, Dra. Susana Sculaccio Beozzo, Dra. Sasi Conte e Dra. Caterina Alfano.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento em todas as etapas do trabalho através do processo 2014/11772-7. Também sou grata ao Instituto de Física de São Carlos pela infraestrutura e apoio no meu desenvolvimento e à Universidade de Oxford pela oportunidade de estágio de verão em 2016.

“E no fim, o amor que você recebe é igual ao que você faz.”
(The Beatles)

RESUMO

LANZONI, P. **Interação não canônica entre septinas:** a análise da interação na interface G entre SEPT3 e septinas do grupo II. 2017. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

As septinas compõem o quarto componente do citoesqueleto das células eucarióticas, atrás da actina, miosina e filamentos intermediários. São proteínas filamentosas que se arranjam em forma de fibras e anéis, desempenhando um papel estrutural na célula. Os seres humanos expressam 13 septinas, que são divididas em 4 grupos diferentes de acordo com sua estrutura primária: grupo I (SEPT3, SEPT9, SEPT12); grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14); grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5) e grupo IV (SEPT7), sendo que SEPT13 foi caracterizada como um pseudogene de SEPT7. O filamento fisiológico mais bem estudado é composto por SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (nesta exata sequência), e é usado como a base para a descrição da formação canônica, onde se acredita que septinas do mesmo grupo ocupam o mesmo lugar no filamento. Entretanto, ensaios de duplo-híbrido identificaram muitas interações não canônicas inesperadas entre septinas como SEPT9-SEPT6 e SEPT9-SEPT8, sugerindo estes também possam existir *in vivo*. Além destes, estudos mostraram a existência de interações entre septinas do grupo I e grupo II, e especialmente no caso SEPT11-SEPT12, a interação deixa de existir ao inserir uma mutação sítio-dirigida na interface G destas proteínas. O presente trabalho investiga a interação entre SEPT3, uma septina do grupo I, com todas aquelas do grupo II. Esta interação foi estudada por análises de coexpressão e copurificação em resina de afinidade ao cobalto, onde apenas a SEPT3 possuía uma extensão de seis histidinas em seu N-terminal. Esta primeira análise mostrou que SEPT3 não foi copurificada com todos os membros do grupo II dando uma clara evidência de variação de afinidade dentro do grupo. Usando esta abordagem, SEPT6, SEPT10 e SEPT14 não mostraram interação com SEPT3, enquanto SEPT8 e SEPT11 copurificaram com SEPT3, mas não em concentrações estequiométricas. Para os complexos SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11, uma segunda etapa de purificação foi realizada por meio de cromatografia de exclusão molecular, onde um pico de grande variância em relação à média indicou um valor de massa molecular entre monômeros e dímeros. Os mesmos, quando avaliados por espalhamento de luz a múltiplos ângulos mostraram variação na massa molecular ao longo do pico de eluição conforme ele era eluído. Tal variação era compatível com a eluição de dímeros no início até monômeros no final. Os estudos da interação entre SEPT3-SEPT8 por ultracentrifugação analítica indicou uma tendência de associação em altas concentrações das

proteínas, compatível com a constante de dissociação determinada por termoforese em microescala, na ordem de dezenas de micromolar. Tais resultados levantaram questões acerca da relevância fisiológica destes complexos e reforçam a importância de um estudo mais aprofundado na formação dos complexos não canônicos de septinas para o desenvolvimento celular.

Palavras chave: SEPT3. SEPT8. Interação não-canônica. Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

LANZONI, P. **Non-canonical septins interactions:** analysis of the interaction via G interface of SEPT3 and group II septins. 2017. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The septins are accepted to be the fourth cytoskeleton component of the eukaryotic cells, after actin, myosin and intermediate filaments. They are filament forming proteins that are organized in fibers and rings, having a structural role in the cell. Humans express 13 septins, which are divided into 4 different groups according to their primary structure: group I (SEPT3, SEPT9, SEPT12); group II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14); group III (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5) e group IV (SEPT7). SEPT13 was later characterized as a SEPT7 pseudogene. The best characterized filament is built up from SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (in this exact sequence), and is used as a basis for the description of the so-called canonical arrangement, which accepts that septins from the same group can occupy the same position within the filament. However yeast two-hybrid assays identified several unexpected interactions such as SEPT9-SEPT6 and SEPT9-SEPT8, raising the possibility that these could also exist *in vivo*. Furthermore, studies have shown the existence of interactions between group I and group II, and especially in the SEPT11-SEPT12, the interaction dissolves when a mutation in the G interface is inserted. The present work investigates the interaction between SEPT3, a group I septin, with all of those from group II. This interaction was studied through co-expression and co-purification methods using metal affinity chromatography, where only the SEPT3 contained the six histidines extension. This initial analysis showed that SEPT3 did not co-purify with all group II members, clearly pointing to variability in the affinity within group. Using this approach SEPT6, SEPT10 e SEPT14 showed no interaction with SEPT3, whilst SEPT8 and SEPT11 co-purified with SEPT3, but not in stoichiometric concentrations. For the SEPT3-SEPT8 and SEPT3-SEPT11 complexes, a second purification stage was performed using size exclusion chromatography, where a broad peak was observed corresponding to a molecular mass value which was intermediate between a dimer and a monomer. The same complexes, when evaluated by multiple angle light scattering revealed a variation in the molecular mass across the peak as it eluted. Such variation was compatible with elution of dimers at the beginning and monomers at the end. Studies for the SEPT3-SEPT8 interaction via analytical ultracentrifugation suggested a trend to associate in high protein concentration, consistent with the dissociation constant found by microscale thermophoresis, which was of the order of ten micromolar. The results raise questions

concerning the physiological relevance of these complexes and reinforce the importance of further studies on the non-canonical assembly of septin complexes for cellular development.

Keywords: SEPT3. SEPT8. Non-canonical interactions. Protein-protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Microscopia eletrônica mostrando a formação de septos entre as células mãe e filha de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	27
Figura 2 -	Imagens sequenciais em tempo, mostrando o processo de citocinese de células HeLa por microscopia de fluorescência.	28
Figura 3 -	Exemplos de estruturas formadas pelas septinas nos tecidos humanos.	31
Figura 4 -	Modelo esquemático das funções das septinas em diferentes sistemas orgânicos e suas conexões com doenças humanas.	32
Figura 5 -	Os motivos importantes para a ligação de GTP.	34
Figura 6 -	Diagrama de blocos esquematizando os principais domínios de cada septina.	36
Figura 7 -	Estrutura cristalográfica de um filamento fisiológico de septinas humanas.	37
Figura 8 -	Formação canônica dos filamentos de septinas nos modelos de trímero e tetrâmero.	39
Figura 9 -	Comparação entre os filamentos de septinas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Homo sapiens</i>	40
Figura 10 -	Compêndio de interações não canônicas encontradas.	43
Figura 11 -	Proposta formação não canônica de filamentos de septinas.	44
Figura 12 -	Montagem do vetor de expressão bacteriano pETDuet-1.	52
Figura 14 -	Formação de um momento de dipolo.	58
Figura 15 -	O sistema SEC-MALS.	61
Figura 16 -	Dados de SEC-MALS pelo programa ASTRA 7, utilizando uma amostra de BSA como modelo experimental.	62
Figura 17 -	Execução do experimento de termoforese em microescala.	67
Figura 18 -	A ultracentrifugação analítica, velocidade de sedimentação.	71
Figura 19 -	Eletroforese em gel de agarose 1% contendo a amplificação dos cDNAs de <i>SEPT3</i> , <i>SEPT6</i> , <i>SEPT8</i> , <i>SEPT10</i> , <i>SEPT11-GCα0</i> e <i>SEPT14</i> .	77
Figura 20 -	SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT14.	80
Figura 21 -	SDS-PAGE 10% do teste de expressão para SEPT3-SEPT14 utilizando meio auto-indutor.	81
Figura 22 -	SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT10.	82

Figura 23 - SDS-PAGE 10% do teste de expressão para SEPT3-SEPT10 utilizando meio auto-indutor.....	83
Figura 24 - SDS-PAGE 10% do padrão de purificação em resina de afinidade ao cobalto do complexo SEPT3-SEPT10 expresso em meio AI.....	83
Figura 25 - SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT6.	85
Figura 26 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT6 a 500 mM NaCl.	86
Figura 27 - Cromatografia de exclusão molecular (SEC) para o complexo SEPT3-SEPT6, em tampão contendo 500 mM de NaCl.....	87
Figura 28 - SDS-PAGE 10% das frações eluídas na cromatografia de exclusão molecular (SEC) para o complexo SEPT3-SEPT6 a 500mM de NaCl.....	87
Figura 29 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT6 a 800 mM NaCl.	88
Figura 30 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto TALON para o complexo SEPT3-SEPT11 usando tampão a 800 mM NaCl.	89
Figura 31 - Curva de calibração obtida para a coluna Superdex 200 10/300 utilizando tampão HEPES.	91
Figura 32 - Curva de cromatografia em Superdex 200 10/300 do complexo SEPT3-SEPT11 em tampão contendo 800 mM NaCl.....	92
Figura 33 - Ampliação da região dos picos de eluição de SEPT3-SEPT11 em Superdex 200 e sobreposição com as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%.	93
Figura 34 - Gráfico de <i>Despiking Procedure</i> obtido pelo programa ASTRA 7.....	94
Figura 35 - Gráfico controle contendo a definição dos picos do SEC-MALS para SEPT3-SEPT11.	95
Figura 36 - Gráfico de massa molar <i>versus</i> volume, mostrando as medidas em tempo real para cada ponto captado.....	96
Figura 37 - Gráfico de massa molecular <i>versus</i> volume obtido para uma amostra de poliacrilamida.	97
Figura 38 - SDS-PAGE 10% das alíquotas de purificação em resina de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT8 usando diferentes concentrações de cloreto de sódio no tampão..	98

Figura 39 - Curva de cromatografia em Superdex 200 10/300 do complexo SEPT3-SEPT8, em diferentes concentrações de cloreto de sódio no tampão de purificação.	99
Figura 40 - Sobreposição do gráfico de eluição de SEPT3-SEPT8 em Superdex 200 e as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%.	101
Figura 41 - SDS-PAGE 10% das alíquotas de purificação em resina de afinidade ao cobalto para a construção SEPT8-MCS2.	102
Figura 42 - Definição dos picos relativos às espécies de septina em solução para o complexo SEPT3-SEPT8.	103
Figura 43 - Gráficos de Massa <i>versus</i> Tempo para as amostras de SEPT3-SEPT8.	104
Figura 44- Sobreposição do gráfico de eluição de SEPT3 e SEPT8, nativas, em Superdex 200 e as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%..	106
Figura 45 - Gráficos de c(s) <i>versus</i> coeficiente de sedimentação obtido através do programa Gussi.	107
Figura 46 - Cromatograma de absorbância a 254 nm <i>versus</i> tempo de retenção para as espécies GTP, GDP, e para o sobrenadante após desnaturação por ácido perclórico de SEPT3, SEPT8 e SEPT8G	110
Figura 47 - Gráfico de absorbância a 254 nm <i>versus</i> tempo de retenção para as espécies GTP, GDP, e para o sobrenadante após desnaturação por ácido perclórico do complexo SEPT3-SEPT8 em dois estágios de purificação.....	111
Figura 48 - Interação entre SEPT3 e SEPT8 analisada pela ultracentrifugação analítica, sem adição de GTP. As concentrações indicadas correspondem à mistura equimolar das moléculas parceiras.....	113
Figura 49 - Sobreposição das curvas de fluorescência relativa <i>versus</i> tempo para a formação do complexo SEPT3-SEPT8.....	115
Figura 50 - Sobreposição das curvas de fração ligada <i>versus</i> concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8.	116
Figura 51 - Curvas de fração ligada <i>versus</i> concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8.....	117
Figura 52 - Curvas de interação para SEPT8G marcada com SEPT3, com adição de GTP em 3x de excesso.	118
Figura 53 - Gráfico de fração ligada <i>versus</i> concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8G, com adição de GTP em excesso	119

Figura 54 - Alinhamento dos domínios G das septinas SEPT2 (vermelho), SEPT3 (verde) e SEPT9 (ciano) realizado pelo programa Chimera..... 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Interações entre septinas humanas observadas por Nakahira e Macedo em experimentos de duplo-híbrido em leveduras.	42
Tabela 2 -	Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das janelas abertas de leitura para as septinas <i>SEPT6</i> , <i>SEPT8</i> , <i>SEPT10</i> , <i>SEPT11</i> e <i>SEPT14</i>	49
Tabela 3 -	Composição das reações para amplificação dos genes de septinas por reação em cadeia de polimerase.	50
Tabela 4 -	Programa de ciclos termais para a amplificação dos genes de septina por reação em cadeia de polimerase	50
Tabela 5 -	Composição do meio Lennox Broth para um volume final de 1 L.	51
Tabela 6 -	Técnicas aplicadas a cada complexo de septinas estudado.	53
Tabela 7 -	Condições observadas nos testes de expressão dos complexos de septinas.....	54
Tabela 8 -	Composição do meio Auto-indutor (AI) para um volume final de 1 L.....	54
Tabela 9 -	Composição dos tampões utilizados durante a purificação das septinas.	56
Tabela 10 -	Padrões de massa molecular utilizados para a curva de calibração da Superdex 200 10/300.....	57
Tabela 11 -	Dados de volume parcial específico (v) e concentrações utilizadas para cada amostra de septina estudada por ultracentrifugação analítica (AUC).....	72
Tabela 12 -	Valores de coeficiente de sedimentação obtidos pelo programa Sednterp para as septinas e seus complexos.....	73
Tabela 13 -	Valores esperados para massa molecular dos monômeros de septinas.	78
Tabela 14 -	Valores de volume de eluição (V_e) obtidos para os padrões de massa molecular utilizados na calibração da coluna Superdex 200 10/300.	90
Tabela 15 -	Dados correspondentes a cada pico na eluição de Superdex 200 10/300 para o complexo SEPT3-SEPT11.	92
Tabela 16 -	Resultados obtidos para os momentos de massa molecular presentes na amostra de SEPT3-SEPT11, analisada por SEC-MALS e calculadas pelo programa ASTRA 7	95
Tabela 17 -	Dados de massa molecular obtidos por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna Superdex 200 10/300 GL para o complexo SEPT3-SEPT8.....	100

Tabela 18 - Resultados obtidos para os momentos de massa molecular presentes na amostra de SEPT3-SEPT8, analisada por SEC-MALS e calculadas pelo programa ASTRA 7.....	104
Tabela 19 - Dados correspondentes aos picos de eluição de Superdex 200 10/300 para SEPT3 e SEPT8 purificadas isoladamente.	107
Tabela 20 - Resultados obtidos para AUC de SEPT3, SEPT8 e SEPT8G separadamente.....	108
Tabela 21 - Concentrações das septinas analisadas por cromatografia de troca iônica (HPLC-DEAE).	109
Tabela 22 - Resultados obtidos por ultracentrifugação analítica para a associação de SEPT3 com SEPT8, na ausência de GTP, em frações equimolares.	113
Tabela 23 - Dados de ajuste para a formação do complexo SEPT3-SEPT8 utilizando NTAffinity Analysis para Termoforese com T-jump.	116
Tabela 24 - Dados de ajuste para a formação do complexo SEPT3-SEPT8 utilizando NTAffinity Analysis para apenas Termoforese.	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6xHis	Extensão de 6 histidinas acopladas ao N-terminal
GFP	Proteína verde-fluorescente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GTP	Trifosfato de guanosina
GDP	Difosfato de guanosina
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
TRAFAC	Fator pós-traducional
MBP	Proteína ligadora de maltose
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
ORF	Fase aberta de leitura
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho molecular
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
SEC-MALS	Cromatografia por exclusão de tamanho molecular acoplado ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos
AUC	Ultracentrifugação analítica
MST	Termoforese em microescala
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RF-OPC	Cromatografia de purificação de nucleotídeos por fase reversa
PCR	Reação em cadeia de polimerase
LB	Meio de lisogenia
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
MCS1	Sítio de múltipla clonagem 1
MCS2	Sítio de múltipla clonagem 2
DO ₆₀₀	Densidade óptica aferida a 600 nm
SDS-PAGE 10%	<i>Eletroforese em gel desnaturante com 10% de poliacrilamida</i>
AI	Auto-indutor
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
L-Arg	Arginina

L-Glu	Glutamato
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanosulfônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
MM	Massa molecular
RGD	Rayleigh-Gans-Debye
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KOH	Hidróxido de potássio
LED	Diodo emissor de luz
LEC	Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Y2H	Duplo híbrido em leveduras

LISTA DE SÍMBOLOS

V_0	Volume morto em Superdex 200
K_{av}	Constante de calibração para Superdex 200
V_e	Volume de eluição em Superdex 200
$\vec{E}$	Vetor campo elétrico
$\vec{B}$	Vetor campo magnético
$\vec{k}$	Vetor de propagação de onda
Δn	Variação de coeficiente de refração
Δc	Variação de concentração de partículas
$\frac{\partial n}{\partial c}, \text{dRI}$	Índice de refração diferencial
$R(\theta)$	Razão de Rayleigh para a dispersão da luz em função do ângulo de espalhamento
M_w	Massa molar média sobre o peso
M_n	Massa molar média sobre o número
M_z	Massa molar média sobre o valor de Z
A_2	Segundo coeficiente virial
N_A	Número de Avogadro, $6,02 \times 10^{23}$
n_0	Índice de refração do solvente
λ_0	Comprimento de onda incidente
r_g	Raio de giro
$I(\theta)$	Intensidade de luz espalhada em relação ao ângulo de detecção
j	Fluxo de massa
D	Coeficiente de difusão de massa
∇c	Gradiente de concentração das moléculas
D_T	Coeficiente de termodifusão
∇T	Gradiente de temperatura
u	Velocidade linear
S_T	Coeficiente de Ludwig-Soret
G	Energia Livre de Gibbs
k, k_B	Constante de Boltzmann, $1,38 \times 10^{-23} JK^{-1}$
ΔH	Variação da Entalpia

ΔS	Variação da Entropia
K_D	Constante de Dissociação
F_{norm}	Fluorescência Relativa Normalizada
ω	Velocidade angular
r	Posição radial
$\bar{v}$	Volume parcial específico
f	Coefficiente de fricção
ρ	Densidade do solvente
F_G	Força gravitacional
F_E	Força de empuxo
F_B	Força de arraste
R	Constante universal dos gases perfeitos
s	Coefficiente de sedimentação
S	Svedberg, 10^{-13} segundos
f/f_0	Razão friccional
η	Viscosidade do solvente
R_H	Raio hidrodinâmico
S_{esf}	Máximo coeficiente de sedimentação teórico, estimado para uma esfera de massa M

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	As septinas.....	27
1.1.1	Aspectos fisiológicos e funcionais	27
1.1.2	A expressão e funcionalidade das septinas em mamíferos.....	29
1.2	Caracterização estrutural	33
1.3	As interfaces de interação.....	36
1.4	A montagem dos filamentos de septina.....	39
1.4.1	A montagem canônica	39
1.4.2	A montagem não canônica	41
1.5	SEPT3 como um representante do grupo I.....	43
2	OBJETIVOS.....	45
2.1	Objetivos gerais.....	45
2.2	Objetivos específicos.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Validação da interação não canônica	49
3.1.1	Clonagem dos genes de septina em vetor bicistrônico.....	49
3.1.2	Construção de vetor bicistrônico para expressão de apenas uma ORF de septina.....	52
3.1.3	Teste de expressão.....	53
3.1.4	Expressão das septinas para análises biofísicas	55
3.1.5	Purificação dos complexos de septina e das septinas isoladas.....	55
3.1.5.1	Estágio 1: Purificação por afinidade ao cobalto	55
3.1.5.2	Estágio 2: Purificação por exclusão de tamanho molecular.....	56
3.1.6.1	Calibração da coluna de purificação Superdex 200 10/300 GL.....	56
3.1.7	Análise do estado oligomérico através da Cromatografia de Exclusão de Tamanho acoplada ao Espalhamento de Luz a Múltiplos Ângulos (SEC-MALS).....	57
3.2	Verificação da interface de interação	62
3.2.1	Análise do conteúdo de nucleotídeos (GTP/GDP) ligado a SEPT3, SEPT8 e ao complexo SEPT3-SEPT8	62
3.3	Estudo da oligomerização, determinação das constantes de dissociação e validação da interface de interação entre SEPT3 e SEPT8.....	63

3.3.1	Análise da interação de SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT8G utilizando termoforese em microescala	63
3.3.2	Análise de oligomerização de SEPT3-SEPT8 através da ultracentrifugação analítica (AUC).....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
4.1	Construção dos vetores para expressão dos complexos de septinas	77
4.2	Validação da interação não canônica entre septinas dos grupos I e II.....	78
4.2.2	SEPT3-SEPT10	82
4.2.3	SEPT3-SEPT6	84
4.2.4	SEPT3-SEPT11	89
4.2.5	SEPT3-SEPT8	98
4.3	As interações não canônicas encontradas	105
4.4	As propriedades de interação entre SEPT3-SEPT8	106
4.4.1	As interfaces de interação entre SEPT3-SEPT8	108
4.5	A interação SEPT3-SEPT8 só acontece para as proteínas nativas	112
4.5.1	Ultracentrifugação analítica	112
4.5.2	Termoforese em microescala	114
4.6	Repensando a interação entre SEPT3 e as septinas do grupo II	120
4.7	As diferenças estruturais existentes entre SEPT3 e SEPT9.....	120
5	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS.....	129

INTRODUÇÃO

“Nenhuma descoberta foi feita sem um palpite ousado”

(Isaac Newton)

1 INTRODUÇÃO

1.1 As septinas

1.1.1 Aspectos fisiológicos e funcionais

Septinas são proteínas estruturais que fazem parte do citoesqueleto das células eucariótica e são membros da superfamília de pequenas GTPases do tipo *Ras*, possuindo um motivo *P-loop* de ligação de nucleotídeos. (1) Seu domínio GTPase central é altamente conservado embora a velocidade de hidrólise do nucleotídeo seja muito lenta, praticamente anulando a atividade enzimática. (2) Elas foram inicialmente identificadas em septos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por Hartwell em meados de 1970, (3) quando as caracterizou como fundamentais para a formação de anéis contráteis para separação das células-mãe das células-filha. Posteriormente, em 1976, Byers e Goetsch, (4) em estudos sobre os aspectos morfológicos e estruturais envolvidos na divisão celular da levedura, identificaram estes anéis contráteis compostos de polímeros de septinas com 10 nm de largura utilizando microscopia eletrônica (Figura 1). Nesta ocasião, foi mostrado que estes filamentos se associavam periodicamente em torno do septo, em íntima interação com a membrana plasmática, desfazendo-se no início da citocinese.

Figura 1 - Microscopia eletrônica mostrando a formação de septos entre as células mãe e filha de *Saccharomyces cerevisiae*. Os filamentos de septina formam anéis em torno do septo, indicados por setas.

Fonte: Adaptada de BYERS; GOESTSCH. (4)

Posteriormente estas mesmas proteínas foram também identificadas em *Drosophila melanogaster* começando pela proteína Pnut (5) seguida da caracterização de 4 novos membros, (5–9) quando novas descobertas apontaram para a função das septinas não somente em citocinese, mas também na compartimentalização celular. (10-11) Em humanos a primeira septina caracterizada foi a Nedd5 (posteriormente renomeada de SEPT2), (12) através de um escaneamento de genes envolvidos no desenvolvimento do cérebro de camundongos, onde a mesma mostrou-se intimamente ligada com a divisão celular, como mostraram os dados de microscopia de fluorescência utilizando Nedd5 fusionada a GFP (Figura 2). Apesar de não terem sido encontradas em plantas até o momento, (13) as septinas foram recentemente identificadas em algas. (14-15)

Figura 2 - Imagens sequenciais em tempo, mostrando o processo de citocinese de células HeLa por microscopia de fluorescência. Nedd5-GFP é mostrada em verde enquanto o DNA cromossomal é mostrado em vermelho. Os números indicam o tempo em minutos, iniciando na anáfase e finalizando na intérfase. No início do experimento (tempo 0 min), nota-se uma distribuição homogênea de Nedd5-GFP pela célula, entretanto a partir do tempo 4 min inicia-se a formação de uma banda verde entre os dois núcleos celulares marcados em vermelho, indicando que Nedd5 está participando da formação do septo entre as células-filha, exercendo um papel importante na citocinese.

Fonte: Adaptada de KINOSHITA. (16)

Os humanos possuem treze genes homólogos de septinas que são divididos em quatro subgrupos: Grupo I (SEPT3, SEPT9, SEPT12), Grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14), Grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5) e Grupo IV (SEPT7). (17-18) Inicialmente, acreditava-se que haviam quatorze septinas humanas expressas mas, em 2011,

Russell e Hall (19) mostrou que SEPT13 nada mais era do que um pseudogene de SEPT7, reduzindo assim o número de membros de septinas humanas para apenas treze, como aqui descrito.

