**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Carla Silva Martins

Análise das interfaces de interação septina-septina

**São Carlos
2017**

CARLA SILVA MARTINS

Análise das interfaces de interação septina-septina

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

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

**São Carlos
2017**

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

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

Martins, Carla Silva

Análise das interfaces de interação septina-septina / Carla Silva Martins; orientador Ana Paula Ulian de Araújo - versão corrigida -- São Carlos, 2017.

112 p.

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

1. Septinas. 2. Interação protéica. 3. Amilóides.
I. Araújo, Ana Paula Ulian de, orient. II. Título.

A todos aqueles que de alguma forma
estiveram e estão próximos a mim, fazendo
esta vida valer cada vez mais a pena

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de fazer o curso.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo, pela orientação, apoio e confiança, que foram essenciais na realização deste trabalho.

A todos os professores envolvidos na minha formação acadêmica, por me proporcionarem o conhecimento racional, e a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

Ao Grupo de Biofísica Molecular, funcionários, Andressa, Isabel, Fernando e Rafael, e colaboradores, por facilitarem a rotina de trabalho; as colegas de laboratório, Dr^a Patrícia Kumagai, Dr^a Ana Elisa Zeraik, Dr^a Joci Macedo, por ajudarem na idealização, execução e conclusão deste projeto.

Aos meus pais, Galiana e Odalécio, pelo amor, incentivo e apoio incondicional; à minha família de sangue, Caroline e Alessandra, pela amizade e paciência; à minha família de coração, Murilo, Lygia, Gabriel e Fernanda, por inúmeras vezes acreditarem mais em mim do que eu mesma e me motivarem todos os dias nessa caminhada, que não foi fácil, mas valeu muito a pena.

Aos amigos que fiz no laboratório, Ana, Evérton, Heline, Heloísa, Mariana, Raíssa, Raphael e Sinara, pela colaboração, amizade, parceria, e momentos de descontração, discussões e ideias.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

"Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas."

Steve Jobs

RESUMO

MARTINS, C. S. **Análise das interfaces de interação septina-septina**. 2017. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Septinas pertencem a uma família de proteínas de ligação a GTP e são encontradas em diversos eucariontes, participando de diferentes processos celulares citoesqueléticos. As septinas apresentam um domínio central de ligação a GTP (domínio G) flanqueado por uma região amino-terminal e outra carboxi-terminal. As septinas se caracterizam por interagirem entre si formando heterocomplexos que se polimerizam, constituindo filamentos. A única estrutura resolvida de um complexo de septinas é de um hexâmero, composto por duas subunidades de três septinas humanas diferentes: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. Esta estrutura revelou que a formação do filamento envolve interações conservadas entre os domínios G, estando o restante da estrutura desordenado no cristal. Além disso, mostrou que dois tipos de interface se alternam ao longo do filamento, as chamadas interfaces G (que incluem a região de ligação do nucleotídeo de duas subunidades) e interfaces NC (que incluem as regiões N e C-terminais do domínio G). Várias evidências sugerem que as regiões C-terminais da proteína sejam as principais responsáveis pela seleção do parceiro correto de interação para montagem dos heterocomplexos. Nesse contexto, buscou-se avaliar a importância das regiões C-terminais na seleção das parceiras SEPT6 e SEPT7 para formar a interface NC, frente ao domínio G. Inicialmente, uma septina quimérica foi produzida de forma a conter o domínio G de SEPT2 e o C-terminal de SEPT6, gerando SEPT2G_{6C}. As proteínas SEPT7GC, SEPT6GC, SEPT2GC e SEPT2G_{6C} foram expressas e purificadas separadamente. Análises de estabilidade térmica e de afinidade proteína-proteína dos pares indicou que a quimera foi capaz de interagir com SEPT7GC, gerando o heterodímero SEPT7GC-SEPT2G_{6C}, mas este não se mostrou tão estável quanto o heterodímero fisiológico. Foi também avaliada a importância da ligação do nucleotídeo para formação da interface G e, para isso, foram construídos os mutantes SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}, cujos resíduos importantes para hidrólise e ligação do nucleotídeo, respectivamente, foram alterados. A análise de oligomerização por cromatografia de exclusão molecular mostrou deslocamento no volume de eluição das proteínas expressas sozinhas e coexpressas com SEPT6G, indicando que a formação do dímero via interface G depende da ligação do nucleotídeo, mas não da sua hidrólise. Finalmente, foi avaliada a estabilidade térmica e estrutural e a propensão à formação de amilóides do heterodímero SEPT6G-SEPT2G, o qual apresentou maior estabilidade estrutural quando comparado ao homodímero de SEPT2G, mas ainda exibiu alteração de sua estrutura para um estado capaz de ligar Thioflavina-T, sugerindo a formação de amilóides. Entretanto, isso foi observado em temperaturas cerca de 30 °C acima daquela observada para o homodímero, confirmando a maior estabilidade do heterodímero e sugerindo que a formação da interface G com o parceiro correto pode ser um fator importante na prevenção da formação de estruturas amilóides à temperaturas fisiológicas.

Palavras-chave: Septinas. Interação protéica. Amilóides.

ABSTRACT

MARTINS, C. S. **Analysis of the septin-septin interaction interfaces.** 2017. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Septins belong to a family of GTP binding proteins and are found in several eucaryotes, participating in different cytoskeletal cell processes. The septins have a central GTP binding domain (G domain) flanked by an amino-terminal and a carboxy-terminal regions. The septins are characterized by the ability to interact with each other forming heterocomplexes which polymerize themselves, forming filaments. The only solved structure of a septin complex is a hexamer, formed by two subunits of three different human septins: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. This structure revealed that the filament arrangement involves conserved interaction between G domains, being the remainder of the structure disordered in the crystal. Moreover, two types of interface alternate along the filament were shown, so-called G interfaces (which include the nucleotide binding region of the two subunits) and NC interfaces (which include the N- and C- terminal regions of G domain). Plenty of evidences suggest that C-terminal regions of the protein are the main responsible for the selection of the correct interaction partner to assembly of heterocomplexes. In this context, it was sought to evaluate the importance of the C-terminal regions in the selection of the partnerships SEPT6 and SEPT7 to form the NC interface, against the G domain. For this, a chimerical septin was designed so that contains the G-domain of SEPT2 and the C-terminal of SEPT6, creating SEPT2G_{6C}. The SEPT7GC, SEPT6GC, SEPT2GC and SEPT2G_{6C} proteins were expressed and purified individually. Thermal stability and protein-protein affinity analysis of the pairs indicated that the chimera was able to interact with SEPT7GC, forming the heterodimer SEPT7GC-SEPT2G_{6C}, which, however, did not show as stable as the physiological heterodimer. The importance of nucleotide binding to the interaction through G interface was also evaluated and, for that, SEPT2 mutants on GTP-domain were constructed, SEPT2^{T78M} and SEPT2^{D185N}, whose important residues in the hydrolysis and linking of nucleotide, respectively, were changed. Oligomerization analysis by size exclusion chromatography showed a shift in the elution volume of proteins expressed alone and coexpressed with SEPT6, indicating that the complexation of proteins to form G interface depends on the nucleotide binding, but not on its hydrolysis. Finally, the thermal and structural stability and the propensity to amyloid formation of heterodimer SEPT6G-SEPT2G were evaluated, which showed greater structural stability when compared to SEPT2 homodimers, but still exhibited alteration of its structure to a state that was able to bind Thioflavin-T, suggesting amyloid formation. However, this was observed at temperatures around 30 °C above that observed for the homodimer, confirming the greater conformational stability of the heterodimer and suggesting that the formation of G interface with the right partner can be an important factor of the amyloid filament prevention at physiological temperatures.

Keywords: Septins. Protein interaction. Amyloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Identificação das septinas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 2 – Diversidade de funções das septinas nos processos celulares.....	25
Figura 3 – Funções das septinas nos sistemas do corpo humano e suas conexões com doenças.	27
Figura 4 – Características estruturais de uma septina.....	28
Figura 5 – Detalhes do sítio de ligação do nucleotídeo.....	30
Figura 6 – Árvore filogenética da família de septinas humanas.....	32
Figura 7 – Complexo hexamérico de septinas humanas.....	35
Figura 8 – Complexo octamérico humano.	36
Figura 9 – Associação dos complexos de septinas em estruturas de alta ordem.....	38
Figura 10 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2G α 0 _{6C}	57
Figura 11 – Análise do produto de amplificação de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G _{6C}	58
Figura 12 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G _{6C}	59
Figura 13 – Análise da expressão e purificação das construções com as regiões GC de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2 ₆	61
Figura 14 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.	63
Figura 15 – Espectros de CD de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G _{6C}	64
Figura 16 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT6GC quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.....	65
Figura 17 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT2GC quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.....	66
Figura 18 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT2G _{6C} quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.....	67
Figura 19 – Curvas de desnaturação térmica dos pares de SEPT7GC com SEPT6GC, SEPT2GC e SEPT2G _{6C}	68
Figura 20 – Sensorgramas da ressonância plasmônica de superfície.	70
Figura 21 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2G.	71
Figura 22 – Análise da expressão e purificação de SEPT2G, SEPT2G ^{T78M} e SEPT2G ^{D185N} . .	73
Figura 23 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.	74