As septinas possuem três domínios característicos: um domínio G central e os domínios N- e C-terminal. Septinas do grupo III possuem uma região curta de *coiled-coil* presente no domínio C-terminal enquanto nos grupos II e IV esta região é mais longa e, finalmente, o grupo I não possui nenhum *coiled-coil*. (18,20) Acredita-se que a associação entre septinas aconteça de duas maneiras diferentes: entre os domínios G de septinas vizinhas pela associação com GTP ou GDP e pelos seus *coiled-coils*, formando homo e heterodímeros que se polimerizam para a formação de filamentos como será descrito mais adiante.

Em humanos, as septinas formam fitas e anéis na célula (21) durante diferentes estágios da divisão celular e no tráfego vesicular, (22-23) tendo a participação de cada uma delas em diferentes aspectos fisiológicos. A formação destas estruturas superiores inicia-se com uma formação de filamentos de septinas que então se associam de maneira mais complexa, formando estruturas de mais alta ordem.

Acredita-se que a expressão de septinas específicas em cada tecido possa influenciar nas estruturas formadas pelas mesmas devido aos processos biológicos aos quais estão envolvidas, (24) como é o caso de SEPT14 (na formação do *annulus* em espermatozoides). (25)

1.1.2 A expressão e funcionalidade das septinas em mamíferos

Nos mamíferos, as septinas são expressas em níveis variáveis, de acordo com o tecido observado e possuem diferentes funções, associando-se à membrana plasmática (26-27) ou a filamentos de actina (22,28-31) e microtubulos. (32-33)

Publicações recentes de Menon et al.(34) mostraram que camundongos *knockout* para *SEPT7*, uma septina essencial para a formação de filamentos, desenvolveram-se de forma independente de septinas em suas células hematopoiéticas. No entanto, os embriões não conseguem mais se desenvolver após o dia E7, evidenciando a importância desta proteína para o desenvolvimento de outros tecidos. Por outro lado, células cancerosas epiteliais não conseguem proliferar na ausência de septinas. Tal fato pode ser explicado pela descoberta de Founounou e colaboradores que em 2013 (35) mostraram que as septinas são essenciais na divisão celular entre células aderentes, em que o processo é realizado de maneira

perpendicular ao plano do epitélio (chamada de citocinese planar). Deste modo, as septinas seriam dispensáveis na divisão celular ortogonal. Pensando desta maneira, é compreensível que células hematopoiéticas não tenham a mesma necessidade que células do epitélio (como os fibroblastos) e ainda, que a sua deficiência leve a patologias como a formação de tumores no caso de células aderentes. (35-36)

De forma interessante, a maneira com que as septinas interagem no organismo também depende de suas modificações pós-traducionais como fosforilação, sumoilação, acetilação e ubiquitização. Trabalhando com septinas de fungos, Hernández-Rodriguez e Momany (37) mostram que embora não tenham sido encontrados resíduos específicos para a realização destas mudanças, as modificações melhor conservadas estão posicionadas na interface de interação com o nucleotídeo, modulando a estabilidade e formação dos heteropolímeros de septinas em fungos. Ademais, estas alterações foram mais frequentemente encontradas no N- e C-terminais, mas não mostraram qualquer conservação. Estes resultados levantaram a hipótese de que as alterações pós-traducionais tenham sido recentemente incorporadas às septinas evolutivamente, e ainda que mais estudos sejam necessários para que se possa dizer algo em relação a sua importância para as interações das septinas nos diferentes tecidos dos organismos superiores. (38) Adicionalmente, o número de septinas expressas em vertebrados é muito maior do que aqueles observados em organismos unicelulares, apresentando degeneração por grupo de septina e vários transcritos por grupo em organismos superiores. (13,18) Isto sugere que a duplicação gênica levou à ampliação no número de septinas expressas em organismos superiores, relacionando-se com um aumento no número de funções desempenhadas.

Em humanos, as septinas são expressas diferentemente nos tecidos, sendo que algumas septinas como SEPT5, SEPT7, SEPT10 e SEPT11 são expressas em todos os tecidos analisados até hoje (39-40) enquanto algumas são tecido-específicas como SEPT3 (neuronal) e SEPT14 (predominantemente testicular). (21,36,40) É também importante ressaltar que as septinas exercem papéis diferentes em cada tecido, formando estruturas específicas à cada célula como, por exemplo, o *annulus* em espermatozoides e formação do cílio primário em células do intestino. (41)

Figura 3 – Exemplos de estruturas formadas pelas septinas nos tecidos humanos. Formação de anéis contráteis no septo mitóticos de células em divisão; plataformas de ancoramento para receptores e transportadores na membrana plasmática além da estruturação na formação de vesículas durante a exocitose; formação do anulus em espermatozoides e o cílio primário em células intestinais ciliadas.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY; COSSART. (41)

Além das modificações pós-traducionais, a formação de filamentos de septina também é influenciada pela interação de septinas individuais com a membrana plasmática, que coordena a associação de novas septinas em forma de filamentos heteropoliméricos. (42) A associação de septinas a filamentos de actina e a geração de “reservas de septinas” no formato de discos pela associação com microtúbulos em células não-aderentes (18) são indícios de que a montagem dos filamentos de septinas depende não somente de sua composição bioquímica, mas também de suas associações dentro da célula.

Apesar de septinas estarem marcadamente presentes em processos biológicos cruciais para o desenvolvimento dos seres vivos que as expressam, elas também são capazes de influenciar os processos patológicos que possam se desenvolver nestes organismos, seja pela sua ausência ou superexpressão. (40) Exemplos desta função das septinas são a superexpressão de SEPT4 e SEPT9 ligada ao desenvolvimento de tumores, (43) o baixo nível de expressão de SEPT14 está ligado a infertilidade masculina (44) enquanto a expressão de uma isoforma de SEPT3 está intimamente ligada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer. (43,45-46)

Um interesse maior nas septinas veio também do fato de que, por trabalhar na divisão celular, elas podem estar relacionadas diretamente com a formação de tumores (47) sendo que, recentemente, a presença do DNA de SEPT9 hipermetilado no plasma sanguíneo está

relacionado ao desenvolvimento de câncer colo-retal (48-49) e posteriormente, validada como um biomarcador para este tipo de câncer (49-52). O ensaio realizado para detecção deste DNA aberrante no plasma sanguíneo consiste na extração do DNA circulante no sangue, conversão por bisulfito do DNA extraído seguido da purificação deste bis-DNA e aferição do grau de metilação do gene de SEPT9 por PCR em tempo real. (50) Atualmente, este procedimento representa uma esperança de diagnóstico não-invasivo para o câncer colo-retal. (53-54)

A variação na expressão dentre os diferentes tecidos, além da associação das septinas com diferentes estruturas celulares, mostram a relevância morfológica e fisiológica destas proteínas. A Figura 4 sumariza de forma breve a influência das septinas no desenvolvimento de diversas patologias humanas e seus tecidos correspondentes.

Figura 4 - Modelo esquemático das funções das septinas em diferentes sistemas orgânicos e suas conexões com doenças humanas. No esquema é mostrado o sistema juntamente com o processo em que as septinas são envolvidas. O código de cores indica o envolvimento intracelular das septinas que incluem as funções de organização de actina (rosa), microtúbulos (verde) e membrana celular (cinza); fusão vesicular (azul) e apoptose (amarelo). As doenças humanas que estão listadas são baseadas em evidências genéticas, histológicas, genômicas e proteômicas.

Fonte: Adaptada de DOLAT. (40)

1.2 Caracterização estrutural

As septinas são constituídas por três domínios estruturais bem conservados: um domínio G central flanqueado pelos domínios N-terminal e C-terminal.

O domínio N-terminal possui sequência de aminoácidos variável em tamanho e composição entre os grupos e suas próprias integrantes. Uma característica notável desta região é a presença de uma região polibásica (26-27) responsável pela interação com a membrana plasmática. Esta região está presente em todas as septinas com exceção do grupo II e está predita para a formação de uma α -hélice. Estima-se que a interação septina-membrana seja realizada com mais afinidade através do fosfolípídeo fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), que funciona como um segundo mensageiro na formação do citoesqueleto celular agindo na polimerização de filamentos de actina sobre a membrana plasmática. (43) Curiosamente, foi verificado que septinas ligadas a GTP não hidrolisável ($\text{GTP}\gamma\text{S}$) não conseguiam se ligar ao fosfolípídeo, contrariamente ao executado pelas septinas ligadas a GDP. Isso acontece porque a ligação a GTP produz uma modificação conformacional na estrutura da proteína que acaba ocluindo o motivo de interação com PIP_2 e, por conseguinte, produz um impedimento estereoquímico para esta interação. (26) É possível dizer que é por este motivo que, em um estudo com septinas de fungos, Andrew Bridges e colaboradores mostraram que as septinas formam pequenos filamentos no citosol e apenas vão se associar formando estruturas superiores após estarem ligadas à membrana. (55) A região polibásica do N-terminal das septinas está precedente ao *P-loop*, no domínio G.

O domínio G é altamente conservado em todas as septinas sendo composto por estruturas de α -hélices e folhas- β que se intercalam, ligadas por *loops* flexíveis; as folhas- β formam um núcleo que é então recoberto pelas hélices. Esta estrutura é responsável pela sua classificação entre as TRAFAC (do inglês, *after translation factor class*) de proteínas ligadoras de nucleotídeos com *P-loop*. (1) Este *P-loop* se refere uma estrutura em *loop* que reconhece e interage com o grupo fosfato de nucleotídeos e tem um motivo sequencial chamado Walker A. Um segundo *loop*, Walker B, faz a estabilização desta interação pela coordenação de um íon Mg^{2+} . (56) Nas septinas eucarióticas, a sequência Walker A (GxxxxGKST) é também conhecida como o motivo G1 e corresponde a um *loop* flexível encontrado entre a primeira fita e a primeira hélice do enovelamento canônico de pequenas GTPases. Uma treonina que coordena um íon Mg^{2+} é conservada em quase todas as septinas (mas ausente nas septinas do grupo II) e é responsável pela hidrólise do GTP em GDP. Esta treonina integra o motivo G2 (DxxT) que faz parte de uma região chamada *Switch I* por sofrer

uma mudança conformacional em função da hidrólise do nucleotídeo. O motivo G3 (Walker B – *loop* de sequência DxxG encontrado ao final da terceira folha- β) faz parte de uma segunda região de conformação variável conhecido como *Switch II*. Finalmente, o motivo G4 compreende uma folha- β seguido do motivo de especificidade para GTP, xKAD. (56) Estes motivos podem ser visualizados na Figura 5, onde estão mostrados os estados ligados a GTP utilizando a estrutura de alta resolução de SEPT3 (PDB:4Z51) ligada a GTP γ S.(57–60) Nota-se a importância da treonina presente na região de *Switch I* e da glicina da região de *Switch II*, pois elas realizam a interação direta com o γ -fosfato que será hidrolisado. Após a liberação do γ -fosfato, a glicina de *Switch II* deixa de interagir com qualquer parte da molécula de GDP.

Figura 5 - Os motivos importantes para a ligação de GTP. A molécula de GTP γ S é evidenciada em rosa e o íon Mg^{2+} é mostrado como uma esfera em verde-limão enquanto as moléculas de água interagentes são mostradas como pequenas esferas em turquesa. Os motivos de ligação (G1), estabilização (G3) e especificidade (G4) são mostrados em vermelho, laranja e azul, respectivamente. A treonina catalítica responsável pela região de *Switch I* (amarelo) é ilustrada como uma estrutura de bastões para melhor visualização das interações (pontilhados em preto) com o γ -fosfato do GTP e com o íon magnésio. PDB: 4Z51.

Fonte: Elaborada pela autora.

É interessante notar que, nos organismos superiores, septinas do grupo II não possuem a treonina conservada de *Switch I* e, por conseguinte, não executam a hidrólise do GTP, anulando a atividade enzimática deste grupo. Acredita-se que esta seja uma característica intrínseca dos organismos que possuem um alto número de septinas expressas e que esta seja

uma característica importante na função das septinas deste grupo para a composição celular. (61)

Nas septinas, a atividade GTPásica é muito lenta e a interação com o nucleotídeo produz uma modificação conformacional em relação aos seus motivos, como foi citado anteriormente. A interação da glicina de *Switch II* é apontada como a causa desta mudança, uma vez que a sua ligação ao γ -fosfato é realizada através do grupo amina da sua cadeia principal e, por possuir apenas um hidrogênio em seu radical, conferem uma alta flexibilidade para esta região. (61)

Posicionado entre o domínio GTPase e o C-terminal está uma região altamente conservada, denominado “Elemento Único de Septina” (SUE, *septin unique element*), que foi inicialmente encontrado por meio de alinhamento das sequências de septinas presentes em *S. cerevisiae*. (38) Esta região possui cerca de 50 resíduos e estudos de bioinformática envolvendo 162 sequências de septinas encontradas em organismos de diferentes reinos mostraram que apenas 6 resíduos eram conservados neste domínio. (13) Em termos estruturais o SUE faz parte do domínio G, sendo uma extensão na sua região C-terminal importante para a formação das interfaces que levam a polimerização. Por ser uma particularidade intrínseca das septinas, este domínio foi uma das principais características para a identificação das septinas de algas. (62)

Finalmente, o domínio C-terminal é caracterizado pela presença de regiões preditas para formação de *coiled-coils*, que são estruturas de α -hélices que possuem a capacidade de se associar com outra α -hélice devido a repetições de sete resíduos (*heptads*) em sua sequência, formando uma estrutura supersecundária onde duas hélices interagem enrolando-se uma na outra. A estrutura é estabilizada principalmente por meio de contatos hidrofóbicos entre as hélices feitos por aminoácidos ocupando as posições "a" e "d" das repetições de sete resíduos. Esta foi uma das principais características que influenciaram Makoto Kinoshita em sua classificação de grupos de septinas (18) uma vez que cada grupo possui um número diferente de *heptads* preditos levando a *coiled-coils* de tamanhos diferentes, sendo uma marca que septinas do grupo I não possuem esta região. Acredita-se, ainda, que estas associações em *coiled-coil* entre as septinas possam ser cruciais para a formação dos filamentos pela interação entre homo- e heterodímeros. (63)

Figura 6 - Diagrama de blocos esquematizando os principais domínios de cada septina. Em laranja, é mostrado o domínio N-terminal e sua região polibásica (PB), em azul vemos o domínio G altamente conservado (incluindo o elemento único de septinas, SUE) enquanto em verde é ilustrado o domínio C-terminal que possui o *coiled coil* (CC) de tamanhos variáveis de acordo com grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparativamente, vemos na Figura 6 um esquema mostrando os domínios e seus comprimentos relativos presentes em cada septina humana. Estes domínios, após o enovelamento dentro da célula deixam o domínio G exposto para a interação com nucleotídeos do citosol. É baseado neste enovelamento que se foram as interfaces de interação para a polimerização das septinas.

1.3 As interfaces de interação

Para a formação de um heterofilamento de septinas, o empacotamento destas proteínas é realizado formando duas interfaces de interação: a interface G e a interface NC. A interface G recebe este nome por envolver os sítios de ligação ao GTP de dois monômeros adjacentes enquanto a interface NC é formada pelas regiões N- e C-terminais do domínio G. Tais

interfaces começaram a ser mais bem compreendidas a partir da primeira estrutura cristalográfica obtida para um filamento de septina, no caso o filamento SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7, com resolução de 4.0 Å. (64) Neste trabalho, foi mostrado que um trímero formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Figura 7) dimeriza-se através da interface NC de SEPT2 para a formação de um hexâmero. Pela associação dos hexâmeros ponta a ponta forma-se o filamento.

A interação SEPT2-SEPT6 é realizada através da interface G enquanto a dimerização entre SEPT6-SEPT7 acontece pela interface NC, onde não foi observada uma densidade eletrônica correspondente aos seus *coiled-coils* devido à desordem cristalográfica. A flexibilidade desta interação foi verificada em imagens de microscopia eletrônica onde foi mostrado que, ao adicionar uma extensão formada por uma proteína ligadora de maltose (MBP) ao C-terminal de SEPT2, esta se localizava no meio do hexâmero e ainda exibiu uma flexibilidade de 25-30° em relação ao eixo principal do filamento, confirmando uma característica necessária para a formação superior em anéis e discos de septinas. (64)

Figura 7 - Estrutura cristalográfica de um filamento fisiológico de septinas humanas. Composto por duas cópias de SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarela); as interfaces interagentes G e NC são indicadas pelas setas em preto. Na interface G é visível uma molécula de GTP (bege) ligada a SEPT6 mas existe uma molécula de GDP (preto) ligada a SEPT2 e SEPT7. PDB: 2QAG.

Fonte: Elaborada pela autora.

A interação por meio da interface G foi a melhor estudada até o momento, por ser aquela que possui melhor estabilidade estrutural, sendo que das 15 estruturas de septinas humanas disponíveis no repositório do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (PDB) (65) apenas duas delas compreendem toda a extensão das cadeias polipeptídicas (SEPT2 PDB: 3FTQ, complexo SEPT2/6/7 PDB: 2QAG), e também apenas 5 delas (SEPT3, SEPT7 e SEPT9 de humanos e SEPT10 de *Schistosoma mansoni*) possuem alta resolução, sendo todas essas apenas os domínios GTPase de sua septina. (65)

A associação a GTP/GDP é necessária para a formação do complexo e um fator importante para a estabilidade dos dímeros formados através da interface G. (61) Recentes estudos que mostraram que a baixa taxa de hidrólise de GTP para GDP em SEPT7 é causada pela homodimerização, (66-67) pois induz um impedimento estérico para a dissociação das moléculas de guanosina e recarregamento do sítio catalítico. Por outro lado, observando os dímeros de SEPT2 ligados a GTP γ S, verifica-se uma superfície de contato mais profunda do que aquela observada em dímeros de SEPT2 associadas a GDP e, portanto, os primeiros possuem uma ligação mais próxima. Isto acontece porque o γ -fosfato do GTP, ao realizar uma ligação com a cadeia principal da treonina em *Switch II*, exerce uma grande modificação estrutural não observada nos dímeros contendo apenas GDP. Este padrão foi observado na estrutura do domínio GTPase de SEPT2 de Sirajuddin, (58) mas também é confirmado nas novas estruturas do mesmo domínio das SEPT3 e SEPT9. Também foi proposta que a hidrólise do GTP interfere diretamente na interface NC por meio do deslizamento de uma das fitas- β centrais. (68) Em concordância com as observações acima, Kim e colaboradores (69) levantaram a hipótese de que a interface G estabelece ligações mais fortes do que a interface NC em estudos de coexpressão de SEPT2 mutada em células HeLa. Neste estudo foi mostrado que deleções de apenas 18 aminoácidos no N-terminal e 15 aminoácidos no C-terminal foram capazes de impedir a formação de filamentos de septinas. Além disso, a mutação dos resíduos W260 e H270, presentes na interface G de SEPT2, fizeram com que a mesma se apresentasse como monômeros espalhados pelo citosol. Estes resultados sugerem que a formação do filamento de septina inicia-se através da dimerização dos monômeros pela interface G, seguido da polimerização pela interface NC.

A interface NC como vista na estrutura do complexo da SEPT2-SEPT6-SEPT7 é formada por hélices- α provenientes do C-terminal e do N-terminal do domínio G. Por outro lado, o interessante desta interface é que provavelmente envolve também a participação dos *coiled-coils*, em que a α -hélice do C-terminal de uma septina se enovela ao redor da hélice proveniente do C-terminal da septina parceira. Na estrutura do complexo obtida por Sirajuddin, (64) não houve uma densidade eletrônica correspondente aos *coiled-coils* e, portanto, ainda existem dúvidas quanto à maneira exata de associação para a formação da mesma. No entanto, acredita-se que estes *coiled-coils* sejam responsáveis, pelo menos em parte, pela estabilização da interface NC. (70) Ainda, estudos recentes utilizando C-terminais de SEPT7 em combinação com aqueles provenientes das septinas do grupo II realizados por Sala e colaboradores (71) mostraram que estes realizam uma interação preferencialmente heterotípica, o que indica que as septinas do grupo II possuem maior afinidade para interação

com SEPT7 – e consequente formação de heterodímeros – do que para a interação consigo mesmo. Esta seletividade pode ser um dos fatores importantes que garantem a montagem correta do heterofilamento.

1.4 A montagem dos filamentos de septina

1.4.1 A montagem canônica

Os detalhes da formação canônica dos filamentos de septinas humanas foram inicialmente descritos a partir da estrutura cristalográfica do hetero-complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7. (64) A estrutura revelou a ordem dos três monômeros dentro do trímero e também como dois trímeros se juntam para formar um hexâmero que subsequentemente polimeriza. Tomando-se em conta a divisão em grupos das septinas, as observações de Kinoshita (18) sugerem que filamentos canônicos podem ser formados trocando qualquer septina do filamento por outra do mesmo grupo, na mesma posição. Posteriormente foi descoberto que as septinas do grupo I (por exemplo SEPT9) podem ocupar uma posição terminal transformando o trímero SEPT2-SEPT6-SEPT7 em um tetrâmero SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, proposta verificada em experimentos de duplo-híbrido (72) e expressão em células HeLa (73) (Figura 8).

Figura 8 - Formação canônica dos filamentos de septinas nos modelos de trímero e tetrâmero. Círculos rosa indicam uma molécula de GDP enquanto os círculos brancos indicam uma molécula de GTP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos mostraram a validade desta regra através de coprecipitação (74–76) e ensaios de duplo-híbrido em leveduras (20,72) além da demonstração destas regras em avaliação de padrões de expressão em diferentes linhagens de células humanas. (77) Como mencionado acima, o primeiro filamento canônico de septinas humanas caracterizado estruturalmente mostrou que dois trímeros formam um hexâmero de septinas na sequência SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2. No cristal, estes hexâmetros se associaram formando

filamentos e as interfaces de associação foram G para SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT7 enquanto foram identificadas interface NC para SEPT2-SEPT2 e SEPT6-SEPT7. Uma interface G adicional se formaria entre duas cópias de SEPT7 ao polimerizar.

Em estudos com *Saccharomyces cerevisiae*, Bertin e colaboradores conseguiram isolar o complexo nativo CDC11-CDC12-CDC3-CDC10-CDC10-CDC3-CDC12-CDC11 e visualizá-lo por meio de microscopia eletrônica de partícula única, onde as posições de cada uma destas septinas foram definidas usando extensões proteicas acopladas a septinas e estudos mutagênicos. (78) Neste caso, as interfaces G foram entre CDC10-CDC3 e CDC12-CDC11, e interfaces NC foram vistas para CDC10-CDC10, CDC3-CDC12 e CDC11-CDC11.

Baseando-se na presença de *coiled-coils* para a formação de uma interface NC, podemos estabelecer uma relação entre o filamento de leveduras e o filamento de septinas humanas (considerando-se o modelo de tetrâmeros), verificamos que o filamento isolado está deslocado de uma unidade tetramérica em relação ao filamento humano canônico. Tal observação é ilustrada na Figura 9, onde a mudança de cores foi feita para evitar um erro de interpretação com os grupos de septinas.

Figura 9 - Comparação entre os filamentos de septinas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Homo sapiens*. Hastes acima de cada proteína representam o domínio C-terminal realizando uma estrutura em *coiled-coil* com a proteína vizinha, sendo assim uma interface NC. A continuação de cada um dos filamentos é mostrado em cinza e evidência, baseado na sequência de *coiled-coils* esperada para um filamento de septinas, o deslocamento de 1 tetrâmero entre os filamentos descritos na literatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Acredita-se que o número de septinas expressas no organismo interfira diretamente nesta montagem. É notável que organismos unicelulares possuam um número de septinas expressas significativamente menor do que aquele visto para vertebrados, (13,62,79) levando

à interpretação de que as septinas tiveram seu DNA duplicado evolutivamente, causando uma redundância e possível degeneração na formação dos filamentos nos diferentes tecidos do mesmo organismo o que resulta, para humanos, em 20 diferentes combinações para trímeros e 60 diferentes configurações para tetrâmeros canônicos. Entretanto, alguns estudos isolaram septinas em uma formação não predita anteriormente, o que levanta a hipótese de que as regras de formação de um filamento de septina não se restrinjam apenas àquelas propostas por Kinoshita. (18)

Em adição a isso, a maioria das estruturas cristalinas de septinas obtidas até hoje mostraram que as mesmas realizam interações promíscuas na formação do cristal. Uma interação promíscua é definida como um contato do tipo G ou NC encontrada na estrutura cristalográfica mas que não se espera encontrar em filamentos fisiológicos conforme as regras de Kinoshita. Tal efeito foi verificado na cristalização dos domínios GTPase de SEPT2, (58) SEPT7, (60,80) SEPT3 (81) e SEPT9. (82) Existem indícios de que as interações promíscuas na interface NC, por exemplo, aconteçam por meio de forças iônicas entre três resíduos altamente conservados entre todas as septinas: Arg131 de uma subunidade com Glu126 e Glu288 da outra subunidade, tomando SEPT7 como exemplo.(60) Mesmo assim, em estruturas do domínio G de várias septinas individuais, são observadas também interfaces fisiológicas, como a interface NC na estrutura da SEPT2 por exemplo.

1.4.2 A montagem não canônica

Estudos de triplo-híbrido (72) e duplo-híbrido (20,72) mostraram que as septinas humanas podem interagir de maneiras diferentes daquelas descritas inicialmente, e levantaram questões acerca da possibilidade da real existência de interações não canônicas para a formação de filamentos. No experimento de duplo-híbrido realizado por Nakahira e Macedo, (72) além dos resultados de dimerização canônica esperado, algumas septinas também exibiram um padrão de interação atípico, como é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Interações entre septinas humanas observadas por Nakahira e Macedo em experimentos de duplo-híbrido em leveduras. Algarismos romanos denotam o grupo ao qual as septinas pertencem e os valores indicam o número de colônias observadas onde aqueles em negrito indicam as interações não canônicas observadas.

	Presa Isca	III				II				I		IV
		SEPT1	SEPT2	SEPT4	SEPT5	SEPT6	SEPT8	SEPT10	SEPT11	SEPT3	SEPT9	SEPT7
III	SEPT1	3	2	1	1	14	-	-	3	-	15	-
	SEPT2	-	-	1	-	5	-	-	-	-	-	-
	SEPT4	-	-	-	-	2	1	3	7	-	-	-
	SEPT5	-	1	-	1	8	6	-	3	-	-	-
II	SEPT6	8	5	5	12	-	-	-	-	<u>1</u>	<u>96</u>	9
	SEPT8	3	6	9	5	-	-	-	-	-	<u>49</u>	22
	SEPT10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SEPT11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	SEPT3	-	-	-	-	6	-	-	5	-	-	-
	SEP9	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	3
IV	SEPT7	1	-	3	-	11	-	1	1	-	34	-

Fonte: Adaptada de NAKAHIRA; MACEDO. (72)

Os dados de duplo-híbrido mostraram que existe uma possibilidade de que septinas do grupo I (SEPT3 e SEPT9) interajam com septinas do grupo II. Interessantemente, a combinação SEPT3-SEPT6 se mostra recíproca e ainda, SEPT6-SEPT9 mostram 96 clones pescados, tendo uma maior probabilidade de que a interação seja real *in vivo*. Os autores racionalizaram que a interação deveria ocorrer pelo domínio G, uma vez que os clones contendo apenas o N-terminal de SEPT9 não foi capaz de ligar a nenhuma septina. Este resultado contraria os encontrados por Nagata e colaboradores (70) que identificaram SEPT7-SEPT9b-SEPT11 formando filamentos juntamente com fibras de actina em células REF52 mas, quando expressava-se SEPT9 sem seu N-terminal, a interação entre as septinas desaparecia. O argumento utilizado por Nakahira para as interações não canônicas observadas para SEPT9 apoiam-se sobre a ausência de uma região de *coiled coil* para esta septina, fator essencial para a estabilização da interface NC. Portanto, a interface G é aquela que se mostra mais provável neste caso.

A interação entre o dímero SEPT11 (grupo II) e SEPT12 (grupo I) deixa de existir após uma mutação sítio-dirigida no domínio G de SEPT12 (G56A, localizada no motivo G1), quando a mesma perde a capacidade de ligar GTP e ainda não se liga mais a SEPT11 – embora continue realizando dimerização entre si mesma – indicando fortemente que a

interação pode ser realizada por esta interface.(83) Atentamos ao fato de que o motivo G1 ainda não está na região de *Switch* e a mutação aqui observada não alteraria a interface NC, à priori.

Figura 10 - Compêndio de interações não canônicas encontradas. A) Interação entre SEPT7-SEPT9-SEPT11 encontrada em células REF52; B) Dimerização de SEPT12-SEPT11 encontrada em células HeLa; C) Interação entre SEPT14-SEPT9 em células CHO.

Fonte: Adaptada de NAGATA (70); DING (84); PETERSON. (44)

1.5 SEPT3 como um representante do grupo I

Estudos recentes mostraram que todos os membros do grupo I exercem o mesmo papel terminal na formação dos filamentos quando em presença de SEPT7 em células K562 e Jurkat. (36) A SEPT3 é a menor de todas as septinas humanas, encontra-se especificamente em tecido neuronal (85-86) e ainda foi identificada como uma septina superexpressa em tumores cerebrais (43) e no advento do Mal de Alzheimer. (87) Uma caracterização mais abrangente das propriedades bioquímicas da mesma mostrou sua homodimerização em presença de GTP γ S. (81)

Esta septina minimalista constitui-se basicamente do domínio G, sendo ausente o *coiled coil* no C-terminal. Ela foi largamente estudada e está bem caracterizada biofisicamente e estruturalmente de forma que já sabemos que em solução ela pode ser isolada na forma monomérica e livre de nucleotídeos e apresenta atividade GTPásica. (81) A transição do estado monomérico para o dimérico é dependente da força iônica e da presença de nucleotídeo trifosfato, porém a dimerização foi eliminada com a mutação S179D, no centro da interface G, indicando que em solução a interface de dimerização é a interface G, como observado para SEPT2. (64) Além disso, foi demonstrado que a substituição da T282 por uma

tirosina, presente na mesma posição nas septinas dos outros grupos, foi suficiente para SEPT3 ser purificada como dímero, confirmando mais uma vez que a interface de interação de SEPT3 em solução é a interface G e que a mutação deste aminoácido é responsável pela condição monomérica de septinas do grupo I em solução. (81) Três estruturas do domínio G desta septina estão atualmente disponíveis no banco de dados PDB, sendo a primeira delas é a 3SOP, que foi resolvida a 2,8 Å em 2013 e mostra a dimerização acoplada a GDP, mas ainda não tinha sido possível resolver regiões importantes do mecanismo de *Switch* desta proteína. Recentemente, duas novas estruturas foram adicionadas ao repositório, com resolução de 1,8 Å e mostram mais detalhes de como esta septina se associa ao nucleotídeo: 4Z51 possui uma molécula de GTPγS enquanto 4Z54 está acoplada a GDP.

Pela sua alta conservação do domínio G e ainda por dispor de avançada caracterização bioquímico-estrutural, o presente trabalho propõe adotar este representante do grupo I como modelo para a verificação da hipótese de que a interação não canônica entre septinas do grupo I e grupo II possa acontecer através da sua interface G (Figura 11).

Figura 11 - Proposta formação não canônica de filamentos de septinas. A seta preta indica a substituição das septinas do grupo III no filamento canônico por uma septina do grupo I no filamento não canônico.

Fonte: Elaborada pela autora.

A similaridade de sequência entre SEPT3 e os outros membros do seu grupo, principalmente no domínio G, viabilizam a sua representação para todos os membros no estudo de interações não-canônicas em sua interface G.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Neste estudo visamos verificar a hipótese de existência da interação não-canônica e verificação da interface necessária para que ocorra a associação entre septinas humanas do grupo I e do grupo II, utilizando a SEPT3 como o membro do grupo I e todas as septinas do grupo II.

2.2 Objetivos específicos

Para realizar esta pesquisa, os objetivos específicos foram divididos em duas partes:

1. Descoberta da interação não canônica:

- Amplificação das fases de leitura aberta (ORF) para os genes de septina;
- Coexpressão dos complexos SEPT3-SEPT6, SEPT3-SEPT8, SEPT3-SEPT10, SEPT3-SEPT11 e SEPT3-SEPT14 em sistema bicistrônico pETDuet-1;
- Verificação da interação não canônica pela copurificação em resina de afinidade ao cobalto e purificação por exclusão por tamanho molecular (SEC);
- Determinação do estado oligomérico por espalhamento de luz a múltiplos ângulos acoplado a cromatografia de exclusão molecular (HPLC) (SEC-MALS).

2. Verificação da interface de interação, realizado com o complexo SEPT3-SEPT8:

- Interface G: análise do conteúdo de GTP/GDP acoplados às septinas purificadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acopladas a colunas de troca iônica DEAE.
- Interface NC: purificação do complexo em diferentes concentrações de NaCl no tampão de amostra.
- Formação do complexo e determinação da constante de dissociação (K_D), para SEPT3-SEPT8 nativas e SEPT3-SEPT8G por Ultracentrifugação Analítica (AUC) e Termoforese em Microescala (MST).

MATERIAIS E MÉTODOS

“Observe profundamente a natureza, e então você compreenderá tudo melhor.”

(Albert Einstein)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Validação da interação não canônica

3.1.1 Clonagem dos genes de septina em vetor bicistrônico

As fases abertas de leitura (ORFs) para as sequências das septinas *SEPT3* (NM_019106.4), *SEPT6* (NM_145799.3), *SEPT8* (NM_015146.1), *SEPT10* (NM_144710.3) e *SEPT14* (NM_207366.2) nativas, e o gene *SEPT11* (NM_018243.3 – aminoácidos de 66 a 429, onde o N-terminal foi excluído por problemas de solubilidade da proteína nativa) de *homo sapiens* foram obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA disponível em nosso laboratório. Para a amplificação das ORFs destes genes, inicialmente foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos genes com base na sua sequência genética e na sequência do vetor pETDuet-1. A adequação da temperatura de hibridização foi determinada pelo programa *online* OligoAnalyser 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa brasileira Exxtend pelo método de RF-OPC (Coluna de Purificação de Oligonucleotídeos por Fase Reversa) e a Tabela 2 mostra suas sequências.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das janelas abertas de leitura para as septinas *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT10*, *SEPT11* e *SEPT14*.

Gene	Direção de Leitura	Sequência de nucleotídeos	Temperatura de hibridização (°C)
<i>SEPT6</i>	Sense	3'-CAATTGGATGGGCAGCGACCGATATA-5'	59,6
	Anti-sense	3'-CTCGAGTTAATTTTCTTCTCTTGTCTCTCT-5'	58,4
<i>SEPT8</i>	Sense	3'-CAATTGGATGGCGGCCACCGAC-5'	63,3
	Anti-sense	3'-CGCCTCGAGTTAGTTAGTTCTTCTTGTCTTGTGTC-5'	63,7
<i>SEPT10</i>	Sense	3'-AGATCTGATGGCCTCCTCCGAG-5'	61,4
	Anti-sense	3'-CGCCTCGAGTTACAAAAAATTGGA-5'	56,2
<i>SEPT11</i>	Sense	3'-CAATTGCGGATTTGACAGCCTCCCTGAC-5'	64,0
	Anti-sense	3'-CGCCTCGAGTTATGTGAAGCTTGCATTTTT-5'	61,0
<i>SEPT14</i>	Sense	3'-CAATTGGATGGCAGAAAGAACAATGGCT-5'	59,6
	Anti-sense	3'-CGCCTCGAGTTATTTCTTACGATGTTTGTGTC-5'	61,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Usando o kit High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific), os genes foram amplificados seguindo o protocolo indicado pela empresa fabricante, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das reações para amplificação dos genes de septinas por reação em cadeia de polimerase.

Componente	Concentração Final	Volume (µL)
10x HF PCR Buffer+15mM MgCl ₂	1x	5,0
10 mM dNTP Mix	0,2 mM	1,0
10 µM Oligonucleotídeo Sense	1,0 µM	1,0
10 µM Oligonucleotídeo Anti-Sense	1,0 µM	1,0
Plasmídeo molde	10 ng	1,0
HF PCR Enzyme Mix	2,5 U	1,0
Água deionizada	q.s.p. 50 µL	41,5
Volume Final		50,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), foram realizados os ciclos da PCR como indicado na Tabela 4.

Tabela 4 - Programa de ciclos termais para a amplificação dos genes de septina por reação em cadeia de polimerase

94 °C	30"
94 °C	30"	
55 °C	30"	
72 °C	1'30"	
72 °C	10'	

Fonte: Elaborada pela autora.

Após os ciclos, alíquotas de 10 µL da reação foram inseridas em gel de agarose 1% contendo 1x Sybr Safe (Invitrogen) para eletroforese a 80 V e visualizadas usando o fotodocumentador Bio-Rad com luz UV. As bandas correspondentes aos genes amplificados (insertos) foram extraídos do gel com auxílio de uma lâmina estéril para então ter o cDNA purificado utilizando o kit de extração de DNA de gel de agarose “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). Um clone de pET28a-SEPT3 foi cedido pela Dra. Joci Neuby Alves, em que *SEPT3* estava flanqueado entre os sítios de restrição BamHI e SalI, os quais foram utilizados na digestão deste plasmídeo utilizando o mesmo protocolo que foi utilizado para os outros clones.

Os insertos purificados foram inseridos no plasmídeo de propagação pGEM-T-Easy (Promega), que possui o operon LacZ, utilizando a razão vetor:inserto 1:3 e incubando a ligação a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, a ligação foi transformada em células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes seguindo o protocolo de Mandel, (88) que foram plaqueadas em meio Lennox-Broth (89) contendo ampicilina a 100 µg/ml, IPTG a 0,5 mM e X-Gal a 80

$\mu\text{g/ml}$; estas placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h e os clones corretos foram verificados por coloração da colônia (azul para negativo e branco para positivo). Cada colônia branca foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo a mesma concentração de ampicilina utilizada na placa e os tubos foram mantidos em agitador horizontal a 80 rpm e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h. Uma extração do cDNA total de cada cultura foi realizada usando o kit “Pure Yield Plasmid Miniprep” (Promega) e a confirmação do tamanho do inserto foi feita através de uma digestão de 200 ng deste DNA com 10 U de enzima EcoRI (Thermo Scientific), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h seguido de eletroforese em gel de agarose 0,7%.

Tabela 5 – Composição do meio Lennox Broth para um volume final de 1 L.

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	5 g
pH	7,0

Fonte: Adaptada de LENNOX. (89)

Confirmamos as sequências por sequenciamento de nucleotídeos realizado pelo técnico Dr. Rafael Spadaccia Panhota (Grupo de Biofísica Sérgio Mascarenhas) utilizando o sequenciador de nucleotídeos 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Para os clones corretos, realizamos uma digestão com as enzimas de restrição MunI e XhoI (Thermo Scientific) (no caso de SEPT10 usamos BglI e XhoI (Thermo Scientific)), durante 16 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esta digestão, os insertos foram subclonados em vetor de expressão bicistrônico pETDuet-1 (Novagen), sendo que *SEPT3* foi inserida no sítio de múltipla clonagem 1 (MCS1) que possui uma fusão de extensão de seis histidinas em seu N-terminal. Complexos de SEPT3 e as outras septinas foram obtidos colocando o segundo gene no sítio de múltipla clonagem 2 (MCS2), o qual possui um códon de parada no final da sua sequência por inserção nos oligonucleotídeos de amplificação, formando uma construção com as características mostradas na Figura 12. No total, foram cinco construções diferentes de pETDuet-1 com as septinas em questão.

Figura 12 - Montagem do vetor de expressão bacteriano pETDuet-1. *SEPT3* é inserido no MCS1, que contém uma extensão de seis histidinas em seu N-terminal enquanto as septinas do grupo II foram inseridas no MCS2, sem esta extensão. Foram, portanto, confeccionados cinco clones diferentes de pETDuet-1 com as septinas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como uma validação para a interação SEPT3-SEPT8, subclonamos *SEPT8* no MCS2 de um vetor pETDuet-1 sem a *SEPT3* em MCS1. A partir daqui, este clone será denominado SEPT8-MCS2.

Estoques do DNA dos clones foram armazenados a -80 °C (estoque definitivo) e -20 °C (estoque de uso contínuo).

3.1.2 Construção de vetor bicistrônico para expressão de apenas uma ORF de septina

Para obter SEPT3 e SEPT8 sendo expressas sozinhas, foi utilizado para SEPT3 o vetor pETDuet-SEPT3 inicial, sem nenhum gene inserido no MCS2 enquanto para SEPT8 usamos um clone de SEPT8-SEPT5F163T em vetor de expressão pRSFDuet, fornecido pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos. Isolamos *SEPT8* digerindo o clone com as enzimas de restrição EcoRI e SalI (Thermo Scientific) em incubação a 37 °C durante 16 h e então inserimos este inserto no MCS1 de um vetor pRSFDuet vazio. Todas as clonagens

foram confirmadas por sequenciamento de nucleotídeos, realizado pelo técnico Dr. Rafael Spadaccia Panhota, no Laboratório de Biofísica Sérgio Mascarenhas.

As amostras de proteína contendo apenas o domínio G de SEPT8, aqui chamado SEPT8G, foi clonado, expressado e purificado pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos, que gentilmente cedeu algumas alíquotas para ensaios de interação com SEPT3.

Para melhor compreensão dos resultados aqui apresentados, a Tabela 6 lista os experimentos realizados com cada complexo de septina aqui proposto.

Tabela 6 - Técnicas aplicadas a cada complexo de septinas estudado. Cada complexo é assinalado na técnica a qual foi analisado, sendo a amplificação do cDNA correspondente mostrado como PCR do complexo, a Clonagem corresponde àquelas realizadas em pGEM-T Easy e subclonagem em pEDuet-1. Além disso, o Estágio 1 da purificação corresponde à eluição da resina de afinidade ao cobalto enquanto o Estágio 2 corresponde à eluição da coluna Superdex 200 10/300 acoplada ao sistema AKTA. A determinação da massa molecular através de Espalhamento de Luz a Múltiplos Ângulos acoplado à Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC-MALS) foi realizado apenas com os complexos SEPT3-SEPT11 e SEPT3-SEPT8, sendo a última também estudada por Ultracentrifugação Analítica (AUC) e Termoforese em Microescala (MST).

Complexo	PCR	Clonagem	Expressão	Purificação (Estágio 1)	Purificação (Estágio 2)	SEC-MALS	AUC	MST
SEPT3-SEPT6	X	X	X	X				
SEPT3-SEPT8	X	X	X	X	X	X	X	X
SEPT3-SEPT10	X	X	X	X	X			
SEPT3-SEPT11	X	X	X	X	X	X		
SEPT3-SEPT14	X	X	X					

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.3 Teste de expressão

A expressão das proteínas foi realizada em *E. coli* Rosetta-2 (DE3), iniciando sempre com uma transformação do DNA do clone estocado a -20 °C em células quimiocompetentes. Após o crescimento das colônias contendo o vetor em placas de meio LB contendo ágar a 1,5% de ágar suplementadas com 50 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol, uma delas foi selecionada e inoculada em 10 mL de meio LB contendo antibióticos com as mesmas concentrações acima citadas e incubadas em agitador horizontal a 80 rpm por 16 h a 37 °C. Em seguida, este volume de cultura foi usado para inocular 1 L do mesmo meio de cultura. A Tabela 7 mostra as condições de expressão analisadas.

Tabela 7 - Condições observadas nos testes de expressão dos complexos de septinas

Condição	Temperatura (°C)	Concentração de IPTG (mM)
1	20	0,2
2	20	0,5
3	37	0,2
4	37	0,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de atingida DO_{600} de 0,6 AU foram adicionadas diferentes quantidades de IPTG (0,2 mM e 0,5 mM na concentração final) e separados para as condições 37 °C e 20 °C. A partir do instante inicial 0 (não induzida) e cada 2 h, uma nova alíquota foi retirada do agitador para análise por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (90-91) 10% utilizando o sistema Mini Protean (Bio-Rad) a 120 V durante 1h40.

Devido a problemas de solubilidade, os complexos SEPT3-SEPT10 e SEPT3-SEPT14 também foram testados em meio Auto-indutor (AI). (92) Neste caso, não há indução com IPTG, apenas mudamos a temperatura do agitador para 20 °C quando a DO_{600} indica 0,6 AU. Da mesma maneira que no teste anterior, alíquotas foram retiradas a cada 2 h de expressão, a partir do momento da mudança de temperaturas, para análise em SDS-PAGE 10% nas mesmas condições.

Tabela 8 - Composição do meio Auto-indutor (AI) para um volume final de 1 L.

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Sulfato de amônia	2,8 g
Fosfato de potássio monobásico	6,8 g
Fosfato de potássio dibásico	7,1 g
Glicerol	5,0 g
Glicose	0,5 g
α-lactose	2,9 g
pH	7,5

Fonte: Adaptada de STUDIER. (92)

Em nenhum momento da expressão foram adicionados nucleotídeos GDP ou GTP ao meio de cultura para evitar a indução de uma interação (levando a um resultado falso-positivo), uma vez que já sabemos pela purificação do dímero canônico SEPT5-SEPT8 (93) que interações verdadeiras não exigem suplementação de nucleotídeos.

3.1.4 Expressão das septinas para análises biofísicas

Baseado na condição mais conveniente observada no teste de expressão, estabelecemos o protocolo para o qual as expressões seriam realizadas. Para a expressão do complexos SEPT3-SEPT6, SEPT3-SEPT11 e SEPT3-SEPT8 e das septinas SEPT3, SEPT8G, SEPT8-MCS2 foi utilizado meio LB com pré-inóculo de 1% de seu volume total que foi mantida sob agitação em agitador horizontal (New Brunswick Scientific) a 37 °C até atingir DO₆₀₀ de 0,6 AU quando adicionamos IPTG para uma concentração final de 0,5 mM e então a temperatura do agitador foi alterada para 20 °C. O tempo de expressão foi de 16 h. Apenas o volume de expressão mudou entre os clones: 2 L por clone de septinas individuais e 4 L para os complexos.

3.1.5 Purificação dos complexos de septina e das septinas isoladas

3.1.5.1 Estágio 1: Purificação por afinidade ao cobalto

Para esta etapa, 2 L de cultura bacteriana foi centrifugada a 4.000 rpm durante 45 min a 4 °C e ressuspendida em 40 mL de tampão COB (Tabela 9) (81,94) e adicionada de 50µg/mL de lisozima, 0,2µM PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonila), sendo mantido em gelo durante 30 min. Em seguida, as células foram lisadas em 10 ciclos de sonicação por 30 s com intervalos de 59 s. Uma centrifugação por 45 min a 13.000 rpm e temperatura de 4 °C foi usada para separar as frações solúvel e insolúvel formadas pelas células lisadas.

A fração solúvel foi adicionada a uma coluna de bancada contendo 2 mL de resina de cobalto TALON Superflow (Clontech) previamente lavada com água e tampão COB e mantido em agitador orbital a 4 °C por 20 min. A coluna foi então acoplada a uma haste de sustentação para que a fração de proteínas não ligadas à resina pudesse fluir. Realizaram-se duas etapas de lavagem usando tampão COB com 10× o volume da coluna: a primeira contendo 0,01% de triton-X100 e a segunda contendo 5 mM de imidazol. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi realizada em dois passos iguais, usando 5 mL de tampão COB adicionado de 500 mM de imidazol. Todo o processo de purificação em resina de cobalto foi realizado em câmara fria a 4 °C. A verificação de todos os passos é feito por SDS-PAGE 10%.

3.1.5.2 Estágio 2: Purificação por exclusão de tamanho molecular

Após purificação na coluna de afinidade, as frações de eluição foram unidas e concentradas em filtro Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Merck Millipore) com poros de 30 kDa por centrifugação a 4 °C em velocidade 3.000 rpm até que o volume fosse diminuído até cerca de 2 mL. Para eliminar possíveis frações insolúveis formadas durante a centrifugação, a amostra foi então centrifugada a 17.000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo previamente esfriado em gelo. Para a cromatografia de exclusão molecular, injetou-se 1 mL da amostra no sistema AKTA Purifier (GE Healthcare) acoplado com uma coluna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão FINAL (Tabela 9) em temperatura ambiente. A fim de confirmar o estado oligomérico das proteínas e ainda excluir contaminantes de alto peso molecular, realizamos uma nova cromatografia utilizando exatamente o mesmo tampão e coluna (processo também chamado de recromatografia) utilizando apenas as frações de eluição que não correspondiam a um agregado (verificado pelo volume morto).

Tabela 9 - Composição dos tampões utilizados durante a purificação das septinas.

COB		FINAL	
Componente	Concentração	Componente	Concentração
Tris	25 mM	HEPES	20 mM
NaCl	500 mM	NaCl	500 mM
MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂	5 mM
L-Arg	50 mM	L-Arg	50 mM
L-Glu	50 mM	L-Glu	50 mM
Glicerol	5%	Glicerol	5%
β -mercaptoetanol	10 mM	B-mercaptoetanol	10 mM

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.6.1 Calibração da coluna de purificação Superdex 200 10/300 GL

Para verificar o valor estimado de massa molecular para cada pico de eluição da coluna Superdex 200 10/300 GL, uma curva de calibração foi realizada utilizando padrões de massa molecular diluídos em tampão FINAL, a uma concentração final de 1,0 mg/ml. As corridas de cada padrão foram realizadas seguindo o mesmo método isocrático estabelecido

para as amostras de septinas, porém sem a coleta da eluição em frações. Os valores de massa molecular de cada padrão analisado são listados na Tabela 10.

Tabela 10 - Padrões de massa molecular utilizados para a curva de calibração da Superdex 200 10/300.