Figura 24 – Análise de atividade GTPásica de SEPT2G e SEPT2G ^{T78M} por cromatografia de troca iônica.	76
Figura 25 – Análise do produto de amplificação e do padrão de restrição dos clones de SEPT6G.....	77
Figura 26 – Análise da expressão e purificação de SEPT6G e das coexpressões e copurificações de SEPT6G e SEPT2G ou seus mutantes.	80
Figura 27 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.....	81
Figura 28 – Ensaio de <i>Western Blot</i> para diferenciar SEPT6G de SEPT2G ou seus mutantes.	82
Figura 29 – Dispersividade das amostras de SEPT6G-SEPT2G e SEPT6G.	84
Figura 30 – Alterações conformacionais em SEPT6G-SEPT2G em função da temperatura. .	85
Figura 31 – Controles experimentais de estabilidade térmica.	86
Figura 32 – Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT6G-SEPT2G e a SEPT6G, em função da temperatura.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Septinas em organismos modelo.	23
Tabela 2 – Proteínas que interagem com septinas e suas respectivas relevâncias fisiológicas.	26
Tabela 3 – Expressão das septinas humanas tecido-específicas.	33
Tabela 4 – Construções de septinas humanas, clonadas previamente e armazenadas no banco de plasmídeos do grupo de pesquisa, que foram utilizadas no presente trabalho.	43
Tabela 5 – Reagentes, e quantidades dos mesmos, utilizados na reação de amplificação.	44
Tabela 6 – Programação do termocilador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.	44
Tabela 7 – Reagentes, e quantidades dos mesmos, utilizados na reação de amplificação.	45
Tabela 8 – Programação do termocilador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.	46
Tabela 9 – Construções mutantes de septinas humanas utilizadas no presente trabalho.	46
Tabela 10 – Construções de septinas humanas clonadas que foram utilizadas no presente trabalho.	47
Tabela 11 – Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica.	53
Tabela 12 – Características físico-químicas das construções GC para SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2 ₆ , após clivagem com SUMO protease.	59
Tabela 13 – Massas moleculares observada e calculada para as construções GC de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2 ₆	63
Tabela 14 – Características físico-químicas das construções G para, SEPT2, SEPT2 ^{T78M} e SEPT2 ^{D185N} , sem remoção da cauda de histidinas.	72
Tabela 15 – Massas moleculares observada e calculada para as construções de SEPT2G.	75
Tabela 16 – Características físico-químicas das construções G para, SEPT6G, SEPT2, SEPT2 ^{T78M} e SEPT2 ^{D185N} , em vetor para coexpressão.	78
Tabela 17 – Massas moleculares observada e calculada para as construções de SEPT2G e copurificações.	81
Tabela 18 – Parâmetros obtidos para as análises por SEC-MALS de SEPT6G-SEPT2G e de SEPT6G, individualmente.	84

SUMÁRIO

1	Introdução.....	21
1.1	Descoberta e características gerais das septinas	21
1.2	Funções de septinas e associação com doenças	23
1.3	Estrutura das septinas	28
1.3.1	Região N-terminal	28
1.3.2	Domínio de ligação ao GTP (domínio G)	29
1.3.3	Região C-terminal	31
1.4	Septinas de mamíferos.....	32
1.5	Polimerização	33
1.5.1	Interações septina-septina: o complexo.....	33
1.5.2	Estruturas de alta ordem	37
2	Objetivos.....	39
3	Materiais e métodos.....	41
3.1	Clonagens e construção dos sistemas de expressão.....	41
3.1.1	Linhagens bacterianas, vetores, meios e condições de cultivo.....	41
3.1.2	Enzimas, <i>kits</i> e procedimentos em biologia molecular.....	42
3.1.3	Obtenção da proteína quimérica	42
3.1.4	Construções presentes no banco de plasmídeos	43
3.1.5	Desenho de oligonucleotídeos para amplificação das construções de interesse	43
3.1.6	Isolamento e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse.....	44
3.1.7	Construção dos mutantes	45
3.1.8	Construção dos sistemas de expressão	46
3.2	Expressão heteróloga.....	47
3.3	Purificação e preparação das amostras	48
3.3.1	Purificação por cromatografia de afinidade.....	48
3.3.1.1	Construções em pET SUMO	48
3.3.1.2	Coexpressões e construções em pET28 e pET-TEV	48
3.3.2	Purificação por cromatografia de exclusão molecular	48
3.3.3	Preparo das amostras	49
3.4	Estudo da interface NC heterodimérica.....	49
3.4.1	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G _{6C}	49

3.4.2	Estabilidade térmica dos possíveis heterodímeros por dicroísmo circular	50
3.4.3	Afinidade entre os possíveis heterodímeros por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	51
3.5	Estudo da interface G heterodimérica	52
3.5.1	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2G, SEPT2G ^{T78M} , SEPT2G ^{D185N} , SEPT6G e coexpressões	52
3.5.2	Análise do teor de nucleotídeo em SEPT2G, SEPT2G ^{T78M} , SEPT2G ^{D185N} , SEPT6G e SEPT6G-SEPT2G.....	52
3.5.3	Teste de atividade GTPásica de SEPT2G e SEPT2G ^{T78M}	53
3.5.4	<i>Western Blot</i>	53
3.6	Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides	54
3.6.1	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico, e verificação de homogeneidade da amostra por cromatografia de exclusão molecular acoplada à espalhamento de luz à múltiplos ângulos (SEC-MALS)	54
3.6.2	Influência da temperatura na estrutura secundária do heterodímero SEPT6G-SEPT2G analisado por dicroísmo circular (CD)	55
3.6.3	Espectroscopia de fluorescência com Thioflavina T (ThT) com SEPT6G-SEPT2G ..	55
4	Resultados	57
4.1	Estudo da interface NC heterodimérica	57
4.1.1	Amplificação e clonagem de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G _{6C}	57
4.1.2	Expressão heteróloga e purificação.....	59
4.1.3	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G _{6C}	62
4.1.4	Estabilidade térmica dos possíveis heterodímeros por dicroísmo circular	64
4.1.5	Afinidade entre os possíveis heterodímeros avaliada por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	69
4.2	Estudo da interface G heterodimérica	70
4.2.1	Construção dos mutantes	71
4.2.2	Expressão heterolóloga e purificação	72
4.2.3	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2G e seus mutantes	74
4.2.4	Confirmação da mutação T78M por atividade	75
4.2.5	Análise do teor de nucleotídeo em SEPT2G e seus mutantes.....	76
4.2.6	Coexpressões.....	77