Proteína Padrão	Massa Molecular (kDa)
Blue Dextran	2000
Anidrase Carbônica	29
Ovalbumina	43
Albumina	66
Conalbumina	75
Álcool Desidrogenase	150

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cálculos para a curva de calibração seguiram o manual Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare). (95) O volume morto da coluna (V_0) é estimado através do volume de eluição do Blue Dextran e o volume geométrico da coluna (V_c), que no caso de uma coluna do tipo 10/300 é 24 mL. Assim, para cada curva analisada, um valor de K_{av} foi obtido utilizando o valor do volume de eluição (V_e) para cada padrão conforme a (1).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (1)$$

Foi realizado um ajuste linear de todos os seis valores de K_{av} *versus* o logaritmo da sua massa molecular ($\log MM$) usando o programa OriginPro 9 para a obtenção da função de ajuste para a estimativa da massa molecular de cada pico de eluição das amostras de septinas.

3.1.7 Análise do estado oligomérico através da Cromatografia de Exclusão de Tamanho acoplada ao Espalhamento de Luz a Múltiplos Ângulos (SEC-MALS)

A luz é uma onda transversal eletromagnética, portanto, os campos elétrico ($\vec{E}$) e magnético ($\vec{B}$) são mutuamente perpendiculares à direção de propagação da onda ($\vec{k}$) em todos os instantes de tempo.

Em um experimento de espalhamento de luz, uma fonte de luz colimada, de frequência única e polarizada (*laser*) é utilizada para iluminar uma amostra composta de uma solução de macromoléculas ou nanopartículas de interesse. Quando a luz passa pela solução, a maior

parte da luz continua na sua direção original, enquanto uma pequena parte dela é espalhada em novas direções. (96-97) Nesta região de espalhamento, o campo elétrico oscilante da luz interage com as moléculas em solução separando levemente suas cargas positivas e negativas, de acordo com a polarizabilidade da partícula espalhadora, (98-99) gerando um momento de dipolo.

Figura 13 - Formação de um momento de dipolo. Uma partícula, ao entrar em contato com o campo elétrico da luz, forma um dipolo induzido ao mesmo tempo em que espalha a luz incidente.

Fonte: Elaborado pela autora.

As interações com o campo magnético são muito mais fracas e, portanto, consideramos que a intensidade da luz espalhada é proporcional ao quadrado do módulo do campo elétrico espalhado (2), que será medido pela energia irradiada pela luz em uma determinada área.

$$I \propto |\vec{E}|^2 \quad (2)$$

As cargas separadas de cada molécula formarão um momento de dipolo e a intensidade de espalhamento de luz é dependente da magnitude de formação deste dipolo e, para que seja possível extrair maiores informações sobre o sistema, é necessário verificar como a polarizabilidade é diferenciada entre as partículas e o solvente. Para isso, é monitorada a diferença no índice de refração (Δn) com a variação da concentração de moléculas (Δc) no meio, gerando o índice de refração diferencial ($\partial n / \partial c$).

No limite em que o comprimento de onda da luz incidente é muito maior do que as dimensões físicas da partícula (conhecido como limite Rayleigh-Gans-Debye – RGD), Bruno Zimm estabeleceu em 1948, (100-101) uma fórmula simplificada para a obtenção da massa

molecular de polímeros de forma absoluta utilizando a (3, que descreve a relação entre o excesso de luz espalhada pela molécula em função do ângulo de espalhamento, $R(\theta)$.

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c \quad (3)$$

Através do formalismo de Zimm, é possível determinar de maneira direta a massa molecular da espécie em solução (M_w) e o segundo coeficiente virial (A_2). Os valores de índice de refração diferencial estão intimamente ligados com medida uma vez que o valor do coeficiente K^* é aferido por $\partial n / \partial c$ como é mostrado na (4,

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (4)$$

onde N_A corresponde ao número de Avogadro, n_0 corresponde ao índice de refração do solvente e λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente no vácuo. Ainda pela (3, a obtenção dos valores referentes ao raio de giro da molécula analisada é feita pela expansão de $P(\theta)$, que descreve a dependência angular da luz espalhada. Sua expansão em primeira ordem é dada por

$$P(\theta) \approx 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2 \frac{\theta}{2} + W \sin^4 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (5)$$

onde $\langle r_g \rangle$ é a média quadrática do raio de giro da molécula. Esta expansão vale para uma variação de ângulos e deixa de existir quando a leitura é realizada a 90° , em que $\sin \theta = 0$ e $P(\theta) = 1$. Tal raciocínio é válido para medidas realizadas em espalhamento dinâmico da luz (DLS).

Os valores retornados pelo sistema são baseados em “momentos de massa molar”. Para isso, o programa computa diferentes valores de massa média, baseando-se nos valores de massa molecular (M_i) obtido e o número de medições com aquele valor (n_i) em torno do pico selecionado pelo usuário. Neste trabalho, os momentos de massa molar estudados serão M_w , M_n e M_z que são funções da massa molecular média e refletem a massa molecular predominante (6), a menor massa molecular encontrada (7) e a maior massa molecular encontrada (8), respectivamente.

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} \quad (6)$$

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i / M_i} \quad (7)$$

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} = \frac{\sum c_i M_i^2}{\sum c_i M_i} \quad (8)$$

Os valores de momentos de massa molecular para uma amostra polidispersa deve obedecer a seguinte ordem: $M_n > M_w > M_z$.

Para os complexos SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11, utilizamos a técnica de cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos para determinar com maior acurácia o peso molecular dos complexos em questão. Nesta técnica, uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho molecular em cromatografia líquida de alta performance (HPLC-SEC) WTC-030N5 (Wyatt Technologies) faz uma separação mais fina (separação de 5 kDa até 1.250 kDa, poros de 300 Å) dos compostos presentes na amostra purificada de septinas, passando pelo módulo de separação Waters 600 Controller (mas sem a detecção pelo detector de UV no módulo Waters 2489) e é acoplada ao sistema miniDAWN TREOS (Wyatt Technologies), que possui uma leitura do espalhamento estático da luz a 3 diferentes ângulos - 43,6°, 90,0° e 136,4° - usando um laser de comprimento de onda 659 nm para aferição a cada 0,5 s de tempo corrido. A saída deste equipamento é então acoplada ao módulo OptiLab, que faz a medida do índice de refração diferencial (dRI). A Figura 14 mostra uma foto do aparato utilizado, ele é conectado a um computador que, através do software ASTRA 7 (Wyatt Technology) mostra a leitura de todos os detectores e realiza a determinação da massa molecular através da equação (3) que descreve como a medida da intensidade de luz ($I(\theta)$), feita pela voltagem recebida nos detectores, será então processada para a determinação direta da massa molécula (M). A quantia ($\partial n / \partial c$) refere-se à dRI enquanto c é a concentração da molécula, que é medida pela detecção do dRI. Ao ajustar a (3 para os dados de ângulo obtidos para cada pico do cromatograma é formado um gráfico de resultados, que é usado para verificar a qualidade do ajuste e determinação dos valores de massa molecular média e raio de giro, aqui chamado de Gráfico de Resultados, que constituiu-se em um *Debye plot* realizado pelo programa de análise ASTRA 7 usando o formalismo de Zimm (estimado para moléculas de até 100 nm de diâmetro).

Figura 14 - O sistema SEC-MALS. O sistema é ligado a um computador, onde é controlado pelo software ASTRA 7.

Fonte: Cedida pelo doutorando Evérton Edésio Silva.

O interessante desta técnica é que ela é um método absoluto para aferir a massa molecular sem a necessidade da realização de uma curva de calibração. A massa molecular é determinada a cada ponto de leitura do MALS e do detector de concentração, independentemente do formato da molécula ou do tempo de eluição da mesma. Isso acontece porque o espalhamento de luz produzido é uma função do ângulo, uma vez que proteínas são polímeros que se comportam como um sistema de partículas espalhando a luz de maneira diferente a cada um de seus centros.

O Programa ASTRA 7, realiza os cálculos físico-matemáticos referentes ao espalhamento da luz e retorna diferentes valores de massa e geometria da molécula, como é ilustrado na Figura 15.

Figura 15 - Dados de SEC-MALS pelo programa ASTRA 7, utilizando uma amostra de BSA como modelo experimental. Cromatogramas em vermelho indicam o espalhamento de luz a 90° (LS) enquanto os cromatogramas em azul indicam a detecção do índice de refração diferencial (dRI). A medida de massa molecular (MM) aferida para cada ponto é mostrada em vermelho. Para proteínas estáveis, como é a BSA, espera-se que M_w mostre-se constante durante toda a eluição do pico da proteína enquanto distribuições contínuas de massas, como os polímeros, mostram um padrão de MM como uma reta decrescente.

Fonte: Adaptada de WYATT ... (102)

Para realizar este experimento, as amostras recém-purificadas pela coluna Superdex 200 10/300 foram centrifugadas a 17.000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C e injetou-se 20 μ l do sobrenadante no *loop* do módulo do HPLC, com um tampão de 20 mM Tris pH 7,8 adicionado de 150 mM NaCl preparado e filtrado no dia anterior, quando foi colocado para equilibrar o sistema (cerca de 16 h com fluxo de 0,3 mg/ml para o equilíbrio) usando fluxo de 0,1 ml/min. Dados foram coletados a temperatura ambiente e examinados utilizando o programa ASTRA 7.

3.2 Verificação da interface de interação

3.2.1 Análise do conteúdo de nucleotídeos (GTP/GDP) ligado a SEPT3, SEPT8 e ao complexo SEPT3-SEPT8

Para o estudo do conteúdo de nucleotídeos ligados às septinas SEPT3, SEPT8 e ao complexo SEPT3-SEPT8 usamos a técnica descrita por Seckler e colaboradores,(103) com modificações, conhecida como “Precipitação por Ácido Perclórico”, que já é estabelecida pelo

nosso laboratório para esse tipo de análise. Esse método permite que as proteínas sejam desnaturadas mantendo a integridade dos nucleotídeos a elas ligados, permitindo a distinção entre nucleotídeos diferentes que, no caso analisado, serão o GTP e o GDP.

As proteínas foram concentradas para cerca de 20 μM e as amostras de GTP e GDP foram diluídas para 50 μM no mesmo tampão das septinas. Também fizemos o protocolo com uma amostra somente de tampão, para que fosse possível estabelecer relações de comparação com qualquer ruído visível nas curvas.

Para cada 500 μL de amostra a ser analisada, foram adicionados 250 μL de ácido perclórico 1,5 M seguido de incubação no gelo por 10 min. Centrifugamos as amostras a 16.000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C para remover as proteínas desnaturadas pelo ácido. Em seguida, transferimos 600 μL do sobrenadante para um novo microtubo ao qual foi adicionado 100 μL de K_2HPO_4 1 M, 100 μL de KOH 3 M e 80 μL de ácido acético 5 M com o objetivo de neutralizar a reação e precipitar o KClO_4 formado anteriormente. Estas amostras foram congeladas e mantidas a -20 °C durante 16 h. Para realizar a cromatografia, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 16.000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C tendo 200 μL do sobrenadante inserido no *loop* de injeção do sistema de HPLC Waters que é formado por um módulo de separação Waters 2695 e um detector de absorbância a 254 nm Waters 2487. A fase móvel desta análise era composta do tampão A (25 mM Tris pH 7,8) e do tampão B (25 mM Tris pH 7,8, 1 M NaCl) para a realização de um gradiente durante 14 min em temperatura ambiente na coluna de troca iônica Protein-Pak DEAE 5PW 7,5 $\times$ 75 mm (Waters) previamente equilibrada com o tampão A.

As curvas a 254 nm foram registradas pelo programa Empower Quick Start (Waters) e analisadas usando o programa OriginPro, fazendo uma sobreposição das curvas para visualização da presença de nucleotídeos.

3.3 Estudo da oligomerização, determinação das constantes de dissociação e validação da interface de interação entre SEPT3 e SEPT8.

3.3.1 Análise da interação de SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT8G utilizando termoforese em microescala

A termoforese (ou termodifusão) é um fenômeno de transporte de massa induzido por um gradiente de temperatura. Ele foi descrito pelos trabalhos do físico suíço Charles Soret,(104) que observou a distribuição não-homogênea do soluto em uma solução de cloreto

de sódio e nitrato de potássio em um tubo de 30 cm de comprimento em que uma extremidade estava a 80 °C e a outra estava a temperatura ambiente; e pelo físico alemão Carl Ludwig, em um experimento onde adicionava uma solução de sulfato de sódio a um tubo em U e colocava uma extremidade em água com gelo e a outra em água fervente, notando que o soluto migrava para a região mais fria. (105) Considerando a concentração em uma determinada região conforme a difusão da mesma, o raciocínio matemático para este processo foi posteriormente deduzido através do fluxo de massa do i -ésimo componente em um conjunto de p componentes (106) pela (9, onde j_D é a densidade de corrente para a difusão, j_{TD} densidade de corrente para a termodifusão, D é o coeficiente de difusão de massa, ∇c é o gradiente de concentração das moléculas, D_T é o coeficiente de termodifusão e ∇T é o gradiente de temperatura.

$$j = j_D + j_{TD} = -D\nabla c - D_T c \nabla T \quad (9)$$

Sabendo que a densidade de corrente é relacionada com a concentração das moléculas e velocidade das mesmas por $j = vc$, por substituição chegamos à (10:

$$v_{TD} = -D_T \nabla T \quad (10)$$

Sabemos que no estado de equilíbrio termodinâmico, a densidade de corrente global é nula, e portanto, $j = j_D + j_{TD} = 0$, levando à (11.

$$\frac{\nabla c}{c} = -\frac{D_T}{D} \nabla T \quad (11)$$

No limite em que as diferenças de temperatura são infinitesimais, o gradiente de temperatura é considerado como um diferencial e então chegamos a equação (12, onde S_T é o coeficiente de Ludwig-Soret.

$$\frac{dc}{c} = -\frac{D_T}{D} dT = -S_T dT \quad (12)$$

A integração (107-108) da equação acima nos leva à relação entre a concentração de moléculas em uma determinada área e temperatura inicial c_0 com a variação de temperatura $(T - T_0)$.

$$\frac{c}{c_0} = e^{-S_T(T-T_0)} \quad (13)$$

De maneira geral, podemos aproximar um sistema fora do equilíbrio termodinâmico para uma sucessão de equilíbrios locais com variações infinitesimais de temperatura e concentração onde a distribuição de Boltzmann é válida e teremos

$$\frac{dc}{c} = \frac{dG}{kT} = -S_T dT \quad (14)$$

onde é possível associar as regras de Boltzmann para o sistema em equilíbrio local e o coeficiente de Ludwig-Soret, utilizando a energia livre de Gibbs, onde se mantém pressão e temperaturas próximas a constante.(107) A utilização da energia livre de Gibbs em cálculos referentes à termoforese torna-se especialmente interessante quando consideramos que duas espécies químicas interagentes possuem componentes de entalpia (ΔH^0) e entropia ($T\Delta S^0$) e, a partir dele,(109) inferimos a constante de dissociação (K_D) entre estas duas espécies com a relação $\Delta G^0 = RT \ln K_D$.

Experimentalmente, relaciona-se a constante de Ludwig-Soret através da fluorescência relativa (F_{norm}) da amostra somada a um componente de variação desta fluorescência devido a mudanças na temperatura. A equação(15) relaciona estes componentes de forma linear

$$F_{norm} = 1 + \left(\frac{\delta F}{\delta T} + S_T \right) \Delta T \quad (15)$$

A fluorescência normalizada é medida através da marcação de uma das espécies interagentes com um fluoróforo, sendo ela equivalente ao quociente entre moléculas associadas e o total de moléculas marcadas $F_{norm} = \frac{[AB]}{[B]}$ considerando B a molécula marcada e AB o complexo formado (monitorado pela fluorescência do marcador em B). A manipulação da lei da ação das massas para determinação da constante de dissociação

utilizando o valor de F_{norm} permite a determinação do K_D da interação de forma direta, conforme mostra a equação (16).

$$F_{norm} = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + K_D - \sqrt{([A] + [B] + K_D)^2 - 4[AB]}}{2[B]} \quad (16)$$

Ao representar graficamente os valores de F_{norm} *versus* concentração da molécula titulada $[A]$ em formatação semi-log, uma curva sigmoidal mostrará o valor de K_D para espécies interagentes. (110-111)

A termoforese realizada pelas partículas acontece levando em consideração diversas características como o tamanho, carga, camada de solvatação e conformação molecular onde moléculas ligadas se movem mais lentamente do que moléculas não ligadas neste gradiente de temperatura. No aparelho utilizado para este experimento, o gradiente de temperatura é induzido pela incidência de um *laser* infravermelho sobre a amostra acondicionada em capilares de vidro, que induz uma pequena variação de temperatura local (cerca de 1 - 2 °C) fazendo com que as moléculas se movimentem. Esse movimento é monitorado através de um LED posicionado acima do capilar, que detecta o comprimento de onda do fluoróforo acoplado a uma das moléculas parceiras (molécula marcada). Para calcular as constantes de interação, a molécula marcada é adicionada a uma concentração constante sobre uma diluição seriada da molécula não marcada.

Figura 16 - Execução do experimento de termoforese em microescala. A) Uma sequência de capilares contendo a diluição seriada de proteína é adicionada de uma concentração constante de ligante acoplado a um fluoróforo. A objetiva excita as moléculas através do *laser* infravermelho (IV) e o monitoramento do movimento das moléculas é feito pelo LED. B) Cada capilar é monitorado em tempo real fornecendo uma curva de fluorescência *versus* tempo onde a fluorescência no ponto de incidência é máximo antes do *laser* IV ser ligado. A fluorescência no ponto decresce instantaneamente ao ligar o *laser* devido ao movimento termoforético das moléculas, que será diretamente relacionado com a sua massa. Ao desligar o *laser*, as moléculas retornam ao seu movimento browniano normal e a fluorescência retornará ao máximo depois de um tempo – que já não é mais importante para o experimento. C) Um gráfico contendo a fluorescência de cada capilar é plotado mostrando o incremento de fluorescência normalizada dependente da concentração de ligante. A partir deste, será formado o gráfico de interação do complexo, que relaciona a variação de fluorescência com a concentração de ligante.

Fonte: Adaptada de JARABEK-WILLEMSSEN. (109)

Os experimentos de termoforese em microescala foram realizados junto ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC – LNLS), com auxílio do especialista Dr. Daniel Maturana (NanoTemper). Para este experimento, marcamos SEPT3, SEPT8G e SEPT8 usando o fluoróforo RED-NHS (NanoTemper). Este fluoróforo se liga a aminas primárias e possui comprimentos de onda excitação de 650 nm e emissão de 670 nm. Em seguida, realizamos uma diluição da septina marcada no tampão *MST-Standard*, para que o sinal de fluorescência inicial ficasse constante em todos os capilares a 200 contagens de fluorescência

(counts), obtendo uma concentração final de 120 nM de septina marcada para esta condição inicial.

Para a realização do experimento, consideramos a interação entre SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT8G. Uma diluição seriada da septina parceira, não marcada, em razão de 1:1 para amostra:tampão foi feita 16 vezes (volume final de 10 µl de proteína marcada adicionado de 10 µl de proteína não marcada provinda da diluição seriada) para a interação SEPT3-SEPT8 e o experimento repetido 3 vezes enquanto para a interação SEPT3-SEPT8G a diluição foi de 16 vezes sem repetições. Desta forma, estudou-se SEPT3 marcada em interação com SEPT8 nativa validando-se este resultado com SEPT8 marcada e SEPT3 nativa. Neste estudo, não foi adicionado GTP. Para o domínio G de SEPT8, estudamos SEPT8G marcada em interação com SEPT8 nativa, em presença e ausência de GTP.

O tampão utilizado em todo o processo foi o *MST-Standard* (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,05% Tween-20; 1mg/ml BSA). A análise foi realizada em equipamento NanoTemper Monolith NT.115 usando LED como fonte de luz a 30% de sua intensidade e MST Power de 20% sendo que o pulso de *laser* infra-vermelho tem duração de 30s. Os resultados foram analisados pelo software NTAnalysis (Nanotemper) com sobreposição da triplicata para a interação SEPT3-SEPT8 e análise simples para os dados de SEPT3-SEPT8G. O programa executa um ajuste para análise em curvas sigmóides do tipo Dose-Resposta e a constante de dissociação é obtida através da lei da ação das massas adaptada para a termoforese, descrita na equação (16).

3.3.2 Análise de oligomerização de SEPT3-SEPT8 através da ultracentrifugação analítica (AUC)

A ultracentrifugação analítica é uma técnica clássica para a determinação de parâmetros biofísicos como o estado oligomérico de moléculas em solução, sua forma, e coeficientes de difusão e sedimentação pelo método de Velocidade de Sedimentação.

A ultracentrífuga foi descrita inicialmente em 1924, pelo físico-químico sueco Theodor Svedberg, quando ele construiu o aparato para o estudo de sistemas dispersivos. O aparato, que consistia de uma turbina movida a óleo, conseguia atingir uma força de 5.000 vezes a força gravitacional e foi utilizado no estudo da sedimentação da caseína e da hemoglobina. Para surpresa de Svedberg, que considerava que proteínas eram sistemas coloidais de massa molecular indeterminada, ao analisar a amostra de hemoglobina ele

encontrou um sistema monodisperso de coeficiente de sedimentação único correspondendo a uma massa molecular específica de quatro vezes o valor da massa molecular mínima encontrada de 16,7 kDa. (112) Este resultado rendeu a Svedberg o Prêmio Nobel de Química em 1926 e moldou a visão de que as proteínas são moléculas de massa molecular definida como múltiplos inteiros da sua massa molecular mínima (aquela equivalente à massa molecular de um monômero).

Utilizando o raciocínio de forças atuantes sobre um corpo submerso e em movimento, Svedberg estabeleceu o equacionamento para a determinação da massa molecular de macromoléculas através da ultracentrifugação. Desta forma, imaginando-se a força gravitacional se opondo a uma força de empuxo sobre a molécula em solução e ainda à contribuição da força de arraste da molécula no solvente e considerando o estado de equilíbrio dinâmico, (113) chegamos à equação (17 onde $\omega^2 r$ é a aceleração angular exercida sobre uma molécula de massa m , volume parcial específico $\bar{v}$ e coeficiente de fricção f , sedimentando a uma velocidade linear v em um solvente de densidade ρ .

$$F_G + F_E + F_B = \omega^2 r m - \omega^2 r \rho m \bar{v} - f v = 0 \quad (17)$$

O coeficiente de sedimentação é dado pela razão entre a velocidade de sedimentação da molécula v e a aceleração gravitacional $\omega^2 r$ à qual está submetida, relacionando o comportamento em sedimentação com as características intrínsecas da molécula como massa molecular da proteína nativa $M = m \cdot N_A$ e coeficiente de fricção f . Ao rearranjar a (17 e ainda considerando o coeficiente de difusão pela equação de Einstein-Stokes ($D = RT/N_A f$), demonstramos a chamada equação de Svedberg:

$$s \equiv \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{MD(1 - \rho \bar{v})}{RT} \quad (18)$$

Pelo sistema internacional de unidades, o coeficiente de sedimentação s é dado em segundos. Valores típicos para macromoléculas variam entre 1 e 100×10^{-13} segundos e por isso, uma nova unidade de medida foi estabelecida como Svedberg (S), que equivale a 10^{-13} segundos, (114) em homenagem ao descobridor da técnica.

Complementando este trabalho, em 1929 Ole Lamm encontrou a equação diferencial que relaciona os coeficientes de sedimentação e difusão com os perfis de concentração de

uma molécula ($\chi(r, t)$) em relação à sua posição em uma cela setorial (r) e com relação ao tempo (t), (113–115) dada pela equação (19).

$$\frac{\partial \chi}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[r D(M) \frac{\partial \chi}{\partial r} - s(M) \omega^2 r^2 \chi \right] \quad (19)$$

Apesar de muito útil, esta equação somente pode ser aplicada para alguns casos onde a amostra possuía padrão monodisperso e alta massa molecular, o que permite uma migração mais uniforme das partículas e $\partial \chi / \partial r$ são obtidas mais facilmente. Uma vez que partículas menores começam a mostrar um padrão mais difuso, expandindo as raiais de sedimentação devido à existência de subpopulações na distribuição da amostra pela cela, o cálculo da equação de Lamm se torna apenas analítica e altamente custosa em termos computacionais. (116) Para resolver este impasse, novos métodos de resolução da equação de Lamm são baseados em métodos numéricos, como o efetuado pelo programa Sedfit, que será adotado para os experimentos ultracentrifugação analítica, pelo método de velocidade de sedimentação, realizados neste trabalho.

O Programa Sedfit utiliza a abordagem de resolução numérica da equação de Lamm onde se considera que os perfis de sedimentação obtidos para uma distribuição contínua de tamanhos pode ser descrita como uma sobreposição das contribuições de cada subpopulação presente na amostra (isto é, para cada espécie oligomérica), denotada como $c(M)$, em uma variação de massa molecular entre M e $M + dM$. Considerando que $L(M, r, t)$ seja o perfil de sedimentação para uma espécie monodispersa de massa molecular M , que no tempo t esteja a uma distancia radial r em uma cela setorial, é possível aproximar o problema para uma equação integral de Fredholm do primeiro tipo e então teremos a equação (20).

$$a(r, t) = \int c(M) L(M, r, t) dM + \varepsilon \quad (20)$$

onde $a(r, t)$ é o sinal observado e ε representa o erro na medida. Com base nesta equação, o programa então estima valores de $c(M)$ através do método de máxima entropia, (116-117) ajustando valores de f/f_0 para a amostra. Uma informação necessária para a obtenção dos valores numéricos referente à massa molecular é o volume parcial específico da molécula, que deve ser calculado com base na sequência de aminoácidos da proteína em questão. Para fins de obtenção dos valores de coeficientes de sedimentação e difusão, o valor de densidade do

solvente é estimado e fornecido para o programa. Tais estimativas são realizadas pelo programa Sedterp. A Figura 17 ilustra a sequência de experimento e análise realizada para uma amostra em ultracentrifugação analítica.

Figura 17 - A ultracentrifugação analítica, velocidade de sedimentação. A) Através da centrifugação, uma solução proteica inserida em uma cela é submetida à força de aceleração centrífuga devido à rotação da cela em torno do eixo A. Um sistema óptico acoplado realiza a leitura da migração das moléculas em sentido do fundo da cela e a registra em um gráfico de absorvância a 280 nm *versus* raio (cm) para diferentes tempos de corrida. B) O programa Sedfit realiza os cálculos para estimar os coeficientes de sedimentação e respectivas massas moleculares com base nas equações de Lamm para o conjunto de curvas obtidas em um intervalo de tempo, o erro associado à medida é inspecionado visualmente pelo gráfico de Resíduos e, por fim, um gráfico de concentração de coeficientes de sedimentação *versus* coeficiente de sedimentação mostra as espécies presentes na solução proteica analisada.

Fonte: Adaptada de LE MAIRE et al. (118)

Utilizamos a metodologia de ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação para estudo do estado oligomérico do complexo SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT8G. Amostras purificadas de SEPT3, SEPT8 e as misturas equimolares de SEPT3-SEPT8 foram diluídas até as concentrações desejadas mostradas na Tabela 11 para um volume final de 500 μ L antes de adicioná-las à cela da ultracentrífuga.

Tabela 11 - Dados de volume parcial específico ($\bar{v}$) e concentrações utilizadas para cada amostra de septina estudada por ultracentrifugação analítica (AUC).

Amostra	$\bar{v}$	Concentração (μM)
SEPT3	0,742	10
SEPT8	0,734	10
SEPT8G	0,738	20
SEPT3-SEPT8	0,735	3,4; 6,5; 13,1 e 14,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC – LNLS), com colaboração da pesquisadora Dra. Juliana Fattori. A centrifugação foi realizada na ultracentrífuga analítica Beckman modelo Optima XL-A em celas para velocidade de sedimentação e a temperatura utilizada foi de 20°C, a 25.000 rpm com leituras a 280 nm a cada 5 minutos. Os dados foram analisados usando o programa Sedfit em modo *Continuous Distribution c(s)*, usando-se o parâmetro de volume parcial específico $\bar{v}$ correspondente para cada amostra (Tabela 11) e os valores para densidade (ρ) e viscosidade (η) do solvente são 1,0348 g/cm³ e de 0,01228 P, respectivamente, obtidos pelo programa Sendterp a partir das sequências de aminoácidos e dos componentes do tampão. Em seguida, os gráficos de concentração espécies com coeficiente de sedimentação s ($c(s)$) foram plotados contra os valores de coeficiente de sedimentação utilizando o programa Gussi.

Ao considerar os valores de viscosidade (η) e densidade (ρ) do tampão da amostra, e ainda que a constante de Boltzmann é dada por $k_B = R/N_A$, o programa calcula numericamente o valor do coeficiente de difusão para a partícula em questão através da equação (21), a partir de onde também será deduzido o valor de coeficiente friccional f . (119)

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (21)$$

Sabendo que R_H é o raio hidrodinâmico definido para a partícula de coeficiente friccional f em uma temperatura T , podemos estimar o máximo coeficiente de sedimentação da molécula fazendo a substituição da equação (21) na equação (18) e lembrando que R_H é o raio de uma esfera compacta de massa $m = M/N_A$ e volume $\bar{v}$:

$$S_{esf} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A 6\pi\eta \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A}\right)^{1/3}} \quad (22)$$

O máximo coeficiente de sedimentação S_{esf} realizará a estimativa do valor para a partícula de massa molecular M mais compacta e, conseqüentemente, que se move mais rapidamente devido ao seu mínimo coeficiente friccional. Estes valores podem ser estimados diretamente do programa Sednterp, junto com os valores de $\bar{v}$ e ρ , e será utilizado como referência na análise dos dados.

Os coeficientes de sedimentação máximos para cada espécie de septina são listados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores de coeficiente de sedimentação obtidos pelo programa Sednterp para as septinas e seus complexos.

Septina	Estado Oligomérico	S_{esf} (S)
SEPT3	Monômero	3,98
SEPT8	Monômero	4,83
SEPT8G	Monômero	3,51
SEPT3-SEPT8	Dímero	7,25

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de excluir efeitos do tampão e condições ambientes, os valores de coeficiente de sedimentação obtidos em primeira instância pelo programa é então convertido para $S_{20,w}$, que significa o coeficiente de sedimentação normalizado para a molécula solvatada apenas por água a 20 °C. (113-114) A transformação é pautada na equação (23).

$$S_{20,w} = S_{exp} \left(\frac{\eta_{exp}}{\eta_{20,w}} \right) \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20,w}}{(1 - \bar{v}\rho)_{exp}} \quad (23)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

“A questão não é quando você vai parar, mas sim quem vai te parar.”

(Audioslave)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Construção dos vetores para expressão dos complexos de septinas

As ORFs correspondentes às proteínas SEPT3, SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14 seguiram todas o mesmo protocolo de amplificação e foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo a amplificação dos cDNAs de *SEPT3*, *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT10*, *SEPT11-GCα0* e *SEPT14*. Legenda: M – marcador molecular GeneRuler 1 kb Plus (Life Technologies), 1 – *SEPT3* (1,0 kb), 2 – *SEPT6* (1,2 kb), 3 – *SEPT8* (1,2 kb); 4 – *SEPT10* (1,2 kb); 5 – *SEPT11* (1,1 kb); 6 – *SEPT14* (1,2 kb).

Fonte: Elaborada pela autora.

As bandas foram retiradas e purificadas do gel para serem inseridas no vetor pGEM-T *Easy*. Após a seleção das colônias brancas de *E. coli* DH5α através de meio adicionado de X-galactose, foi feita uma extração de DNA, para realização da digestão com EcoRI. A liberação de um inserto contendo aproximadamente o mesmo tamanho em kilo pares de base (kb) indica uma alta probabilidade do clone estar correto e então o mesmo foi enviado para sequenciamento usando os oligonucleotídeos M13F e M13R, com sequencia para reconhecimento no vetor pGEM-T *Easy*.

Os clones com sequencia de DNA corretas foram ligados ao vetor pETDuet-1, seguindo a ordem: SEPT3 clonada em MCS1 (que possui uma extensão de 6 histidinas) e depois o correspondente parceiro do grupo II é clonado em MCS2. Os clones foram enviados para novo sequenciamento de DNA.

4.2 Validação da interação não canônica entre septinas dos grupos I e II

Os valores de massa molecular esperado para o monômero de cada septina analisada são mostrados na Tabela 13 seguida de suas sequências de aminoácidos correspondentes.

Tabela 13 – Valores esperados para massa molecular dos monômeros de septinas.

Septina	MM (kDa)
SEPT3	41,4
SEPT6	51,5
SEPT8	52,5
SEPT8 (Domínio G)	33,3
SEPT10	55,3
SEPT11 (CGα0)	46,1
SEPT14	52,7

Fonte: Elaborada pela autora.

As sequências de aminoácidos correspondentes ao monômero de cada uma das septinas utilizadas estão mostradas abaixo.

Domínios: N-terminal, G, C-terminal.

Proteína SEPT3, isoforma B

MSKGLPETRTDAAMSELVPEPRPKPAVPMKPSINSNLLGYIGIDTHIEQMRKKTMTKT
 GFDFNIMVVGQSLGKSTLVNTLFKSQVSRKASSWNREEKIPKTVEIKAIGHVIEEGG
 VKMKLTVIDTPGFGDQINNENCWEPIEKYINEQYEFKFLKEEVNIARKKRIPDTRVHCC
 LYFISPTGHSRLPLDLEFMKHLISKVVNIIPVIAKADTMTLEEKSEFKQVRKELEVNGI
 EFYPQKEFDEDLEDKTENDKIRQESMPFAVVGSDKEYQVNGKRVLGRKTPWGIIIEVE
 NLNHCEFALLRDFVIRTHLQDLKEVTHNIHYETIRAKRLN DNGGLPPGEGLLGTVLP
 PVPATPCPTAE

Proteína SEPT6, isoforma A

MAATDIARQVGEGCRTVPLAGHVGFDLPDQLVNKSVSQGFCFNILCVGETGLGKST
 LMDTLFNTKFEGEPATHTPQGVQLQSNTYDLQESNVRLKLTIVSTVGFQDQINKEDS
 YKPIVEFIDAQFEAYLQEELKIRRVLHTYHDSRIHVCLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKL
 DSKVNIPIIAKADAISKSELTKFKIKITSELVSNQVQIYQFPTDDESVAEINGTMNAHLP
 FAVIGSTEELKIGNKMMRARQYPWGTQVQVENEAHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQT
 HTRHYELYYRCKLEE MGFKDTPDPSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMF
 VQRVKEKEAELKEAEKELHEKFDRLKKLHQDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKT
 AAELLQSQGSQAGGSQTLKRDKEKKN

Proteína SEPT8, isoforma B

MAATDLERFSNAEPEPRSLSLGGHVGFDLPDQLVSKSVTQGFSFNILCVGETGIGKST
 LMNTLFNTTFETEEASHHEACVRLRPQTYDLQESNVQLKLTIVDAVGFQDQINKDER
 PIVDYIDAQFENYLQEELKIRRSDFYHDTRIHVCLYFITPTGHSLKSLDLVTMKKLDS
 KVNIPIIAKADTISKSELHKFKIKIMGELVSNQVQIYQFPTDDEAVAEINAVMNAHLFP
 AVVGSTEEVKVGNKLVRARQYPWGVVQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQT
 HSRHYELYYRCKLEEMG FQSDSDGSQPFSLQETYEAKRKEFLSELQRKEEEMRQMF

VNKVKETELELKEKERELHEKFEHLKRVHQEEKRKVEEKRRELEEETNAFNRRKAA
VEALQSQUALHATSQQPLRKDKDKKN

Proteína SEPT8G

SKSVTQGFSFNILCVGETGIGKSTLMNTLFNTTFETEEASHHEACVRLRPQTYDLQES
NVQLKLTIVDAVGFGDQINKDERPIVDYIDAQFENYLQEELKIRRSFLDYHDTRIHVC
LYFITPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNIPIIAKADTISKSELHKFKIKIMGELVSNGVQI
YQFPTDDEAVAEINAVMNAHLPFVAVVGSTEEVKVGNKLVRARQYPWGVVQVENEN
HCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHSRHYEL YRRCKLEEMGFQD

Proteína SEPT10, isoforma 1

MASSEVARHLLFQSHMATKTTCMSSQGSDDDEQIKRENIRSLTMSGHVGFESELPDQLV
NRSIQQGFCFNILCVGETGIGKSTLIDTLFNTNFEDYESSHFCPNVKLKAQTYELQESN
VQLKLTIVNTVGFGDQINKEESYQPIVDYIDAQFEAYLQEELKIKRSFLTYHDSRIHVC
LYFISPTGHSLKTLDLLTMKNLDSKVNIIPVIAKADTVSKTELQKFKIKLMSSELVSNGV
QIYQFPTDDDTIAKVNAAMNGQLPFVAVVGSMDDEVKVGKMKVVKARQYPWGVVQVE
NENHCDFVKLREMLICTNMEDLREQTHTRHYEL YRRCKLEEMGFTDVGPENKPVSV
QETYEAKRHEFHGERQRKEEEMKQMFVQRVKEKEAILKEAERELQAKFEHLKRLHQ
EERMKLEEKRRLLLEEIIAFSKKKATSEIFHSQSFLATGSNLRKDKDRKNDNFL

Proteína SEPT11

GFDSLDPQLVNKSTSQGFCFNILCVGETGIGKSTLMDTLFNTKFESDPATHNEPGVRL
KARSYELQESNVRLKLTIVDTVGFGDQINKDDSYKPIVEYIDAQFEAYLQEELKIKRSL
FNYHDTRIHACLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNIPIIAKADTIAKNELHKFKS
KIMSELVSNGVQIYQFPTDEETVAEINATMSVHLPFAVVGSTEEVKIGNKMAKARQY
PWGVVQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHTRHYEL YRRCKLEEMGFKDT
DPDSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMFVMRVKEKEAELKEAEKELHEK
FDLLKRTHQEEKKKVEDKKKELEEEVNNFQKKKAAAQLLQSQAQQSGAQQTKKDK
DKKNASFT

Proteína SEPT14

MAERTMAMPTQIPADGDTQKENNIRCLTTIGHFGFECLPNQLVRSIRQGFTFNILCV
GETGIGKSTLIDTLFNTNLKDNKSSHFYSNVGLQIQTYELQESNVQLKLTVVETVGYG
DQIDKEASYQPIVDYIDAQFEAYLQEELKIKRSLEFYHDSRVHVCYFISPTGHSLKSL
DLLTMKNLDSKVNIPIIAKADTISKNDLQTFKNKIMSELISNGIQIYQLPTDEETAAQA
NSSVSGLLPFVAVVGSTDEVKVGKRMVRGRHYPWGVVLQVENENHCDFVKLRDMLLC
TNMENLKEKTHTQHYECYRYQKLQKMGFTDVGPNNQPVSFQEIFEAKRQEFYDQCQ
REEEELKQRFMQRVKEKEATFKEAEKELQDKFEHLKMIQQEEIRKLEEEKKQLEGEII
DFYKMKAAASEALQTQLSTDTKKDKHRKK

O resultados obtidos, a partir dos padrões de coexpressão, serão mostrados de acordo com o complexo, a fim de melhor compreensão dos resultados.

4.2.1 SEPT3-SEPT14

O padrão de expressão em célula *E. coli* Rosetta 2 usando meio de cultura LB para o complexo SEPT3-SEPT14 é mostrado na Figura 19.

Figura 19 - SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT14. A) indução de 0,2 mM IPTG a 20 °C; B) indução de 0,5 mM IPTG a 20 °C; C) indução de 0,2 mM IPTG a 37 °C; D) indução de 0,5 mM IPTG a 37 °C. Legenda: 1 – 0h indução, fração solúvel; 2 – 0h indução, fração insolúvel; 3 – 2h indução, fração solúvel; 4 – 2h indução, fração insolúvel; 5 – 4h indução, fração solúvel; 6 – 4h indução, fração insolúvel; 7 – 16h indução, fração solúvel; 8 – 16h indução, fração insolúvel; M – Marcador Molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

Notamos que SEPT3 era expressa na maioria das frações solúveis e insolúveis quando expressadas em célula de *E. coli* Rosetta 2 em meio LB. Entretanto, SEPT14 somente se mostrou nas frações insolúveis, o que pode indicar uma ausência de interação entre estas septinas. Em uma tentativa de obter SEPT14 expressa na fração solúvel, utilizamos o meio auto-indutor (AI) para expressar as proteínas. O resultado é mostrado na Figura 20.

Figura 20 - SDS-PAGE 10% do teste de expressão para SEPT3-SEPT14 utilizando meio auto-indutor. Legenda: 1 – 0h, fração solúvel; 2 – 0h, fração insolúvel; 3 – 2h, fração solúvel; 4 – 2h, fração insolúvel; 5 – 4h, fração solúvel; 6 – 4h, fração insolúvel; 7 – 6h, fração solúvel; 8 – 6h, fração insolúvel; 9 – 16h, fração solúvel; 10 – 16h; fração insolúvel; M – Marcador Molecular Low Range (BioRad). Os tempos aqui indicados correspondem ao tempo decorrido após ajustar a temperatura do agitador para 20 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

A mudança de composição do meio de cultura aparentemente anulou a expressão de SEPT14, que não aparece nem mesmo nas frações insolúveis coletadas.

Pelos resultados apresentados, entendemos que SEPT14 não é expressa de forma solúvel em nenhum dos testes de expressão, o que pode indicar a ausência de interação com SEPT3. Notamos também que a banda predita para SEPT14 encontra-se próximo a 45 kDa, cerca de 7 kDa menor do que o valor de massa molecular predito para um monômero desta septina (52 kDa). Um novo sequenciamento de nucleotídeos deste clone mostrou que o gene encontra-se truncado em seu C-terminal, incluindo apenas os aminoácidos 1 a 392 (de 429 aminoácidos no total). Estes 37 aminoácidos ausentes correspondem a menos de 28% do domínio C-terminal, longe da zona bem estruturada do domínio G e é pouco provável que ela seja responsável pela expressão da proteína somente na fração insolúvel, fortalecendo a hipótese de que esta septina não interage com SEPT3 através da interface G.

Pelos problemas de solubilidade encontrados na expressão deste complexo, optamos por excluí-lo da continuação deste trabalho.

4.2.2 SEPT3-SEPT10

Os resultados obtidos para o teste de expressão de SEPT3-SEPT10 são mostrados na Figura 21.

Figura 21 - SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT10. A) indução de 0,2 mM IPTG a 20 °C; B) indução de 0,5 mM IPTG a 20 °C; C) indução de 0,2 mM IPTG a 37 °C; D) indução de 0,5 mM IPTG a 37 °C. Legenda: 1 – 0h indução, fração solúvel; 2 – 0h indução, fração insolúvel; 3 – 2h indução, fração solúvel; 4 – 2h indução, fração insolúvel; 5 – 4h indução, fração solúvel; 6 – 4h indução, fração insolúvel; 7 – 16h indução, fração solúvel; 8 – 16h indução, fração insolúvel; M – Marcador Molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o padrão de expressão para SEPT3-SEPT14, nos deparamos com a expressão da SEPT10 apenas na fração insolúvel de todas as alíquotas expressadas e recorremos a uma expressão em meio auto-indutor para tentar alguma expressão das duas septinas na fração solúvel.

Figura 22 – SDS-PAGE 10% do teste de expressão para SEPT3-SEPT10 utilizando meio auto-indutor. Legenda: M – Marcador Molecular Low Range (BioRad); 1 – 0h, fração solúvel; 2 – 0h, fração insolúvel; 3 – 2h, fração solúvel; 4 – 2h, fração insolúvel; 5 – 4h, fração solúvel; 6 – 4h, fração insolúvel; 7 – 6h, fração solúvel; 8 – 6h, fração insolúvel; 9 – 16h, fração solúvel; 10 – 16h, fração insolúvel. Os tempos aqui indicados correspondem ao tempo decorrido após ajustar a temperatura do agitador para 20 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de aumentar sutilmente a concentração de SEPT10 na fração solúvel com o uso de meio auto-indutor (Figura 22), notamos que a mesma continua sendo encontrada principalmente na fração insolúvel.

Para verificar se mesmo esta pequena expressão de SEPT3-SEPT10 na fração solúvel de 16 horas de expressão em meio AI era capaz de formar complexos entre estas septinas, uma pequena purificação em coluna de afinidade ao cobalto foi realizada.

Figura 23 – SDS-PAGE 10% do padrão de purificação em resina de afinidade ao cobalto do complexo SEPT3-SEPT10 expresso em meio AI. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol; 7 – Eluição 500 mM Imidazol; M – Marcador molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

O padrão de purificação para SEPT3-SEPT10 mostrado na Figura 23 confirmam o mesmo que os ensaios de duplo-híbrido indicavam: que estas septinas não interagem. Uma

vez que ambas as septinas são expressas, mas somente uma (SEPT3) está na fração solúvel, é possível inferir que não houve uma interação entre as duas para a formação de um complexo estável. É possível acrescentar que apesar de uma presença mínima de SEPT10 na fração solúvel da expressão em meio auto-indutor, a mesma não foi recuperada juntamente com SEPT3 (que possuía uma extensão de 6 histidinas) da resina de cobalto, indicando mais uma vez a ausência de interação entre estas septinas.

O resultado encontrado concorda com aqueles descobertos por Macedo e Nakahira, (72) que verificaram em estudos de duplo-híbrido que SEPT10 não interagiu com nenhuma septina quando era usada como presa e, quando utilizada como isca, recuperava apenas SEPT4 e SEPT7, provavelmente formando interações canônicas. Desta forma, concluímos que SEPT10 não realiza interações não canônicas com SEPT3 e não aplicamos técnicas mais avançadas no estudo deste complexo.

4.2.3 SEPT3-SEPT6

Para o complexo SEPT3-SEPT6, os resultados obtidos para testes de expressão são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - SDS-PAGE 10% dos testes de expressão com o complexo SEPT3-SEPT6. A) indução de 0,2 mM IPTG a 20 °C; B) indução de 0,5 mM IPTG a 20 °C; C) indução de 0,2 mM IPTG a 37 °C; D) indução de 0,5 mM IPTG a 37 °C. Legenda: 1 – 0h indução, fração solúvel; 2 – 0h indução, fração insolúvel; 3 – 2h indução, fração solúvel; 4 – 2h indução, fração insolúvel; 5 – 4h indução, fração solúvel; 6 – 4h indução, fração insolúvel; 7 – 6h indução, fração solúvel; 8 – 6h indução, fração insolúvel; 9 – 16h indução, fração solúvel; 10 – 16h indução, fração insolúvel; M – Marcador Molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificada a presença das duas septinas na fração solúvel, optamos pela expressão em meio LB a 20 °C. Com isso, foram realizadas duas purificações deste complexo, em diferentes concentrações de cloreto de sódio no tampão: 500 mM e 800 mM. Inicialmente, as diferentes concentrações de sal foram utilizadas para estabelecer a condição de purificação mais estável para o complexo. A Figura 25 mostra alíquotas da primeira purificação em resina de cobalto, utilizando o tampão COB adicionado de 500 mM de cloreto de sódio.

Figura 25 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT6 a 500 mM NaCl. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol (primeira fração de 5 mL); 7 – Eluição 500 mM Imidazol (segunda fração de 5 mL); M – Marcador molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA (GE) foi realizada em uma coluna pré-empacotada Superdex 200 16/60 em temperatura ambiente e utilizando tampão FINAL com a mesma concentração de cloreto de sódio, para as frações 6 e 7. O perfil de eluição da coluna mostrou para o complexo SEPT3-SEPT6 um pico correspondente a oligômeros de alta massa molecular (próximo ao volume morto, indicado com sombreamento vermelho), um pico de absorção em volume analítico (indicado em sombreamento verde) e por último um pico de absorção próximo ao volume total da coluna (120 mL, indicado em amarelo), onde são eluídos os componentes do tampão da coluna de cobalto que não estavam presentes no tampão da coluna Superdex (imidazol e Tris). A Figura 26 mostra a cromatografia sobreposta às frações analisadas em SDS-PAGE 10% correspondente a cada pico.

Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular (SEC) para o complexo SEPT3-SEPT6, em tampão contendo 500 mM de NaCl. Sombra em vermelho indica o volume morto da coluna enquanto a em verde indica o volume analítico da coluna. O volume final da coluna, em que apenas são ilustrados componentes do tampão (em especial o imidazol), é sombreado em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando as frações eluídas, verificamos quais eram as septinas presentes em cada um dos picos de absorção do gráfico por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE 10%), conforme mostrado na Figura 27.

Figura 27 - SDS-PAGE 10% das frações eluídas na cromatografia de exclusão molecular (SEC) para o complexo SEPT3-SEPT6 a 500mM de NaCl. As frações analisadas no gel são mostradas abaixo de seu pico correspondente. A sombra em vermelho indica oligômeros de alta massa molecular e verificamos a presença tanto de SEPT3 quanto de SEPT6 no gel; o volume analítico da coluna (verde) apenas mostra SEPT3 pelo SDS-PAGE enquanto não se vê bandas de proteínas no pico correspondente ao final da corrida, em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado indicado pelo SDS-PAGE das amostras do complexo de SEPT3-SEPT6, quando a 500 mM de cloreto de sódio, nos levaram a acreditar que o complexo poderia estar apenas formando agregados. A presença de SEPT3 sozinha em volume analítico indicava uma possibilidade de que a mesma não interage com SEPT6.

Para melhor compreender se um possível complexo poderia ser isolado de forma mais estável, aumentamos a concentração do sal nos tampões a fim de promover a solubidade das proteínas e obter um complexo no volume de eluição analítico da coluna. Assim, a concentração de cloreto de sódio no tampão de purificação da amostra foi elevado para 800 mM. O padrão de eluição desta coluna foi verificado em SDS-PAGE 10%, como mostrado na Figura 28.