4.2.6.1	Amplificação e clonagem do domínio G de SEPT6 para coexpressão	77
4.2.6.2	Coexpressões e copurificações	78
4.2.6.3	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico	80
4.2.6.4	<i>Western Blot</i>	82
4.3	Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides	83
4.3.1	Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico, e verificação de homogeneidade da amostra por cromatografia de exclusão molecular acoplada à espalhamento de luz à múltiplos ângulos (SEC-MALS)	83
4.3.2	Influência da temperatura na estrutura secundária do heterodímero SEPT6G-SEPT2G avaliada por dicroísmo circular (CD)	85
4.3.3	Espectroscopia de fluorescência com Thioflavina T (ThT) com SEPT6G-SEPT2G...	86
5	Discussão	89
5.1	Estudo da interface NC heterodimérica	89
5.2	Estudo da interface G heterodimérica	90
5.3	Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides	91
6	Conclusões	93
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICES	107

1 INTRODUÇÃO

As septinas foram descobertas há mais de 40 anos em estudos de leveduras com defeitos na divisão celular, mas as pesquisas sobre suas propriedades e funções têm crescido intensamente nos últimos anos devido à convergência de resultados provenientes de diferentes áreas. Desde então, as septinas têm sido reconhecidas como um importante componente do citoesqueleto em várias espécies eucarióticas. Essas proteínas com atividade GTPásica diferenciam-se dos demais componentes do citoesqueleto pela capacidade de se reunirem em complexos heteroligoméricos precisamente organizados que, por sua vez, são capazes de se polimerizarem em filamentos. Atualmente, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos que controlam a montagem e desmontagem dessas estruturas de alta ordem de complexidade. As septinas também interagem com os esqueletos de microtúbulos e microfilamentos, podendo influenciar nas suas dinâmicas. Além disso, podem se ligar à membranas e foi sugerido que elas podem definir compartimentos membranares limitando a difusão lateral de proteínas de membrana. As septinas estão agora associadas a uma ampla variedade de funções celulares em diferentes organismos e, também, têm sido relacionadas à muitas doenças.

1.1 Descoberta e características gerais das septinas

As septinas constituem uma família de proteínas que se ligam e hidrolisam o nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP), as GTPases (1) e foram identificadas pela primeira vez em um estudo de triagem de *Saccharomyces cerevisiae* termosensíveis que visava identificar genes relacionados à divisão celular (2), o que lhes rendeu a nomenclatura CDC (do inglês, *Cell Division Cycle*). (3)

Quatro mutações independentes, nos genes CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12, foram então identificadas como capazes de causar a mesma deficiência na citocinese da levedura: à temperaturas restritas, as cepas mutantes desenvolviam múltiplos brotos alongados que não se separavam da célula mãe, apesar de terem seus DNAs replicados e núcleos divididos, gerando células multinucleadas. (2) Mais tarde, uma microscopia eletrônica realizada nas leveduras em brotamento revelou a formação de um anel filamentososo, de aproximadamente 10 nm de espessura, altamente ordenado rodeando o “pescoço do broto” (*bud neck*), ainda de composição desconhecida, e que estava intimamente associado à membrana plasmática no interior da estrutura. (4) Além disso, tal anel foi identificado em 20 das 24 cepas mutantes nos genes CDC analisadas, sendo as 4 cepas restantes, nas quais o anel não foi observado, as

mesmas que já haviam sido reportadas como causadoras do fenótipo deficiente na citocinese.

(5) Utilizando microscopia de imunofluorescência, os produtos destes genes foram identificados como componentes do colar filamentososo observado na separação das células mãe e filha durante o brotamento. (6-7)

Figura 1 – Identificação das septinas em *Saccharomyces cerevisiae*.

Em A, células de levedura termossensíveis com a mutação no gene *CDC3*, multinucleadas, observadas em microscópio óptico. Imagens similares foram obtidas com os demais mutantes. Em B, célula de levedura selvagem no estágio final do processo de divisão celular, observada em microscópio eletrônico. A seta indica a localização do anel de proteínas no septo. Em C, localização da septina durante o ciclo celular, observada por microscopia de imunofluorescência. Em (a) e (b) inicialmente, as septinas arranjadas como um anel planar na extremidade da célula; em (c) e (d) o anel se estende e passa a se organizar em forma de ampulheta no septo de divisão; em (e) na citocinese, a ampulheta de septinas divide-se em dois anéis; em (f) após a separação, o anel de septinas permanece na extremidade da célula, mais largo e mais fraco que o anel inicial.