Figura 28 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT6 a 800 mM NaCl. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol (primeira fração de 5 mL); 7 – Eluição 500 mM Imidazol (segunda fração de 5 mL); M – Marcador molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

A ausência de uma banda correspondente a SEPT6 nas frações 6 e 7 da purificação em resina de cobalto, com a sua presença na fração não ligada à resina (fração 3), mostra que esta septina não se ligou a SEPT3 (que possuía a extensão de 6 histidinas).

Os resultados aqui apresentados mostram que SEPT6 interage com SEPT3 apenas por um processo de agregação que deixa de acontecer quando a concentração de NaCl é elevada a 800 mM, o que pode ser gerado por interações promíscuas entre estas septinas. Por este motivo, o complexo não foi estudado por técnicas mais complexas e concluímos que SEPT6 não interage com SEPT3 nas condições aqui analisadas.

4.2.4 SEPT3-SEPT11

Para estudar o complexo SEPT3-SEPT11, optamos por uma construção de SEPT11 que inicia pela sua estrutura $\alpha 0$ (que se inicia a partir do 2º aminoácido do domínio G), uma vez que ela apresentava menores problemas de solubilidade.

Neste e no próximo complexo a ser apresentado, não tivemos problemas com os padrões de expressão e optamos para a expressão em meio LB a 20 °C durante 16 horas usando 0,5 mM de IPTG para a indução.

A Figura 29 mostra o padrão de purificação do complexo SEPT3-SEPT11 em coluna de cobalto e tampão contendo 800 mM de NaCl.

Figura 29 - SDS-PAGE 10% contendo o padrão de purificação em coluna de afinidade ao cobalto TALON para o complexo SEPT3-SEPT11 usando tampão a 800 mM NaCl. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol (primeira fração de 5 mL); 7 – Eluição 500 mM Imidazol (segunda fração de 5 mL); M – Marcador molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

Mesmo a uma alta concentração de cloreto de sódio, as septinas eram eluídas juntas nas frações contendo imidazol, indicando que SEPT3 está interagindo com SEPT11 na condição avaliada, uma vez que SEPT3 possui uma extensão de 6 histidinas em seu N-terminal devido a sua posição no vetor de construção. É notável, entretanto, uma aparente diferença na concentração de cada septina na mesma fração do gel, sendo SEPT3 a banda que aparece mais corada e, portanto, em maior concentração. O corante coomassie blue liga-se às aminas primárias da cadeia polipeptídica e é esperado que proteínas maiores sejam coradas mais fortemente. O que observamos aqui é o oposto: SEPT3, de menor massa molecular, cora-se mais fortemente do que SEPT11, de maior massa molecular. Este é um indicativo de que a interação SEPT3-SEPT11 não é forte a ponto de recuperar apenas complexos de

SEPT3-SEPT11 pela extensão de histidina em apenas uma das moléculas parceiras e é provável que a interação esteja em equilíbrio dinâmico. Assim sendo, partimos para o segundo estágio de purificação, que corresponde à análise em coluna de exclusão por tamanho molecular.

Para este estágio, primeiramente foi determinada a curva de calibração para a coluna Superdex 200 10/300 em uso. Para isso, utilizamos proteínas padrão comerciais solubilizadas no tampão FINAL, o mesmo utilizado para as amostras de septina. A concentração destes padrões foi de 1,0 mg/ml e durante a corrida, o fluxo de tampão na coluna foi mantido a 0,5ml/min.

Tabela 14 - Valores de volume de eluição (V_e) obtidos para os padrões de massa molecular utilizados na calibração da coluna Superdex 200 10/300. Com base nestes valores, os valores de calibração K_{av} e $\log MM$ foram estimados e listados.

Proteína Padrão	Volume de Eluição (mL)	K_{av}	$\log MM$
Blue Dextran	9,22	-	-
Anidrase Carbônica (AC)	17,93	0,589	1,46
Ovalbumina (OV)	16,61	0,500	1,63
Albumina (AL)	15,51	0,425	1,82
Conalbumina (CO)	15,44	0,421	1,87
Álcool Desidrogenase (AD)	14,25	0,340	2,17

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando a fórmula para o cálculo dos valores de calibração K_{av} considerando o Blue Dextran como o volume morto (V_0) e ainda, sabendo que o volume geométrico (V_c) de uma coluna 10/300 é de 24 mL, a Tabela 14 lista os valores de K_{av} e $\log MM$ para os padrões da calibração. O ajuste foi realizado plotando um gráfico de K_{av} versus $\log MM$ no programa OriginPro, utilizando o ajuste linear, mostrado na Figura 30.

Figura 30 - Curva de calibração obtida para a coluna Superdex 200 10/300 utilizando tampão HEPES.

Fonte: Elaborada pela autora.

A regressão linear para os valores de volumes de eluição correspondentes aos padrões de massa molecular retornou a Equação (24).

$$K_{av} = -0,343 \log MM + 1,069 \quad (24)$$

Com base na curva de calibração descrita, foram calculadas as massas moleculares de todas as amostras de septinas analisadas no segundo estágio de purificação. Assim sendo, para o complexo SEPT3-SEPT11 o padrão de cromatografia obtido é mostrado na Figura 31.

Figura 31 - Curva de cromatografia em Superdex 200 10/300 do complexo SEPT3-SEPT11 em tampão contendo 800 mM NaCl. No detalhe, o gráfico referente ao ajuste do pico III, de maior absorbância, é mostrado como um ponto vermelho entre os pontos da curva de calibração da coluna.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os picos obtidos nesta cromatografia são mostrados na Tabela 15, onde os dados de ajuste para a curva de calibração são mostrados para cada pico de interesse.

Tabela 15 - Dados correspondentes a cada pico na eluição de Superdex 200 10/300 para o complexo SEPT3-SEPT11.

Identificação	Volume de Eluição (mL)	Kav	log MM	Massa Molecular (kDa)
I	10,05	0,056	2,95	906
II	11,80	0,174	2,61	410
III	16,20	0,472	1,74	55

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificamos pelos dados obtidos que os dois primeiros picos correspondem a oligômeros de alta massa molecular enquanto o pico III corresponde a uma massa molecular maior do que aquela esperada para um monômero para as septina. Entretanto, não é possível diferenciar entre as septinas SEPT3 e SEPT11 devido à resolução da coluna. Uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% de concentração mostrou um padrão interessante, como visto na Figura 32.

Figura 32 - Ampliação da região dos picos de eluição de SEPT3-SEPT11 em Superdex 200 e sobreposição com as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%. A banda de cima corresponde a SEPT11 enquanto a banda de baixo corresponde a SEPT3. O gráfico está posicionado exatamente no ponto em que inicia a eluição da fração correspondente no gel mostrado abaixo dele.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificamos assim que o pico de interesse corresponde a um valor maior do que o esperado para um monômero de septina uma vez que SEPT3 é predita para ter 40 kDa e enquanto SEPT11 teria 46 kDa e a massa determinada experimentalmente para aquele pico é de 55 kDa. Um dos argumentos possíveis seria de que haveria um equilíbrio entre a formação de um dímero SEPT3-SEPT11 e os monômeros livres através de interações rápidas. A presença da extensão de histidinas acoplada apenas ao N-terminal de SEPT3 reforçam a hipótese de que um complexo SEPT11-SEPT3 realmente exista, apesar de indicativos de uma interação rápida e/ou fraca, como indicado pela largura da base de seu pico no cromatograma.

Para que fosse possível entender se o pico III é fruto apenas de um equilíbrio entre espécies, utilizamos uma fração do início deste pico, evidenciada em vermelho na Figura 32, para realizar o experimento de cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento a múltiplos ângulos (SEC-MALS), cuja análise de massa molecular estimada está listada na Tabela 16.

Ao estudar a fração do pico III proveniente da SEC, correspondente a 55 kDa, verificamos a presença de 2 picos no SEC-MALS: um predominante e outro bem menor, anterior a esse. Infelizmente, a presença de aminoácidos a 50 mM produziram uma sinal muito grande no final da corrida (próximo a 15 min) e reduziram a amplitude dos picos

correspondentes às espécies de septinas, especialmente na medida de dRI. Contudo este fato não atrapalhou na análise do experimento, uma vez que a diferença de picos é vista na correção da linha de base, que é mostrado pelo gráfico de *Despiking Procedure*, mostrado na Figura 33. O procedimento de definição dos picos foi feito manualmente e são mostradas a seguir.

Figura 33 - Gráfico de *Despiking Procedure* obtido pelo programa ASTRA 7. Ele ilustra, na forma de um cromatograma, os picos obtidos em todos os canais do SEC-MALS para a amostra SEPT3-SEPT11. Cada curva representa a medida de um detector: Preto – LS1 corresponde à medida a 43,6°, vermelho – LS2 corresponde a 90,0° e a curva em verde corresponde à medida a 136,4°. O pico sombreado em vermelho corresponde ao “pico fantasma” enquanto aquele sombreado em amarelo corresponde ao final da eluição e ambos são excluídos da análise. Apenas os picos sombreados em verde correspondem à amostra de septinas e será utilizado no estudo a seguir.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os picos foram então definidos com base no índice de refração diferencial, mostrado na cor azul pelo programa ASTRA 7. É importante notar que o primeiro pico registrado pelo sistema de MALS é conhecido como “pico fantasma” e não corresponde à amostra de proteína, mas sim a partículas de sílica que saem da coluna do HPLC quando se inicia um fluxo de tampão. É um processo normal e não representa problemas para a análise.

Figura 34 - Gráfico controle contendo a definição dos picos do SEC-MALS para SEPT3-SEPT11. A curva em vermelho corresponde à leitura do espalhamento de luz a 90° enquanto em azul é mostrado o índice de refração diferencial durante o experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 16 - Resultados obtidos para os momentos de massa molecular presentes na amostra de SEPT3-SEPT11, analisada por SEC-MALS e calculadas pelo programa ASTRA 7. O valor de M_w corresponde à medida direta estimada pelo espalhamento de luz a cada instante de detecção enquanto M_n é uma função das menores massas presentes e M_z é uma função das maiores massas presentes.

	Pico I		Pico II	
	Valor	Erro associado (%)	Valor	Erro associado (%)
Massa total estimada (µg)				
	0,36	-	7,19	-
Momentos de massa molar (kDa)				
M_n	43,39	3,162	44,50	0,839
M_w	44,41	2,781	48,90	0,878
M_z	45,50	5,997	53,42	2,014

Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados gráficos para os valores listados na Tabela 16 auxiliam em uma maior compreensão do sistema estudado. Para tanto, o programa ASTRA 7 plota a massa molecular obtida para cada medida realizada durante o experimento, a cada 0,5 segundos, e seu resultado é mostrado na Figura 35.

Figura 35 - Gráfico de massa molar *versus* volume, mostrando as medidas em tempo real para cada ponto captado. Em preto, a curva de índice de refração diferencial ilustra a concentração de cada pico durante o experimento. Neste gráfico, a massa molar mostrada corresponde às medidas de M_w .

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil de massas moleculares aferidas para o complexo SEPT3-SEPT11 pelo SEC-MALS indicam uma alta polidispersividade do sistema, que acaba sendo incapaz de separá-lo provavelmente devido a interações mais rápidas do que o tempo de intervalo medidas. Devido ao padrão observado, não foi possível que o sistema QELS (miniDAWN) fosse capaz de determinar o segundo coeficiente de virial e, mais interessante, os raios de giro das espécies em solução uma vez que a função de correlação não foi estabelecida com sucesso.

Ao obter massas moleculares em um padrão decrescente ao longo do pico, como é apontado pelo Pico 2 (curva em verde na Figura 35), as interações entre as septinas parceiras são mostradas como algo tão rápido que forma uma população altamente polidispersa e seu gráfico de massas corresponde ao esperado para polímeros em solução, como ilustrado na Figura 36.

Figura 36 - Gráfico de massa molecular *versus* volume obtido para uma amostra de poliacrilamida. O cromatograma em azul corresponde ao índice de refração diferencial (dRI) enquanto o espalhamento de luz a 90° (LS) é mostrado em vermelho. Os pontos em vermelho indicam a massa molecular estimada para a fração eluída naquele instante da corrida. Nota-se a variação de 1 ordem de grandeza entre as moléculas eluídas no início do pico e aquelas que são eluídas no final dele. Uma marca adicional de sistemas polidispersos é que os cromatogramas LS e dRI nunca se sobrepõem, havendo um deslocamento para a direita do gráfico de dRI.

Fonte: Adaptada de WYATT... (102)

Com base nos resultados apresentados para a interação SEPT3-SEPT11 da Figura 35, observamos que apesar de o Pico 1 apresentar menor variância, também indicam uma concentração em massa muito baixa. Sua massa molar estimada, M_w , indica uma massa de 44 kDa, algo que se aproxima sem sombra de dúvidas para um monômero de septinas seja ele SEPT3 ou SEPT11. O Pico 2, no entanto, apesar de mostrar uma alta variação de espécies presentes como é evidenciado pelo tracejado descendente em verde sobre na Figura 35, mostra uma massa molecular estimada de 48 kDa. Ao verificar que o valor para M_n é de 44,5 kDa, sabendo que para o programa M_n é o valor de massa molar estimada como uma função das menores massas moleculares encontradas para uma solução polimérica, e que por outro lado M_z , que é determinada em função das maiores massa moleculares presentes – sendo equivalentes às massas determinadas por centrifugação (velocidade de sedimentação) – indica o valor de 53,4 kDa, podemos inferir que a amostra constitui-se majoritariamente de monômeros de SEPT3 e SEPT11. Contudo, a presença de espécies correspondentes a uma massa molar maior do que 70 kDa no início do pico sugere interações rápidas entre estes monômeros.

Para realizar ensaios biofísicos para a caracterização da natureza destas interações rápidas seria necessário a expressão de SEPT11 isoladamente. Para isso, tentamos clonar o cDNA de SEPT11 em pET28a, mas não obtivemos sucesso. Por este motivo, não prosseguimos com o estudo do complexo SEPT3-SEPT11.

4.2.5 SEPT3-SEPT8

O complexo SEPT3-SEPT8 foi facilmente coexpresso em células de *Escherichia coli* Rosetta -2 em todas as condições e, portanto, escolhemos a mesma condição de expressão que foi utilizada para todas as outras septinas: 6 litros de meio LB e indução com 0,5 mM de IPTG com tempo de expressão de 16 horas a 20 °C.

Para este complexo, realizamos três purificações iguais, apenas variando a concentração de sal presente nos tampões de purificação por afinidade e na de exclusão molecular: 300 mM, 500 mM e 800 mM de NaCl. Esta abordagem foi baseada nos resultados observados para a purificação de SEPT3-SEPT6 e foi também um meio para compreender melhor se a interação entre estas proteínas era suscetível à concentração de sal, indicando uma possibilidade de que a interação fosse realizada pela interface NC, devido à existência de resíduos que realizam pontes salinas nesta região e que são susceptíveis à força iônica do meio em que são inseridas.

Inicialmente, na purificação em coluna de resina de cobalto, as frações foram analisadas através de SDS-PAGE 10% conforme ilustra a Figura 37.

Figura 37 - SDS-PAGE 10% das alíquotas de purificação em resina de afinidade ao cobalto para o complexo SEPT3-SEPT8 usando diferentes concentrações de cloreto de sódio no tampão. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol; 7 – Eluição 500 mM Imidazol; M – Marcador molecular Low Range (BioRad).

Fonte: Elaborada pela autora.

A variação de concentração de cloreto de sódio presente no tampão da purificação do complexo, aparentemente, não impediu a associação entre estas septinas. As bandas correspondentes a SEPT3 e SEPT8 estão superexpressas e são identificadas na Figura 37, apesar de também aparecerem bandas de proteínas contaminantes. A eluição das duas bandas na presença de 500mM de imidazol é um claro indício de uma interação direta entre as duas septinas. Por outro lado, pela intensidade relativa das bandas fica claro que há um excesso da SEPT3 presente no eluato.

O complexo SEPT3-SEPT8 foi analisado em cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC-SEC) utilizando o sistema ÄKTA Purifier (GE Life Sciences) em coluna Superdex 200 10/300 GL utilizando uma injeção de 1,0 mL de amostra. Nesta primeira cromatografia, o padrão mostrado continha oligômeros de alta massa molecular que eluíam próximo a 40 mL e não contribuíam com dados interessantes para estudo. Para excluir esta fração de proteínas agregadas, o pico de eluição em volume analítico desta cromatografia foi então concentrada até 1,0 mL novamente e recromatografada com a mesma coluna em condições idênticas. A Figura 38 mostra os cromatogramas sobrepostos para as recromatografias.

Figura 38 - Curva de cromatografia em Superdex 200 10/300 do complexo SEPT3-SEPT8, em diferentes concentrações de cloreto de sódio no tampão de purificação. Roxo - 300 mM NaCl; rosa - 500 mM NaCl; azul - 800 mM NaCl. O detalhe ilustra o ajuste do valor do pico com a curva de calibração da coluna onde o ponto em vermelho no gráfico representa o valor experimental de SEPT3-SEPT8.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparativamente com SEPT3-SEPT11, o valor de massa molecular encontrado para o pico na cromatografia é levemente maior. A Tabela 17 indica o valor encontrado e os valores calculados.

Tabela 17 - Dados de massa molecular obtidos por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna Superdex 200 10/300 GL para o complexo SEPT3-SEPT8.

Identificação	Volume de Eluição (mL)	K_{av}	log MM	Massa Molecular (kDa)
I	16,06	0,465	1,77	59

Fonte: Elaborada pela autora.

Curiosamente, na concentração de 500 mM de NaCl, vemos a formação de algo como uma “ombro” durante ascensão do pico correspondente principal. O mesmo, embora menor, foi observado também no caso do tampão contendo 800mM de NaCl mas não na menor concentração usada de 300 mM.

Pelos cálculos realizados com base na calibração desta coluna de exclusão molecular chegamos a um valor pouco maior do que aquele esperado para um monômero (59 kDa), levando-se em consideração que monômeros de SEPT3 possuem 41,4 kDa e os de SEPT8 52,5 kDa. A distribuição de cada componente ao longo do pico foi avaliada por SDS-PAGE 10%. Observa-se que o pico de eluição da SEPT8 antecede o da SEPT3, que seria esperado pela sua massa molecular.

Figura 39 - Sobreposição do gráfico de eluição de SEPT3-SEPT8 em Superdex 200 e as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%. Em cada quadrado, a banda de cima corresponde a SEPT8 enquanto a banda de baixo corresponde a SEPT3. O gráfico está posicionado exatamente no ponto em que inicia a eluição da fração correspondente no gel mostrado abaixo dele. A fração marcada em vermelho indica aquela que foi também estudada por SEC-MALS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados para a cromatografia de exclusão molecular do complexo SEPT3-SEPT8 se assemelham muito com aquele encontrado para o complexo SEPT3-SEPT11 onde a massa molecular é superestimada para um monômero de qualquer uma das septinas e, ao mesmo tempo, subestimada para um dímero (93,9 kDa). A coeluição de SEPT8 com SEPT3 a partir da coluna de cobalto sugere uma interação direta entre as duas espécies e a massa molecular intermediária determinada por SEC inferior àquela esperada para um dímero levanta a possibilidade de haver um equilíbrio dinâmico entre monômeros e dímeros com troca rápida entre eles.

Uma das hipóteses levantadas em estudos anteriores afirma que septinas do grupo II estariam na forma dimérica (por exemplo, *SmSEPT10* de *Schistosoma mansoni* verificada por Zeraik (120)) quando não realizam contato com as suas septinas parceiras no filamento. Um pico mais largo indicaria, portanto, algo que possa ser tanto um complexo SEPT3-SEPT8 quanto um dímero SEPT8-SEPT8. No entanto, um caso de que existisse tanto SEPT8 monomérica quanto dimérica indicaria uma falha no sistema de purificação proposto. Uma vez que a SEPT8 que não associa a SEPT3, em teoria, não teria como se ligar à resina

TALON devido à ausência da extensão de histidina e, portanto, não faria sentido a sua eluição da coluna usando um tampão contendo 500 mM de imidazol. No caso ideal, toda proteína que não possui a extensão de histidinas deve estar presente apenas na fração não ligada da purificação em resina de afinidade ao cobalto. A presença de qualquer espécie de SEPT8 não associada a SEPT3 indica, portanto, um resultado falso-positivo.

A contra-prova realizada para verificar se a interação entre SEPT3-SEPT8 é real e não apenas fruto de uma interação promíscua entre SEPT8 e a resina da coluna, indicando um resultado falso-positivo, é a expressão de SEPT8 nativa, sem a extensão de histidinas, na ausência de SEPT3. Este processo foi realizado transferindo o gene da construção analisada para um novo vetor pETDuet-1. Neste caso, apenas o MCS2 estará expressando SEPT8 enquanto MCS1 está vazio. Esta construção foi chamada de SEPT8-MCS2 e, após uma expressão seguindo os mesmos moldes estabelecidos anteriormente, uma purificação em resina de afinidade a cobalto nos mostrou que SEPT8 não se liga à resina (Figura 40) e, portanto, a interação SEPT3-SEPT8 é aparentemente verdadeira.

Figura 40 - SDS-PAGE 10% das alíquotas de purificação em resina de afinidade ao cobalto para a construção SEPT8-MCS2. Legenda: 1 – Fração solúvel; 2 – Fração insolúvel; 3 – Fração não ligada à resina; 4 – Lavagem 0,1% Triton X-100; 5 – Lavagem 5 mM Imidazol; 6 – Eluição 500 mM Imidazol; 7 – Eluição 500 mM Imidazol; M – Marcador molecular Low Range (BioRad). A marcação em vermelho indica a linha onde SEPT8 deve estar localizada no gel.

Fonte: Elaborada pela autora.

Compreendido através do experimento de contra-prova que SEPT8 não realiza interações promíscuas com a resina TALON e desta forma, só está presente na eluição da purificação de SEPT3-SEPT8 devido a sua interação com SEPT3, continuamos os estudos estruturais da associação deste complexo.

O próximo passo do projeto foi usar as amostras do complexo purificado na resina de exclusão molecular Superdex 200 para estudos em SEC-MALS. Uma amostra correspondente à fração eluída em 16ml em 800 mM de NaCl (indicada com marca em vermelho na Figura 39) foi utilizada nesta análise. Ela foi concentrada até 3,6 mg/ml, centrifugada a $16.000 \times g$ durante 10 minutos para então ser analisada em SEC-MALS.

Conforme mostrado em Figura 41, três regiões do cromatograma SEC-MALS foram manualmente selecionadas para análise e os valores das massas moleculares estimadas são apresentadas na Tabela 18.

Figura 41 - Definição dos picos relativos às espécies de septina em solução para o complexo SEPT3-SEPT8. Curvas em vermelho correspondem ao espalhamento de luz (LS) enquanto aquelas em azul mostram o índice de refração diferencial (dRI). As linhas verticais indicam a escolha dos três picos para estudo da massa molecular.

Fonte: Elaborado pela autora.

As curvas de dRI e LS da Figura 41 mostra a cromatografia obtida para a amostra de SEPT3-SEPT8, a 800 mM de NaCl, estudada por SEC-MALS. Elas mostram 3 regiões de eluição de proteínas que foram selecionadas para a estimativa de massas moleculares presentes.

Tabela 18 - Resultados obtidos para os momentos de massa molecular presentes na amostra de SEPT3-SEPT8, analisada por SEC-MALS e calculadas pelo programa ASTRA 7. O valor de M_w corresponde à medida direta estimada pelo espalhamento de luz a cada instante de detecção enquanto M_n é uma função das menores massas presentes e M_z é uma função das maiores massas presentes.

	Pico I		Pico II		Pico II	
	Valor	Erro asociado (%)	Valor	Erro asociado (%)	Valor	Erro asociado (%)
Massa total estimada (μg)						
	0,13	-	5,06	-	0,95	-
Momentos de massa molar (kDa)						
M_n	214,2	8,5	49,9	1,8	61,2	9,5
M_w	215,3	8,5	53,0	1,6	61,3	9,4
M_z	216,6	19,2	56,5	3,5	61,5	21,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma visualização gráfica dos resultados obtidos para o estudo das massas moleculares estimadas em SEC-MALS para a amostra de SEPT3-SEPT8 é mostrada na Figura 42, onde cada ponto representa um instante de medida no aparelho.

Figura 42 - Gráficos de Massa *versus* Tempo para as amostras de SEPT3-SEPT8. As linhas contínuas mostram o padrão de cromatografia em espalhamento de luz a 90° (LS) enquanto os traçados grossos indicam o valor de massa molar estimada para a medida daquele ponto (traçado formado por pequenos quadrados).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 42 mostra, sobre cada um dos três picos, as massas molares encontradas a cada medida realizada. O Pico I aparentemente corresponde a agregados da ordem de 215

kDa, compatível com estruturas tetraméricas ou maiores. Os Picos 2 e 3 tem massas estimadas de 53 kDa e 61 kDa, respectivamente e, ainda, os erros associados a estas medidas (Pico 2: $\pm 1,6\%$; Pico 3: $\pm 9,4\%$) são razoáveis, considerando a instabilidade intrínseca do sistema em estudo sugerindo que correspondem a estimativas confiáveis das massas. Ao verificar um traço de massa molecular descendente para o Pico 2, vemos que o mesmo é iniciado em valores próximos a 100 kDa e diminui até cerca de 40 kDa. Isto novamente sugere a possibilidade de uma troca rápida entre dímeros e monômeros eluindo no mesmo pico com uma massa média de 49,9 kDa. No início do pico predominam dímeros enquanto no final são os monômeros que estão presentes em maior concentração. Além disso, a massa molecular estimada está entre os 41,5 kDa para SEPT3 e os 52,5 kDa para SEPT8, e sugere que existe uma predominância para a formação de monômeros nesta condição.