Fonte: (A) Adaptada de HARTWELL (2); (B) Adaptada de BYERS (8); (C) Adaptada de GLADFELTER; PRINGLE; LEW. (9)

Devido a localização do anel filamentososo, composto pelos produtos gênicos de *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, e *CDC12*, dar-se no septo de divisão, separando célula-mãe de célula-filha, foi-lhes atribuído o nome “septinas” por John Pringle. (10)

A análise filogenética de septinas mostra que essa classe de proteínas é encontrada em uma diversidade de organismos eucariotos, como fungos, animais e protistas, mas ainda não se tem relatado nenhuma anotação genômica para septinas em plantas. (11-12) O número de genes codificantes de septinas presentes em cada organismo, no entanto, é bastante

variável (13), podendo ser único, como em *Chlamydomonas reinhardtii* (11), ou estar presente em 13 cópias espalhadas pelo genoma, como em *Homo sapiens*. (14)

Tabela 1 – Septinas em organismos modelo.

Organismo	Septinas	Total
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SEP1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc3; Cdc10; Cdc11, Cdc12; Shs1; Spr3; Spr28	7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spn1; Spn2; Spn3; Spn4; Spn5; Spn6; Spn7	7
<i>Candida albicans</i>	Cdc3; Cdc10; Cdc11, Cdc12; Shs7; Spr3; Spr28	7
<i>Eremothecium gossypii</i>	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6; Hyp7	7
<i>Aspergillus nidulans</i>	ASPA; ASPB; ASPC; ASPD; ASPE	5
<i>Neurospora crassa</i>	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6	6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	UNC-51; UNC-59	2
<i>Drosophila melanogaster</i>	SEP1; SEP2; SEP3; SEP4; Pnut	5
<i>Xenopus laevis</i>	Hyp1; SEPT2	2
Mamíferos*	SEPT1; SEPT2; SEPT3; SEPT4; SEPT5;	13
	SEPT6; SEPT7; SEPT8; SEPT9; SEPT10;	
	SEPT11; SEPT12; SEPT14	

*Mamíferos refere-se a *Homo sapiens*, *Mus musculus* (SEPT10a e SEPT10b) e *Rattus norvegicus* (SEPT10a e SEPT10b, (-) SEPT14)

Fonte: Adaptada de WEIRICH; ERZBERGER; BARRAL. (15)

Em *S. cerevisiae*, Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 e Shs são expressos durante o crescimento vegetativo (16), enquanto Spr3 e Spr28 são específicos da fase de esporulação. (17-18) Em mamíferos, algumas septinas são expressas em padrões tecido-específicos. (19)

O número de septinas em humanos é ainda expandido pela expressão de isoformas resultantes de promotores alternativos e de diferenças no *splicing* na transcrição dos genes. Um exemplo de *splicing* alternativo altamente complexo ocorre com SEPT9, a qual potencialmente possui cerca de 15 isoformas diferentes que poderiam resultar da combinação dos éxons localizados nos N- e C-terminais do gene (20), tendo sido anotadas, até a presente data, 7 delas. (21) Embora a função das diferentes isoformas não seja conhecida, sugere-se que nem todas as isoformas de SEPT9 desempenhem a mesma função. (22) Certamente, os *splicings* aumentam a diversidade dos filamentos de septinas e podem alterar suas funções em diferentes tecidos e tipos de células.

1.2 Funções de septinas e associação com doenças

Junto às informações estruturais proporcionadas pela investigação na montagem dos complexos de septinas, o crescente número de estudos funcionais tem mostrado que as

septinas orquestram diversos processos celulares fundamentais, incluindo a citocinese, ciliogênese e neurogênese, servindo como estruturas de suporte para o recrutamento de proteínas e/ou como barreiras de difusão para compartimentalização subcelular. Estudos de interações microrganismo-hospedeiro também destacaram papéis para septinas durante a infecção bacteriana e na imunidade inata. (23)

As septinas são capazes de formar heterocomplexos, que se associam para formar as estruturas de alta ordem, as quais são necessárias para controlar os processos celulares que estão localizados, por exemplo, no septo de divisão (Figura 2-A) (24-25), na membrana plasmática (Figura 2-B) (26-28), no disco terminal do espermatozóide (Figura 2-C) (29-30), na base de cílios (Figura 2-D) (31-33) e dendritos (34-35), e circundando bactérias invasoras (Figura 2-E). (36-37)

(continua)

(continuação)

Figura 2 – Diversidade de funções das septinas nos processos celulares.

Em A, células em citocinese com dois domínios de célula-filha e um domínio de citocinese no plano de clivagem; destacado em vermelho, o anel de septinas que pode atuar como barreira de difusão no sulco de clivagem e como âncora para recrutamento de proteínas específicas da divisão. Em B, células não divididas com conjuntos de septinas na membrana plasmática, que proporcionam rigidez à célula e atuam como âncoras para aprisionar proteínas ligadas à membrana, incluindo receptores de membrana e transportadores, e para retrain a membrana durante a zeiose (formação de “bolhas” na membrana plasmática). Em C, um anel de septinas formando uma barreira de difusão no disco terminal do espermatozóide, responsável por separar as regiões posterior e anterior da cauda, necessária para manter a integridade mecânica e estrutural da célula. Em D, um anel de septinas atuando como barreira de difusão é formado na base do cílio, para separar a membrana ciliar da membrana plasmática, sendo também necessário para a formação do cílio. Em E, o rearranjo do citoesqueleto durante a fagocitose na infecção bacteriana.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY; COSSART. (23)

Tanto na função de suporte para o recrutamento de outras proteínas, como na formação de barreiras de difusão, as septinas atuam interagindo com diversas outras proteínas no organismo. A associação das septinas com as proteínas do citoesqueleto e com membranas, além de sua capacidade de formarem filamentos, lhes rendeu a terminologia de quarto componente do citoesqueleto. (23) Estudos de interactoma têm sido realizados buscando relacionar a função das septinas no tipo celular em que são expressas e as proteínas já caracterizadas que interagem com elas nos processos fisiológicos, sendo alguns desses incluídos na Tabela 2. (38)

Tabela 2 – Proteínas que interagem com septinas e suas respectivas relevâncias fisiológicas.