De modo geral, os resultados encontrados para o estudo do complexo SEPT3-SEPT8 através da cromatografia de exclusão por tamanho acoplado ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos indicam uma possível associação em forma de dímeros para o complexo SEPT3-SEPT8, mas a interação não é estável, pelo menos em tampão contendo 800mM de NaCl.

4.3 As interações não canônicas encontradas

Foi verificado, até o momento, que SEPT3 pode estabelecer interações não canônicas com septinas do grupo II. Entretanto, existe uma variação de afinidade entre estes complexos formados dentro do próprio grupo porque dentre as septinas do grupo II, SEPT10 e SEPT14 aparentemente não interagem com SEPT3 enquanto SEPT6 é capaz de formar oligômeros com a mesma. Interações fracas são observadas para SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11.

Compatível com este resultado, experimentos de Y2H conduzidos por Nakahira e Macedo,(72) apresentaram colônias para a formação de um complexo entre SEPT3-SEPT11 e SEPT3-SEPT6 enquanto o mesmo ensaio, conduzido por Sandroch,(20) captou além do complexo SEPT3-SEPT11, o complexo SEPT3-SEPT8. Adicionalmente, Hall (39) mostrou que a expressão tecidual de SEPT3, SEPT8_v2 (a mesma variante utilizada no presente estudo) e SEPT11 são expressas predominantemente no sistema nervoso central.

Podemos inferir dos dados aqui apresentados, em adição àqueles encontrados na literatura, que a interação SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11 pode possuir um fundamento fisiológico, uma vez que estas septinas possuem a mesma expressão tecido específica. Todavia, a instabilidade observada nestas interações levanta dúvidas sobre suas origens e,

ainda, a aparente sensibilidade a força iônica leva a suspeitas quanto à promiscuidade destas interações.

4.4 As propriedades de interação entre SEPT3-SEPT8

Por ser aquele em que mais experimentos foram realizados e ainda, por haver disponibilidade de septinas individuais expressas e purificadas, o complexo SEPT3-SEPT8 foi utilizado como modelo para averiguar a origem da interação de baixa afinidade encontrada.

A expressão e purificação para ambas as proteínas foram realizadas da mesma forma que os complexos, sendo seu tampão de purificação contendo cloreto de sódio a 500 mM.

A Figura 43 mostra o padrão de eluição da coluna Superdex 200 para SEPT3 e SEPT8 nativas, purificadas isoladamente.

Figura 43- Sobreposição do gráfico de eluição de SEPT3 e SEPT8, nativas, em Superdex 200 e as suas frações analisadas em SDS-PAGE 10%. O gráfico está posicionado exatamente no ponto em que inicia a eluição da fração correspondente no gel mostrado abaixo dele.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de massa molecular estimados correspondem a um valor maior do que aquele esperado para um monômero para SEPT3, mas o valor de 180 kDa para SEPT8 é muito acima do esperado tanto para um monômero (aproximadamente 50 kDa) ou um dímero (aproximadamente 100 kDa), como é descrito na Tabela 19, sugerindo a possibilidade de agregação.

Tabela 19 - Dados correspondentes aos picos de eluição de Superdex 200 10/300 para SEPT3 e SEPT8 purificadas isoladamente.

Identificação	Volume de Eluição (mL)	Kav	log MM	Massa Molecular (kDa)
SEPT3	16,10	0,4654	1,7594	57
SEPT8	13,58	0,2949	2,2568	180

Fonte: Elaborada pela autora

Dado este resultado inesperado para SEPT8, as massas moleculares para SEPT3 e SEPT8 foram novamente determinadas por ultracentrifugação analítica, como mostrado na Figura 44. Neste caso, também foi incluído na análise a SEPT8G, a construção contendo apenas o domínio G de SEPT8, que foi gentilmente cedida pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos.

Figura 44 - Gráficos de $c(s)$ versus coeficiente de sedimentação obtido através do programa Gussi. A análise foi realizada para SEPT3 e SEPT8 completas e purificadas separadamente e SEPT8G.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 20 é possível comparar os valores de coeficiente de sedimentação obtidos pelo experimento e os valores de massa molar calculados para cada uma das espécies de septinas estudadas.

Tabela 20 - Resultados obtidos para AUC de SEPT3, SEPT8 e SEPT8G separadamente.

Septina	f/f_0	$S_{20,w}$ (S)	MM (kDa)
SEPT3	1,2	3,78	46,5
SEPT8	1,5	3,66	61,2
SEPT8G	1,8	1,98	31,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nestes resultados, verificamos que os dados obtidos são compatíveis com espécies no estado monomérico quando elas são expressas individualmente, como é demonstrado pelo valor estimado da massa molar de 46,5 kDa para SEPT3 nativa (teórico: 41,4 kDa), 61,2 kDa para SEPT8 nativa (teórico: 52,5 kDa) e 31,2 kDa para a construção SEPT8G (teórico: 33,3 kDa). Além disso, no caso das septinas nativas, o valor da razão friccional (f/f_0) estão dentro da faixa de valores esperados para proteínas moderadamente globulares (entre 1,3 a 1,9), monodispersas e puras em análise de AUC. Entretanto, o valor de (f/f_0) encontrado para SEPT8G coloca em cheque a assimetria desta proteína. Para isso, utilizamos os dados de estabilidade desta proteína obtidos pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos.

Os resultados encontrados até agora revelam uma contradição. Ao passo que os dados da copurificação para o complexo SEPT3-SEPT8 sugerem uma associação, a ausência de um complexo equimolar estável sugere que esta interação seja fraca. Os dados de SEC e SEC-MALS convergem para a formação de um complexo dimérico entre SEPT3-SEPT8, mas mostrando também uma instabilidade na formação do mesmo. Por outro lado os dados de AUC sugerem que as espécies estejam monoméricas quando expressas individualmente. Se, de fato existe uma interação fraca entre SEPT3 e SEPT8, é interessante saber qual das duas interfaces esta sendo usada para a ligação.

4.4.1 As interfaces de interação entre SEPT3-SEPT8

Nas septinas, a interface NC é aquela mais sensível à presença de sais em seu meio. Os resíduos envolvidos nestas interações iônicas (principalmente ácido glutâmico e arginina) são também aqueles responsáveis pelas interações promíscuas entre septinas, caracterizados por Zent. (60-61)

Percebemos pelos resultados de purificação e SEC-MALS para o complexo SEPT3-SEPT8 que o aumento da concentração de cloreto de sódio no tampão da amostra favoreceu a

formação dos monômeros. Este fato indica que a interação pode acontecer pela interface NC e, ainda, apela para a promiscuidade da interação observada.

Por outro lado, o cenário idealizado para a interação entre SEPT3 e septinas do grupo II, e que fundamentou o presente estudo, é baseado na substituição da SEPT2 pela SEPT3 no filamento canônico, formando uma interface G entre SEPT3 e SEPTX (grupo II). Conforme já foi demonstrado por diversos trabalhos e ilustrado na introdução desta dissertação, para que haja a interação na interface G é necessária a presença de GDP ou GTP.(58,60-61,64)

Para verificar as possíveis interfaces de interação entre SEPT3 e SEPT8, examinamos qual era o conteúdo de nucleotídeos de cada espécie aqui estudada: SEPT3 e SEPT8 isoladas, SEPT8G e o complexo SEPT3-SEPT8 logo após a sua purificação por afinidade ao cobalto (Estágio 1) e após a sua eluição da Superdex 200 (Estágio 2). As concentrações iniciais de proteína são listadas na Tabela 21 enquanto as amostras tanto de GTP quanto GDP estavam a 50 μ M.

Tabela 21 - Concentrações das septinas analisadas por cromatografia de troca iônica (HPLC-DEAE). Os valores indicam a concentração aferida no momento em que estas proteínas são dialisadas no tampão do experimento.

Septina	Concentração antes da desnaturação (μM)
SEPT3 isolada	30
SEPT8 isolada	30
SEPT8G	40
SEPT3-SEPT8 (Estágio 1)	20
SEPT3-SEPT8 (Estágio 2)	20

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cromatogramas com leitura a 254 nm provenientes da eluição da coluna DEAE (usado para separar os nucleotídeos) para os monômeros de SEPT3 e SEPT8 nativas além de SEPT8G, são mostrados na Figura 45.

Figura 45 - Cromatograma de absorvância a 254 nm *versus* tempo de retenção para as espécies GTP, GDP, e para o sobrenadante após desnaturação por ácido perclórico de SEPT3, SEPT8 e SEPT8G

Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas indicam ausência de qualquer nucleotídeo ligado aos monômeros de septinas analisados, concordando com o observado anteriormente para SEPT3 e SEPT8G. Curiosamente, SEPT8 também não está associada ao GTP ou GDP. Inicialmente pensávamos que esta septina formaria homodímeros em solução, unindo-se pela interface G, como foi mostrado para SEPT10 de *Schistosoma mansoni* no trabalho de doutorado da Dra. Ana Elisa Zeraik, em 2013. (121) Posteriormente, estudos com as septinas humanas SEPT5 e SEPT8 realizados pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos mostraram que quando o domínio G de SEPT8 era expresso em conjunto com o domínio G de SEPT5, os mesmos eram eluídos em forma de um heterodímero estável SEPT5G-SEPT8G e, ainda, um excesso de SEPT8G era eluído em forma de monômeros *apo*, ou seja, monômeros que não possuíam GTP ou GDP associado. Ao observar que o dímero SEPT5G-SEPT8G era eluído contendo uma molécula de GDP e uma molécula de GTP, o doutorando elaborou a hipótese de que as septinas do grupo II (no caso, SEPT8) necessitam de uma septina parceira do heterofilamento canônico (no caso, SEPT5) para que a dimerização acontecesse, anulando a hipótese de que existam homodímeros de septinas do grupo II em uma situação fisiológica interagindo pela interface G. O argumento utilizado foi de que a ausência da treonina catalítica somada à ausência de 5 aminoácidos em *Switch I* além da mutação de uma prolina característica em *Switch II* para uma valina em septinas do grupo II podem ser responsáveis pela sua baixa

afinidade por nucleotídeos, afetando a sua associação em homodímeros. (93) Desta forma, SEPT8 é monomérica e *apo* quando expressa individualmente em células de *Escherichia coli*. Adicionalmente, estudos realizados com SEPT3 expressas em células bacterianas contendo apenas os domínios G e C-terminal, realizados pela Dra. Joci Neuby Alves Macedo em 2013, (81) mostraram que esta construção de SEPT3 era eluída na forma monomérica e *apo*.

Para o complexo SEPT3-SEPT8, utilizamos amostras provenientes dos dois estágios de purificação: estágio 1 - logo após a purificação por afinidade ao cobalto, estágio 2 - ao final da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Este processo foi realizado para mostrar se haveria a perda de nucleotídeo e dissociação em algum estágio do processo de purificação do complexo. É importante ressaltar que a amostra de SEC é feita unindo e concentrando todas as frações provenientes do Pico I, em 500 mM de cloreto de sódio.

Figura 46 - Gráfico de absorvância a 254 nm *versus* tempo de retenção para as espécies GTP, GDP, e para o sobrenadante após desnaturação por ácido perclórico do complexo SEPT3-SEPT8 em dois estágios de purificação. O estágio 1 corresponde à eluição da coluna de afinidade ao cobalto (TALON) enquanto o estágio 2 corresponde ao pico I de eluição do complexo em coluna de exclusão molecular Superdex 200, onde as frações do pico foram unidas e concentradas a 20 μ M para a execução do experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

A presença de dois picos não especificados no estágio 1 da purificação, a 2,68 min e 3,66 min respectivamente, mostram a presença de algum contaminante não esperado que

absorve luz a 264 nm. Além disso, o tempo de retenção é incompatível com qualquer um dos nucleotídeos de interesse.

Os gráficos da Figura 46 mostram que em nenhum dos estágios de purificação do complexo existe associação das proteínas a GDP ou GTP, sugerindo que estas proteínas não interagem pela interface G.

Confirmamos assim que SEPT3 e SEPT8G não estão ligadas a nucleotídeos após a purificação. De maneira interessante, também verificamos que SEPT3-SEPT8 coexpressas também não possuem nucleotídeos ligados, o que contradiz a hipótese de que seria necessária a ligação de nucleotídeo para que a interação SEPT3-SEPT8 aconteça e, portanto, podemos inferir dos dados aqui mostrados que a interação fraca observada por copurificação das duas septinas possivelmente aconteça pela interface NC.

4.5 A interação SEPT3-SEPT8 só acontece para as proteínas nativas

Para compreender quais os domínios eram essenciais para a formação de um complexo SEPT3-SEPT8, utilizamos duas abordagens para a reconstrução do complexo *in vitro*:

1 – SEPT3-SEPT8 nativas;

2 – SEPT3-SEPT8G, em que SEPT3 é a construção nativa e SEPT8G correspondem apenas ao domínio G de SEPT8.

Além disso, verificamos a influência da adição de GTP durante a execução destes experimentos, como uma forma de recuperar qualquer interação perdida devido à ausência do nucleotídeo.

4.5.1 Ultracentrifugação analítica

O resultado da análise de velocidade de sedimentação para a interação de SEPT3 com SEPT8, ambas em sua construção nativa e sem adição de nucleotídeos, mostra uma tendência a interagir acontecendo a partir da concentração 13,1 μM , onde vemos um deslocamento do valor da coeficiente de sedimentação. A Figura 47 mostra as curvas obtidas para este experimento.

Figura 47 - Interação entre SEPT3 e SEPT8 analisada pela ultracentrifugação analítica, sem adição de GTP. As concentrações indicadas correspondem à mistura equimolar das moléculas parceiras. Uma situação de equilíbrio entre monômeros é vista nas concentrações de 3,5 e 6,5 μM . Um deslocamento deste equilíbrio é visível a 13,1 μM e, finalmente a 14,7 μM acontece a divisão em dois picos de sedimentação.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 22 indica os valores de coeficiente de sedimentação encontrados para o estudo de oligomerização de SEPT3-SEPT8, na ausência de GTP, utilizando ultracentrifugação analítica.

Tabela 22 - Resultados obtidos por ultracentrifugação analítica para a associação de SEPT3 com SEPT8, na ausência de GTP, em frações equimolares.

Concentração (μM)	f/f_0	$S_{20,w}$ (S)	MM (kDa)
3,4	2,0	2,43	50,5
6,5	1,9	2,66	52,4
13,1	2,0	2,68	57,9
14,7	2,0	2,15	43,3
		3,11	75,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores obtidos para coeficientes de sedimentação das misturas equimolares de SEPT3 e SEPT8, sem a adição de nucleotídeos, são compatíveis com uma mistura de monômeros entre as concentrações 3,5 a 6,5 μM com um leve deslocamento a partir de 13,1 μM , onde verifica-se a formação de um pico correspondente uma espécie de 57,9 kDa. A partir da concentração de 14,7 μM , notamos uma divisão para dois picos, um de coeficiente de sedimentação menor do que aquele observado para as três primeiras concentrações e outro,

de coeficiente de sedimentação maior, sugerindo a formação de algo parecido com um dímero.

Considerando-se o aumento da massa molecular estimada para o segundo pico na concentração de 14,7 μM há a possibilidade da formação de um dímero de baixa afinidade entre SEPT3 e SEPT8. Mas ao verificar os coeficientes de sedimentação encontrados, vemos que apesar da massa calculada pelo programa Sedfit indicar uma possível dimerização, os valores de coeficientes de sedimentação em si ainda são bastante próximos ao encontrados experimentalmente para os monômeros de SEPT3 e SEPT8, contradizendo a hipótese de um dímero em formação. Sabendo que a massa molecular é determinada com base nos valores de coeficiente de sedimentação e na razão friccional obtidos para cada concentração analisada e ainda que o coeficiente friccional, ao considerar todas as espécies em solução acaba acumulando as incertezas na determinação dos parâmetros físicos envolvidos, é razoável entender que as massas estimadas são imprecisas e provavelmente superestimadas.(112) Mesmo considerando que existe uma associação, valores em torno de dezenas de micromolar para a associação entre proteínas é algo incoerente com aquele esperado para um ambiente fisiológico.(122) Portanto, esta interação talvez seja do tipo não específica e sem importância para o sistema fisiológico.

4.5.2 Termoforese em microescala

Para a determinação da constante de dissociação através da termoforese em microescala para o complexo SEPT3-SEPT8, utilizamos a mesma abordagem realizada para a ultracentrifugação analítica. Inicialmente, tanto SEPT3 quanto SEPT8 inteiras foram marcadas com o fluoróforo NHS-RED (Nanotemper) para que fosse possível a validação de resultados. Sendo assim, o primeiro experimento analisou a interação entre SEPT3 marcada e SEPT8 não marcada em uma diluição seriada (que será mostrada como um conjunto de dados em verde) enquanto o segundo experimento estudou SEPT8 marcada e SEPT3 não marcada em uma diluição seriada (que será mostrado como um conjunto de dados em vermelho).

Na Figura 48 vemos as curvas de interação entre SEPT3 e SEPT8 no experimento de termoforese. Vemos que com o aumento da concentração de ligante titulado também acontece o aumento da fluorescência relativa, o que indica claramente a interação entre as moléculas parceiras. No entanto, não existe a mesma variação de fluorescência entre as curvas verdes e vermelhas e isso acontece devido ao tamanho das moléculas marcadas. SEPT3 possui cerca

de 40 kDa e está interagindo com uma proteína maior que ela, gerando uma variação de movimento aparente maior do que no caso de SEPT8 marcada, que possui cerca de 50 kDa e interage com SEPT3. De qualquer forma, os dados são suficientes para estabelecer a constante de dissociação através da desconvolução pela equação dose-resposta, mostrada na Figura 49.

As curvas que apresentaram pequenos desvios mostram que naquele capilar em específico havia um processo de agregação e por isso foi excluído da análise e estão mostrados em cor cinza nos gráficos de fluorescência relativa *versus* tempo e de fração ligada *versus* concentração de ligante.

Figura 48 - Sobreposição das curvas de fluorescência relativa *versus* tempo para a formação do complexo SEPT3-SEPT8. Cada curva representa um capilar analisado, ou seja, uma determinada concentração do ligante não marcado. Em verde são mostradas as curvas obtidas quando SEPT3 é marcada enquanto em vermelho são mostradas as curvas para SEPT8 marcada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar dos erros associados ao experimento, verificamos que houve a validação de um resultado com o outro, tendo encontrado valores muito próximos ($K_D \cong 20 \mu M$) independente da molécula marcada usada. É importante frisar que existem dois métodos de análise da termoforese: pela termoforese apenas e pela termoforese + T-jump. Geralmente, são usados os dados de termoforese + T-jump para a determinação da constante de dissociação por ser um conjunto de dados que contempla o início imediato do experimento, observando o comportamento das moléculas desde o exato momento em que se liga o *laser* infravermelho (T-jump) até o estado de equilíbrio (termoforese).

Figura 49 - Sobreposição das curvas de fração ligada *versus* concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8. Cada ponto representa um capilar analisado, ou seja, uma determinada concentração do ligante não marcado. Em verde são mostradas as interações SEPT3-marcada com SEPT8 titulada e em vermelho são mostradas as curvas de SEPT8-marcada com SEPT3 titulada. Os pontos em cinza são *outliers* e não são utilizados no cálculo da constante de dissociação pelo programa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados referentes ao ajuste realizado pelo programa NTAffinity Analysis são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23 - Dados de ajuste para a formação do complexo SEPT3-SEPT8 utilizando NTAffinity Analysis para Termoforese com T-jump. Estes estudos foram conduzidos na ausência de GTP.

	SEPT3 marcada – SEPT8	SEPT8 marcada – SEPT3
Cor do Gráfico	Verde	Vermelho
K_D (μ M)	16,3	28,4
Conc. Molécula Marcada (nM)	100	100
Fração Ligada	0,89	0,81
Fração Não Ligada	0,84	0,79
Desvio Padrão (nM)	1,66	1,03

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 49 mostra as curvas para determinação das constantes de dissociação entre SEPT3 e SEPT8 no experimento de termoforese. As curvas obedecem aos mesmos padrões de cores que a Figura 48. Vemos que não foi possível chegar a um platô para esta interação, uma vez que a concentração necessária para isso era muito alta (próxima a milimolar), o que impossibilitaria o experimento por exigir uma concentração muito acima do suportado pelas proteínas em questão. Apesar disso, os valores máximos são muito próximos ao equivalente a 100% da fração ligada e é possível traçar um K_D , que aqui é dado por 16,3 μ M ($\sigma = 1,65$ nM)

para a interação SEPT3 marcada com SEPT8 e de 28,4 μM ($\sigma = 1,03 \text{ nM}$) para SEPT8 marcada com SEPT3, com σ representando o erro da regressão linear associado à curva. Vemos, portanto, que existe uma concordância entre os valores de constante de dissociação observados para ambos os experimentos, cerca de 20 μM .

Para verificar se ao retirar o T-jump da análise restringiram-se os erros e haveria maior concordância entre os valores de K_D , formulamos uma nova curva mostrada Figura 50.

Figura 50 - Curvas de fração ligada *versus* concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8. Cada ponto representa um capilar analisado, ou seja, uma determinada concentração do ligante não marcado. Nenhum nucleotídeo foi adicionado nesta análise.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados para o ajuste da constante de dissociação do estudo de ligação entre SEPT3 e SEPT8 para apenas a região de termoforese estão listados na Tabela 24.

Tabela 24 - Dados de ajuste para a formação do complexo SEPT3-SEPT8 utilizando NTAffinity Analysis para apenas Termoforese. Estes estudos foram conduzidos na ausência de GTP.

	SEPT3 marcada – SEPT8	SEPT8 marcada – SEPT3
Cor do Gráfico	Verde	Vermelho
K_D (μM)	19,66	18,60
Conc. Molécula Marcada (nM)	100	100
Fração Ligada	0,94	0,87
Fração Não Ligada	0,90	0,87
Desvio Padrão (nM)	1,58	1,01

Fonte: Elaborada pela autora.

É notável que, ao retirar os parâmetros de T-jump da análise, houve uma sobreposição das curvas de K_D , resultando em valores mais concordantes. Isto acontece porque o T-jump leva em consideração as alterações sofridas pelo próprio fluoróforo quando o *laser* infravermelho é incidido na amostra e, predominantemente, mostra informações sobre associações imediatas e inespecíficas do fluoróforo com o ambiente, o que pode adicionar erros à medida. (109) Portanto, ao retirar a influência do T-jump, temos que para SEPT3 marcada o valor calculado para constante de dissociação foi de 19,6 μM enquanto para SEPT8 marcada tivemos o valor de constante de dissociação de 18,6 μM . Entretanto, os erros associados à medida continuaram os mesmos.

Para verificar quais são os responsáveis pela interação entre SEPT3 e SEPT8, utilizamos a construção com apenas o domínio G de SEPT8 (SEPT8G) para verificar se existia uma repetição no padrão de interação. Neste caso, adicionamos GTP três vezes mais concentrado à primeira concentração da diluição seriada da septina não marcada e verificamos a termoforese repetindo aproximadamente as mesmas concentrações que as utilizadas na análise das septinas completas.

A Figura 51 ilustra as curvas de interação para SEPT8G marcada com duas diluições seriadas de SEPT3 não marcada, que são diferenciadas pela cor. A primeira análise, partindo de uma concentração de 40 μM de SEPT3 é mostrada em vermelho enquanto em verde vemos a interação a partir de 100 μM na diluição seriada de ligante.

Figura 51 - Curvas de interação para SEPT8G marcada com SEPT3, com adição de GTP em 3x de excesso. As cores diferenciam a primeira da a segunda diluição seriada de SEPT3 – curvas verdes partem de 40 μM e as curvas vermelhas partem de 100 μM .

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas em cinza foram excluídas por apresentar sérios *outliers*. Apesar disso, vemos que existe uma sobreposição bem demarcada das curvas de fluorescência relativa, indicando que não houve variação de termoforese entre os capilares de diferentes concentrações de ligante e, portanto, não houve interação. Por este motivo, ao analisar os dados no software NTAffinity Analysis, o próprio programa não conseguiu fazer o ajuste para o K_D , como observamos na Figura 52.

Figura 52 - Gráfico de fração ligada *versus* concentração de ligante para o complexo SEPT3-SEPT8G, com adição de GTP em excesso. Cada ponto representa uma concentração da diluição seriada de ligante.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos para a interação entre SEPT3 e SEPT8G por termoforese em microescala indicam que, ao restringir SEPT8 a apenas o seu domínio G, houve perda de afinidade entre estas proteínas, sugerindo que a associação SEPT3-SEPT8 ocorra com participação dos N- e C-terminais.

O valor de K_D encontrado por termoforese em microescala para o complexo SEPT3-SEPT8 em sua construção inteira concordam com os dados obtidos para a formação do complexo em ultracentrifugação analítica, estando próximos a 20 μ M. Em contrapartida, estudos com os C-terminais de septinas do grupo II (ao qual SEPT8 pertence) sugerem que estes domínios sozinhos já apresentem uma afinidade da ordem de nanomolar na sua heterodimerização com SEPT7, uma interação canônica. (71,123) O confronto destes números, nos leva a acreditar que a interação vista entre SEPT3 e SEPT8 provavelmente não tem relevância fisiológica pela sua baixa afinidade eventualmente sendo apenas uma interação

promíscua vista em altas concentrações. Vale lembrar que interações promíscuas já foram descritas nas estruturas de diversas septinas quando cristalizadas isoladamente.

4.6 Repensando a interação entre SEPT3 e as septinas do grupo II

O processo de interação entre SEPT3 e as septinas SEPT8 e SEPT11, aparentemente, não acontece de forma estável e possui baixa afinidade, indicando a possibilidade de que estes dímeros não sejam encontrados fisiologicamente. Buscando entender os resultados contraditórios aqui encontrados, lançamos mãos a ferramentas estruturais e computacionais que mostrassem uma explicação mais plausível.

4.7 As diferenças estruturais existentes entre SEPT3 e SEPT9

No filamento canônico descrito por Sirajuddin, (64) SEPT2 interage com SEPT6 pela interface G estando associado a uma molécula de GDP enquanto SEPT6 está ligada a GTP. Considerando apenas a estrutura altamente conservada do domínio GTPásico das septinas e ainda a taxa de conversão de GDP/GTP das septinas do grupos I e II, a hipótese de substituição de SEPT2 por SEPT3 na formação de um filamento não canônico se mostrou inicialmente razoável. A partir de 2016, as estruturas dos domínios G de SEPT3 e SEPT9 a alta resolução foram disponibilizadas no PDB. Utilizando elas, foi possível fazer uma comparação entre estas estruturas cristalográficas com domínio G de SEPT2, fazendo a sua sobreposição pelo programa Chimera (Figura 53), onde podemos verificar uma alta conservação de estrutura terciária.

Figura 53 - Alinhamento dos domínios G das septinas SEPT2 (vermelho), SEPT3 (verde) e SEPT9 (ciano) realizado pelo programa Chimera. A molécula de GTP γ S é mostrada em rosa (para SEPT3 e SEPT9) e em laranja (para SEPT2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os motivos necessários para a coordenação do GTP são conservados contendo apenas algumas regiões de *loop* diferenciadas entre as septinas investigadas, como é possível notar pelas flechas denotadas na Figura 53. Embora a sobreposição entre SEPT3 (em verde) e SEPT9 (em ciano) seja bastante significativa, quando as comparamos com SEPT2 (em vermelho) notamos duas regiões de *loop* que compreendem a região entre G3 e G4 deslocadas em relação a SEPT3 e SEPT9. Apesar disso, a ligação de nucleotídeos não é prejudicada, indicando que este não deve ser um motivo para a ausência de interação pela interface G.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que, no mínimo, SEPT3 não dimeriza com septinas do grupo II de maneira estável. Esta conclusão, por si só, contradiz a hipótese de que septinas do grupo I possam substituir septinas do grupo III no filamento canônico. Entretanto, como os mesmos testes não foram realizados para os outros dois membros do grupo I (SEPT9 e SEPT12), não é possível fazer uma generalização. Adicionalmente, ao compararmos a sequência de aminoácidos de todas as septinas do grupo I, verificamos uma diferença substancial entre elas: a existência de um N-terminal expressivamente maior para SEPT9.

Até hoje, as interações encontradas entre septinas do grupo I e septinas do grupo II mais representativas envolvem majoritariamente a SEPT9. (20,70,72) Comparativamente, os resultados de duplo-híbrido mostraram que SEPT3 formaram menor número de colônias não

canônicas em comparação a SEPT9. (72) Ainda assim, devido à ausência de um *coiled-coil* em seu C-terminal, a lógica para interação observada para as septinas nos levou a acreditar que uma interação entre duas septinas que não apresentem uma estrutura para formação de *coiled-coil* seja pela sua interface G. Porém, tanto no estudo de triplo-híbrido conduzido por Sandrock (20) quanto no isolamento do filamento SEPT7/9b/11 encontrado por Nagata, (70) os autores concordam que a interação não-canônica deve acontecer na interface NC, hipotizando que o longo N-terminal possa mimetizar uma estrutura em *coiled-coil*.

Observando que SEPT3 possui alta similaridade com o domínio G das septinas do grupo I, podemos inferir que os resultados aqui apresentados para interação não-canônica entre SEPT3 e septinas do grupo II indicam a inexistência de uma interface G para uma possível associação. No entanto, como SEPT3 não possui nenhuma extensão em N- ou C-terminal expressiva e não podemos deixar de considerar a hipótese de que haja uma interação na interface NC, que apenas seria possível com SEPT9.

CONCLUSÕES

“Todos os animais são iguais, mas alguns são mais iguais do que outros”

(George Orwell)

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados experimentais mostrados neste trabalho, podemos concluir que SEPT3 não interage com as septinas SEPT10 e SEPT14 em experimentos de coexpressão em células bacterianas e que SEPT6 apresenta padrões de agregação com SEPT3 conforme a força iônica do meio em que estão inseridas. Entretanto, SEPT3 e as septinas SEPT8 e SEPT11 coeluíram na purificação por afinidade ao cobalto, indicando a existência de um complexo SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11. Mesmo assim, os dois componentes do complexo não estão presentes em concentrações estequiométricas avaliando pelas intensidades relativas das bandas no gel de SDS-PAGE. Seguindo o mesmo protocolo mas expressando e purificando apenas SEPT8 analisamos que a sua coeluição com SEPT3 não é resultado de uma interação não-específica com a resina de cobalto. Conclui-se que a explicação mais provável é uma interação direta entre as duas septinas mas de baixa afinidade.

Uma análise do conteúdo de nucleotídeos contido no complexo SEPT3-SEPT8 mostrou que não existem moléculas de GTP ou GDP ligadas a ele após nenhum dos estágios de sua purificação. Este resultado sugere que a interface G não seja importante para a formação do heterocomplexo.

As estimativas de massa molecular realizadas por SEC-MALS indicaram uma instabilidade na formação dos complexos SEPT3-SEPT8 e SEPT3-SEPT11. Estas observações podem ser o resultado de interações promíscuas de baixa afinidade como visto em várias estruturas cristalográficas do domínio G de diversas septinas. Somado a isso, a determinação da constante de dissociação para o dímero SEPT3-SEPT8 realizada por termoforese em microescala indicou valores próximos a 20 μ M. Um valor de dezenas de micromolar pode não ser relevante fisiologicamente porque já foi observado que a interação entre os domínios de *coiled-coils* para SEPT7 (uma septina ubíqua) e septinas do grupo II possui constante de dissociação da ordem de nanomolar. Por outro lado, vale lembrar que aqui a interação entre duas septinas está sendo estudada na ausência dos demais componentes do heterocomplexo. Assim, é possível imaginar que uma eventual interface entre septinas dos grupos I e II no contexto do heterofilamento completo seja mais estável do que quando estudado isoladamente. Neste sentido, é pertinente lembrar que estudos *Sm*SEPT10 (68) e SEPT2 humana (58) revelaram comunicação entre interfaces consecutivas ao longo do filamento em função da hidrólise de GTP. Portanto, é possível imaginar que a estabilidade de

uma interface qualquer possa ser influenciada pela presença de outros septinas componentes do heterocomplexo mesmo se estes não façam contato direto.

Apesar dos nossos resultados mostrarem que é pouco provável uma interação direta e fisiologicamente relevante entre SEPT3 e septinas do grupo II, isto não significa que nenhum dos membros do grupo I seja capaz de realizar tal interação. Retrospectivamente pode não ter sido a melhor escolha ter optado em concentrar os estudos na SEPT3. Originalmente esta decisão foi tomada baseada na proposta explicitada na Figura 11 onde se previa uma interação entre membros dos grupos I e II por meio de uma interface tipo G. Sendo assim, a falta de um domínio N-terminal grande, como é o caso da SEPT3, parecia irrelevante. Por outro lado várias das interações não canônicas relatadas na literatura envolvem SEPT9, o que levanta a possibilidade de um comportamento diferenciado entre integrantes do grupo I. Eventualmente o domínio N-terminal da SEPT9, que na sua isoforma v1 é a maior de todas as septinas humanas, pode ser relevante para a formação de interações não canônicas. Se for assim, SEPT3, por ter um domínio N-terminal pequeno, não representaria um bom modelo para o estudo destas interações.

Nosso trabalho discute a relevância de combinações não canônicas de septinas na formação de filamentos fisiológicos. Neste sentido, é interessante notar que uma combinação não canônica relatada anteriormente (SEPT3,5,7) (124) foi recentemente questionada, argumentando que provavelmente a presença da SEPT6 no complexo passou inicialmente despercebida. (81) A combinação resultante, das septinas 3, 5, 6 e 7 volta a ser canônica. (77) Portanto, esperamos que o nosso trabalho sirva para motivar estudos futuros sobre as combinações das 13 septinas humanas que são realmente relevantes para o desempenho de funções fisiológicas, sejam elas canônicas ou não.

“Se tento descrevê-lo aqui, é justamente porque não o quero esquecer. É triste esquecer um amigo. Nem todo o mundo tem amigo. E eu corro o risco de ficar como as pessoas grandes, que só se interessam por números.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 2 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends in Cell Biology*, v. 9, n. 10, p. 387–394, 1999.
- 3 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*, v. 69, n. 2, p. 265–276, 1971.
- 4 BYERS, B. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, v. 69, n. 3, p. 717–721, 1976.
- 5 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, v. 77, n. 3, p. 371–379, 1994.
- 6 FARES, H.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R. Localization and possible functions of drosophila septins. *Molecular Biology of the Cell*, v. 6, n. 12, p. 1843–1859, 1995.
- 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 O'NEILL, R. S.; CLARK, D. V. The drosophila melanogaster septin gene Sep2 has a redundant function with the retrogene Sep5 in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. *Genome*, v. 56, n. 12, p. 753–758, 2013.
- 9 O'NEILL, R. S.; CLARK, D. V. Evolution of three parent genes and their retrogene copies in *Drosophila* species. *International Journal of Evolutionary Biology*, v. 2013, p. 693085, 2013. doi: 10.1155/2013/693085.
- 10 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.
- 11 ADAM, J. C.; PRINGLE, J. R.; PEIFER, M. Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, n. 9, p. 3123–3135, 2000.
- 12 MACARA, I. G. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111–4113, 2002.
- 13 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, n. 1, p. 103, 2007.
- 14 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biological Chemistry*, v. 392, p. 681–687, 2011. doi:10.1515/BC.2011.086.

- 15 YAMAZAKI, T. et al. Localization and evolution of septins in algae. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, v. 74, n. 4, p. 605–614, 2013.
- 16 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.
- 17 KINOSHITA, M. The septins. *Genome Biology*, v. 4, n. 11, p. 236, 2003.
- 18 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003.
- 19 RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Septin genomics: a road less travelled. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 763-767, 2011.
- 20 SANDROCK, K. et al. Characterization of human septin interactions. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 751-761, 2011.
- 21 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012. doi: 10.1038/nrm3284
- 22 KINOSHITA, M. ; NODA, M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Structure and Function*, v. 26, n. 6, p. 667–670, 2001.
- 23 DOLAT, L.; SPILIOTIS, E. T. Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion. *Journal of Cell Biology*, v. 214, n. 5, p. 517–527, 2016.
- 24 CAUDRON, F.; BARRAL Y. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Developmental Cell*, v. 16, n. 4, p. 493–506, 2009.
- 25 SHEN, Y-R. et al. SEPT12 phosphorylation results in loss of the septin ring/sperm annulus, defective sperm motility and poor male fertility. *PLoS Genetics*, v. 13, n. 3, p. e1006631. doi: 10.1371/journal.pgen.1006631.
- 26 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, v. 9, n. 24. p. 1458–1467, 1999.
- 27 BARRET, C. et al. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding site in the NH2-terminal domain of Ezrin correlates with its altered cellular distribution. *Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 5, p. 1067–1080, 2000.
- 28 RAUCHER, D. et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, v. 100, n. 2, p. 221–228, 2000.
- 29 FINGER, F. P. One ring to bind them. septins and actin assembly. *Developmental Cell*, v. 3, n. 6, p. 761–763, 2002.

- 30 KINOSHITA, M. et al. Self-and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell*, v. 3, n. 6, p. 791–802, 2002.
- 31 SMITH, C. et al. Septin 9 exhibits polymorphic binding to F-actin and inhibits myosin and cofilin activity. *Journal of Molecular Biology*, v. 427, n. 20, p. 3273–3284, 2015.
- 32 SILVERMAN-GAVRILA, R. V.; SILVERMAN-GAVRILA, L. B. Septins: new microtubule interacting partners. *Scientific World Journal*, v. 8, p. 611–620, 2008. doi: 10.1100/tsw.2008.87.
- 33 SPILIOTIS, E. T.; KARASMANIS, E. P.; DOLAT, L. Fluorescence microscopy of actin- and microtubule-associated septins in mammalian cells. *Methods in Cell Biology*, v. 136, p. 243–268, 2016. doi: 10.1016/bs.mcb.2016.03.014.
- 34 MENON, M. B.; GAESTEL, M. Sep(t)arate or not - how some cells take septin-independent routes through cytokinesis. *Journal of Cell Science*, v. 128, n. 10, p. 1877–1886, 2015.
- 35 FOUNOUNOU, N.; LOYER, N.; LE BORGNE, R. Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Developmental Cell*, v. 24, n. 3, p. 242–255, 2013.
- 36 SELLIN, M. E.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 10, p. 1594–1607, 2014.
- 37 HERNANDEZ-RODRIGUEZ, Y.; HASTINGS, S.; MOMANY, M. The septin AspB in aspergillus nidulans forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryotic Cell*, v. 11, n. 3, p. 311–323, 2012.
- 38 VERSELE, M. Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in saccharomyces cerevisiae. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 10, p. 4568–4583, 2004.
- 39 HALL, P. A. et al. Expression profiling the human septin gene family. *Journal of Pathology*, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.
- 40 DOLAT, L.; HU, Q.; SPILIOTIS, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological Chemistry*, v. 395, n. 2, p. 123–141, 2014.
- 41 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012.
- 42 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.
- 43 KIM D. S. et al. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. *Neoplasia*, v. 6, n. 2, p. 168–178, 2004.

- 44 PETERSON, E. A. et al. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mammalian Genome*, v. 18, n. 11, p. 796-807, 2007.
- 45 TAKEHASHI, M. et al. Expression of septin 3 isoforms in human brain. *Gene Expression*, v. 11, n. 5-6, p. 271-278, 2004.
- 46 MARTTINEN, M. et al. Synaptic dysfunction and septin protein family members in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*, v. 10, p. 16, 2015. doi: 10.1186/s13024-015-0013-z.
- 47 RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Do septins have a role in cancer? *British Journal of Cancer*, v. 93, n. 5, p. 499-503, 2005.
- 48 LOFTON-DAY, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical Chemistry*, v. 54, n. 2, p. 414-423, 2008.
- 49 BEHROUZ SHARIF, S. et al. Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker. *Oncology Letters*, v. 12, n. 6, p. 5335-5343, 2016. doi:10.3892/ol.2016.5327.
- 50 DEVOS, T. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 7, p. 1337-1346, 2009.
- 51 LAM, K. et al. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: a systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - reviews on cancer*, v. 1866, n. 2, p. 106-120, 2016
- 52 MITCHELL, S. M. et al. Evaluation of methylation biomarkers for detection of circulating tumor DNA and application to colorectal cancer. *Genes*, v. 7, n. 12, p. 125, 2016. doi: 10.3390/genes7120125.
- 53 GYPARAKI, M.-T.; BASDRA, E. K.; PAPA VASSILIOU, A. G. DNA methylation biomarkers as diagnostic and prognostic tools in colorectal cancer. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, n. 11, p. 1249-1256, 2013.
- 54 HEICHMAN, K. A. Blood-based testing for colorectal cancer screening. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 18, n. 2, p. 127-135, 2014
- 55 BRIDGES, A. A. et al. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 6, p. 2146-2151, 2014.
- 56 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
- 57 WITTINGHOFER, A.; VETTER, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual Review of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 943-971, 2011. doi: 10.1146/annurev-biochem-062708-134043.

- 58 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 16592–16597, 2009. doi: 10.1073/pnas.0902858106
- 59 HEIN, C.; WITTINGHOFER, A.; DÖTSCH, V. How to switch a master switch. *eLife*, v. 2, p. e01159, 2013. doi: 10.7554/eLife.01159
- 60 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, p. 791-797, 2011. doi: 10.1515/BC.2011.082.
- 61 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biological Chemistry*, v. 395, n. 2, p. 169-180, 2014. doi: 10.1515/hsz-2013-0268.
- 62 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, 2011. doi: 10.1515/BC.2011.086.
- 63 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.
- 64 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, n. 7160, p. 311–315, 2007.
- 65 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- 66 VRABIOIU, A. M. et al. The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 4, p. 3111–3118, 2004.
- 67 ABBEY, M. et al. GTPase domain driven dimerization of SEPT7 is dispensable for the critical role of septins in fibroblast cytokinesis. *Scientific Reports*, v. 6, p. 2007, 2016. doi: 10.1038/srep20007.
- 68 ZERAIK, A. E. et al. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 11, p. 7799-7811, 2014.
- 69 KIM, M. S. et al. Uncovering principles that control septin-septin interactions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 36, p. 30406–13, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.387464.
- 70 NAGATA, K.-I. et al. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 53, p. 55895–55904, 2004.
- 71 SALA, F. A. et al. Heterotypic coiled-coil formation is essential for the correct assembly of the septin heterofilament. *Biophysical Journal*, v. 111, n. 12, p. 2608–2619, 2016.
- 72 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. *PLoS One*, v. 5, n. 11, p. e13799, 2010.

- 73 KIM, M. S. et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *Journal of Cell Biology*, v. 195, n. 5, p. 815–826, 2011.
- 74 BLÄSER, S. et al. Human endothelial cell septins: SEPT11 is an interaction partner of SEPT5. *Journal of Pathology*, v. 210, n. 1, p. 103–110, 2006.
- 75 BLÄSER, S. et al. Human septin-septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. *FEBS Letters*, v. 519, n. 1-3, p. 169–172, 2002.
- 76 BLÄSER, S. et al. The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 91, n. 5, p. 959–966, 2004.
- 77 SELLIN, M. E. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Molecular Biology of the Cell*, v. 22, n. 17, p. 3152–3164, 2011.
- 78 BERTIN, A. et al. Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 24, p. 8274–8279, 2008.
- 79 BARRAL, Y.; KINOSHITA, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 20, n. 1, p. 12–18, 2008.
- 80 SERRÃO, V. H. B. et al. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Letters*, v. 585, n. 24, p. 3868–3873, 2011.
- 81 MACEDO, J. N. A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. *Biochemical Journal*, v. 450, n. 1, p. 95–105, 2013.
- 82 SILVA, S. M O. *Estudos de aspectos estruturais importantes na montagem de filamentos de septinas humanas*. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 83 DING, X. et al. GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. *Molecules and Cells*, v. 25, n. 3, p. 385–389, 2008.
- 84 DING, X. et al. SEPT12 Interacts with SEPT6 and this interaction alters the filament structure of SEPT6 in hela cells. *BMB Reports*, v. 40, n. 6, p. 973–978, 2007.
- 85 XUE, J. Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 14, p. 10047–10056, 2000.
- 86 XUE, J. et al. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, v. 91, n. 3, p. 579–590, 2004.
- 87 TAKAHASHI, S. et al. Isolation and expression of a novel mitochondrial septin that interacts with CRMP/CRAM in the developing neurones. *Genes Cells*, v. 8, n. 2, p. 81–93, 2003.

- 88 MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, v. 53, n. 1, p. 159–162, 1970.
- 89 LENNOX, E. S. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, v. 1, n. 2, p. 190–206, 1955.
- 90 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- 91 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001.
- 92 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- 93 CABREJOS, D. A. L. *Especificidade na montagem dos filamentos de septina: o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8*. 2016. 146 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 94 BLOBEL, J. et al. Protein tyrosine phosphatase oligomerization studied by a combination of ¹⁵N NMR relaxation and ¹²⁹Xe NMR. effect of buffer containing arginine and glutamic acid. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 18, p. 5946–5953, 2007
- 95 GEL FILTRATION CALIBRATION. *Kit LMW*. Disponível em: <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdoc28407384_20161014090015.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2017.
- 96 STRUTT, J. W. On the light from the sky, its polarization and colour. *Philosophical Magazine Series 4*, v. 41, n. 271, p. 107–120, 1871.
- 97 TARAZONA, M. P.; SAIZ, E. Combination of SEC/MALS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 56, n. 1-3, p. 95–116, 2003.
- 98 STRUTT, J. W. On the scattering of light by small particles. *Philosophical Magazine Series 4*, v. 41, n. 275, p. 447–454, 1871.
- 99 WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, v. 272, n. 1, p. 1–40, 1993.
- 100 ZIMM, B. H. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, v. 16, n. 12, p. 1093–1099, 1948.
- 101 ZIMM, B. H. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *Journal of Chemical Physics*, v. 16, n. 12, p. 1099–1116, 1948.
- 102 WYATT TECHNOLOGY CORPORATION. Size exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection (SEC-MALS). In: *Light Scattering University* 2016. Santa Barbara, Califórnia, USA.

- 103 SECKLER, R.; WU, G. M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene) diphosphate. formation and assembly of a stoichiometric complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 13, p. 7655–7661, 1990.
- 104 PLATTEN, J. K.; COSTESÈQUE, P. Charles Soret: a short biography: on the occasion of the hundredth anniversary of his death. *European Physical Journal E*, v. 15, n. 3, p. 235–239, 2004.
- 105 RAHMAN, M. A.; SAGHIR, M. Z. Thermodiffusion or Soret effect: historical review. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 73, p. 693–705, 2014. doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2014.02.057
- 106 DE GROOT, S. R.; MAZUR, P.; CHOI, S. Non-equilibrium thermodynamics. *Physics Today*, v. 16, n. 5, p. 70–71, 1963.
- 107 DUHR, S.; BRAUN, D. Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution. *Physical Review Letters*, v. 96, n. 16, p. 168301, 2006.
- 108 DUHR, S.; BRAUN, D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 52, p. 19678–19682, 2006.
- 109 JERABEK-WILLEMSSEN, M. et al. Microscale thermophoresis: interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, v. 1077, p. 101–113, 2014. doi: 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
- 110 WIENKEN, C. J. et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications*, v. 1, p. 100, 2010. doi: 10.1038/ncomms1093.
- 111 SEIDEL, S. A. I. et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, v. 59, p. 301–315, 2013. doi: 10.1016/j.jymeth.2012.12.005.
- 112 EDSALL, J. T. The svedberg and the ultracentrifuge. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 114–115, 1978.
- 113 BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Analysis of molecular targets of *Mycobacterium tuberculosis* by analytical ultracentrifugation. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 9, p. 1276–1285, 2011.
- 114 LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Science*, v. 11, n. 9, p. 2067–2079, 2002.
- 115 BEAMS, J. W.; WEED, A. J.; PICKELS, E. G. The ultracentrifuge. *Science*, v. 78, n. 2024, p. 338–340, 1933.
- 116 SCHUCK, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal*, v. 78, n. 3, p. 1606–1619, 2000.

- 117 BROWN, P. H.; SCHUCK, P. A new adaptive grid-size algorithm for the simulation of sedimentation velocity profiles in analytical ultracentrifugation. *Computer Physics Communications*, v. 178, n. 2, p. 1105–1120, 2000.
- 118 LE MAIRE, M. et al. Gel chromatography and analytical ultracentrifugation to determine the extent of detergent binding and aggregation, and Stokes radius of membrane proteins using sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase as an example. *Nature Protocols*, v. 3, n. 11, p. 1782–1795, 2008.
- 119 SALINAS, S. R. A. Einstein e a teoria do movimento browniano. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 27, n. 2, p. 263–269, 2005.
- 120 ZERAIK, A. E. et al. Biophysical dissection of schistosome septins: insights into oligomerization and membrane binding. *Biochimie*, v. 131, p. 96–105, 2016. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.014.
- 121 ZERAIK, A. E. *Caracterização estrutural e funcional de septinas de Schistosoma mansoni*. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 122 FU H. *Protein-protein interactions: methods and applications*. Totowa: Humana Press; 2004.
- 123 MARQUES, I. A. et al. Septin C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 62, n. 2, p. 317–28, 2012.
- 124 LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008.