Interação protéica	Septina	Relevância fisiológica	Referência
CENP	1, 2, 4, 5, 7 e 9	exocitose e tráfego	(39)
SNX6	2, 5, 6, 8 e 11	intracelular	
Sec6/8	2, 4, 6 e 7		(30)
Syntaxin1A	2 e 5		(40)
VAMP1	4 e 11	transporte de vesícula	(41)
receptor de transferrina			
FLNA	9	organização do citoesqueleto	
SH3KBP1		e transporte de vesícula	(39)
IFT27	3 e 7	endocitose e transporte de	
Ra1ABP1		vesícula	
Actina			(42, 43)
Microtúbulo	sem	múltiplas funções	(23, 44-48)
fosfolípido de membrana	especificidade		(43, 49)
Anilina	2	organização de filamentos	(43)
α -tubulina	complexos	regulação da polimerização	(45)
		de actina e tubulina	
citocalasina D*	2 e 6	regulação da polimerização	(43)
latrunculina*		de actina	
MAP4	complexo 2-6-7	modulação da dinâmica dos	(48)
		microtúbulos	
HDAC6	7	desenvolvimento dendrítico	(50)
ERK3	7	morfologia dendrítica	(51)
aurora-B	1	mitose e citocinese	(52)
Cdk1/Pin1	9	citocinese	(53)
Drp1	2	fissão mitocondrial	(54)
Tau/NFTs	1, 2 e 4	diferenciação e crescimento	(55)
		neuronal	
Parkin	5	regulação da diferenciação e	(56)
α -sinucleína	4	do crescimento neuronal	(57-58)
MLL	5, 6, 9 e 11	leucemia mielóide e linfóide	(59-60)
BORG3-cdc42	6 e 7	polaridade celular,	(61-62)
		citocinese e transporte de	
		vesícula	
BORG4-AP-3	6 e 7	regulação da endocitose	(63-64);
KIF17	9	transporte intracelular de	(39, 65)
		proteínas	
UBE21, SUMO, PIAS	quase todas	degradação protéica	(39)

* A citocalasina D e a latrunculina são alcalóides produzidos por fungos e poríferos, respectivamente.

Fonte: Adaptada de NEUBAUER; ZIEGER. (38)

A disfunção das septinas pode, portanto, ser associada a várias doenças (Figura 3). Problemas de infertilidade masculina (29-30,66), neuromusculares (67-68) e de sangramento (69-72) estão geneticamente ligados a mutações e deleções de septinas. Devido ao seu papel

na divisão e migração celulares, alterações na expressão de septinas são comuns em muitos cânceres (60,73-77) e distúrbios de desenvolvimento neurológico (síndrome de Down (78) e esquizofrenia (79), por exemplo). Septinas também já foram encontradas nos emaranhados neurofibrilares e corpos de Lewy em cérebros de portadores de Alzheimer (56,80) e Parkinson. (58,81)

Figura 3 – Funções das septinas nos sistemas do corpo humano e suas conexões com doenças.

Diagrama esquemático mostrando os principais sistemas de órgãos do corpo humano e mapeando processos e estruturas órgão- e tecido-específicas que requerem septinas. Os códigos de cores indicam o envolvimento intracelular das septinas, os quais incluem as funções das septinas na organização da actina (rosa), dos microtúbulos (verde) e de membranas celulares (roxo), na fusão de vesículas (azul) e na apoptose (amarelo). As doenças humanas foram listadas com base em evidências genéticas, histológicas, genômicas e proteômicas que envolvem as septinas nas patologias de diversos órgãos.

Fonte: Adaptada de DOLAT; HU; SPILLOTIS. (85)

Alterações na localização e expressão das septinas têm sido utilizadas como biomarcadores de infertilidade e câncer, contudo, os tratamentos terapêuticos com alvo nas septinas ou que utilizem peptídeos derivados de septinas ainda não foram desenvolvidos. (85) Pesquisas já mostraram que as septinas desempenham papel regulador fundamental na proliferação de células-tronco. (82-84) Assim, o estudo de septinas pode gerar informações valiosas sobre o campo emergente da medicina regenerativa, abrindo caminho para novos diagnósticos e tratamentos de doenças humanas.

1.3 Estrutura das septinas

As septinas são proteínas que possuem o motivo *P-loop* (*phosphate-binding loop*) contido no domínio de ligação ao GTP (86) e cujas características estruturais gerais são mostradas na Figura 4. Tanto o N-terminal quanto o C-terminal são variáveis entre os membros da família das septinas. Em muitas espécies, as septinas têm uma região polibásica N-terminal, que tem sido mostrada como ligadora de fosfoinosítídeos. (87-88) A jusante dessa região, encontra-se o domínio de ligação a GTP, que termina com o SUE (do inglês, *Septin Unique Element*), elemento que distingue as septinas de outros membros da família das *P-loop* GTPases. (12,16,89) A região variável C-terminal localiza-se depois do domínio GTPásico e pode conter predição para estrutura *coiled-coil*. (12,89) Tem sido sugerido que essas podem ser necessárias para interações com outras septinas ou até outras proteínas. (16,88,90)

Figura 4 – Características estruturais de uma septina.

Os diferentes elementos estão mostrados: região polibásica (azul), o domínio de ligação ao GTP (roxo) e a região predita como *coiled-coil* (verde). As regiões N- e C-terminais, flanqueando o domínio central, e a região SUE (*Septin Unique Element* – Elemento Único de Septina), estão destacadas acima. As interfaces envolvidas na interação septina-septina estão destacadas abaixo (vermelho).

Fonte: Adaptada de FUNG; DAI; TRIMBLE. (91)

1.3.1 Região N-terminal

A região N-terminal das septinas de mamíferos pode possuir uma região polibásica presente em sua sequência, mais próxima ao domínio de ligação ao GTP, capaz de interagir com membranas celulares. Estudos mostraram que SEPT4 de mamíferos ligou-se

especificamente a fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) e fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₂), fosfolipídeos da membrana celular. (87) Análises de deleção e mutação em células de mamíferos e, posteriormente, de leveduras identificaram uma região composta por seis aminoácidos responsável por tal ligação com as membranas fosfolipídicas. (87-88) Embora os resíduos não sejam conservados, um resíduo básico (H, K ou R) está presente nas posições 1, 2, 5 e 6 de 60-78 % das sequências de 162 septinas analisadas. (12)

1.3.2 Domínio de ligação ao GTP (domínio G)

O domínio de ligação ao GTP pode ligar e hidrolisar moléculas de GTP (1,92-93), embora essa hidrólise de GTP e troca da molécula hidrolisada ocorram lentamente, para a maioria das septinas, e apresentem diferentes taxas entre diferentes septinas. (94-0) O propósito da hidrólise do GTP permanece incerto, embora alguns mutantes de septinas que não são capazes de ligar GTP tenham apresentado formação, aparência, localização subcelular e/ou função alteradas. (92,100-102) Foi sugerido que a ligação e/ou hidrólise de GTP contribui para a montagem dos complexos de septinas (94-95,103), que serão discutidos mais adiante.

O domínio G é o mais conservado, tanto em sequência quanto em estrutura tridimensional, em septinas, apresentando um mínimo de 75 % de similaridade entre os membros de septinas da mesma espécie. (12) As septinas possuem três dos cinco motivos conservados na família das GTPases (104): o motivo G1 ou *P-loop*, que interage com os grupos fosfato do nucleotídeo; o motivo G3, que liga o cofator Mg²⁺ e pode interagir com os fosfato-β e -γ; e o motivo G4, que confere especificidade ao GTP (Figura 5). (105) Por não apresentarem os motivos G2 e G5, as septinas são mais similares com as GTPases da superfamília Ras, as quais possuem o mecanismo de hidrólise e troca do nucleotídeo coordenado pelos dispositivos *switch I* e *switch II*, também presentes nas septinas. (106)

Figura 5 – Detalhes do sítio de ligação do nucleotídeo.

Os motivos conservados em septinas (G1, G3 e G4), bem como os aminoácidos responsáveis pelo mecanismo de *switch* I e II, estão destacados. A estrutura cristalográfica da qual a imagem foi obtida (3FTQ) fora resolvida com o análogo de GTP, GppNHp (vermelho), ligado à septina. As duas moléculas na interface dimérica G estão coloridas de laranja e azul.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN et al. (97)

Dentro do domínio GTPásico o motivo mais conservado é o G1, cuja sequência consenso, GxxxxGK[ST], forma um *loop* flexível no sítio catalítico. A partir da estrutura cristalográfica de SEPT2-GppNHp (código de acesso no PDB: 3FTQ) pode-se observar que o resíduo de lisina conservado (K50) interage com os fosfatos- β e - γ do nucleotídeo, o resíduo de serina conservado (S51) interage com o Mg^{2+} , e o resíduo de treonina (T52), adicional ao consenso do motivo G1, forma uma ligação de hidrogênio com o fosfato- α . (97)

O resíduo de treonina responsável pelo dispositivo *switch* I (T78) coordena o íon magnésio e forma uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água posicionada acima do fosfato- γ , permitindo a hidrólise do GTP e conferindo, assim, atividade catalítica às septinas. (97)

O motivo G3 é caracterizado pela sequência consenso DxxG. O resíduo de glicina (G104) é altamente conservado e responsável pelo dispositivo *switch* II, mediando a hidrólise e troca do GTP junto com T78. Os grupamentos amina das cadeias principais de cada um desses resíduos formam ligações de hidrogênio com o fosfato- γ do GTP. Já o resíduo de ácido aspártico (D101) coordena indiretamente com os fosfatos- β e - γ do GTP, com o auxílio de uma molécula de água, a mesma que forma parte das interações com o íon magnésio. (97)

O motivo G4 é caracterizado pelo consenso xKxD, que em septinas é completamente conservado e corresponde à sequência AKAD. O resíduo de lisina (K183) interage com a ribose do nucleotídeo, enquanto o resíduo de ácido aspártico (D185) coordena com a base guanosina, conferindo assim especificidade ao GTP. (97,104)

O domínio de ligação ao GTP apresenta na sua extremidade mais próxima ao C-terminal uma região de 53 aminoácidos altamente conservada que são únicos para septinas e que, por esse motivo, foi denominada como “elementos únicos de septinas” (SUE). (16) Tal região apresenta 92 % de similaridade entre septinas (12) e permanece com função desconhecida, já tendo sido associada, porém, com a formação das interfaces através das quais monômeros de septinas se unem formando os filamentos. (11)

1.3.3 Região C-terminal

A região C-terminal das septinas apresenta comumente uma sequência de aminoácidos predita para formar estruturas do tipo *coiled-coil* a partir de interação entre as hélices. Um *coiled-coil* é formado por duas ou mais hélices α anfipáticas que se complementam, apresentando um padrão de repetição contendo sete resíduos, *abcdefg*, caracterizado pela presença de resíduos hidrofóbicos, nas posições *a* e *d*. (107)

Tem sido sugerido que tal estrutura pode ser responsável pela determinação preferencial do parceiro de interação durante a associação das septinas na formação de complexos. Os *coiled-coils* foram identificados no C-terminal de septinas de *S. cerevisiae*, as quais, Cdc3 e Cdc12, mostraram-se dependentes dessa região para associação entre si e realização de suas funções. (89) Posteriormente, foi possível determinar a importância dos *coiled-coils* tanto na montagem do filamento quanto na polimerização de dois filamentos adjacentes, propondo-se que *coiled-coils* paralelos são formados por Cdc12 e Cdc3 num filamento, com posterior associação, via ligações cruzadas, dos *coiled-coils* de forma antiparalela. (108)

Estudos com os *coiled-coils* de septinas humanas mostrou que os C-terminais de SEPT6, SEPT7 e SEPT2, quando expressos e purificados individualmente, comportam-se como homodímeros. No entanto, quando o C-terminal de SEPT6 e SEPT7 são incubados e submetidos a *cross-linking*, os mesmos podem ser purificados como heterodímeros. Análises de afinidade concluíram que a interação entre C-terminal de SEPT6-SEPT7 é preferida mesmo na presença de SEPT2. (109)

1.4 Septinas de mamíferos

Até a presente data, 13 genes que codificam para septinas funcionais, com expressão tecido específica ou difundida, foram identificados. (110) A primeira septina humana foi descrita em 1994. (111) As septinas de mamíferos podem ser classificadas, com base na similaridade das sequências e no número de *coiled-coils* preditos na região C-terminal, em quatro subgrupos diferentes. (13) Os quatro subgrupos não estão ortologicamente relacionados com as septinas expressas durante o crescimento vegetativo de *S. cerevisiae* (12), mas eles compartilham similaridade estrutural (Figura 6). (16)

Figura 6 – Árvore filogenética da família de septinas humanas.

Representação de dendograma ilustrando a relação filogenética dos membros das 13 septinas humanas, determinado por análise utilizando o software *Clustal W*, e suas distribuições dentro dos subgrupos.

Fonte: Adaptada de PETERSON; PETTY. (112)

A maioria das septinas são classificadas no subgrupo de SEPT2, que inclui SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5, e de SEPT6, o qual consiste em SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14. Os membros do subgrupo de SEPT6 não possuem o resíduo de treonina conservado envolvido na hidrólise do GTP (*switch I*) e, assim, são hidroliticamente inativas e sempre ligadas à GTP. (97, 113) As septinas restantes são classificadas no subgrupo de SEPT9, o qual compreende SEPT3, SEPT9 e SEPT12, e no subgrupo de SEPT7, que contém apenas as isoformas de SEPT7.

As septinas 2, 7 e 9 são expressas de forma ubíqua, enquanto as septinas 1, 3, 12 e 14 são tecido-específicas (Tabela 3). As demais septinas são expressas amplamente pelos diferentes tipos celulares, mas não estão presentes em todos os tecidos. (85)

Tabela 3 – Expressão das septinas humanas tecido-específicas.

Septina	Tecido de expressão
SEPT1	Linfóide/Cutâneo
SEPT3	Neuronal
SEPT12	Testicular
SEPT14	Testicular/Neuronal

Fonte: Adaptada de DOLAT; HU; SPILIOTIS. (85)

1.5 Polimerização

1.5.1 Interações septina-septina: o complexo

Desde sua descoberta, as septinas se mostraram funcionar como complexos em vez de entidades de proteínas únicas. A primeira caracterização bioquímica de septinas de *Drosophila* revelou que elas existiam em um complexo hexamérico composto por Pnut, Sep1 e Sep2, com duas cópias de cada produto gênico. (1,114) Da mesma forma, o complexo de septinas de levedura apareceu como um octâmero contendo razões estequiométricas de Cdc3, Cdc10 e Cdc12, com níveis subestequiométricos de Cdc11 e Shs1 (115-116), no qual estas últimas competem pela posição terminal do octâmero. (108,117) Composições similares foram observadas em complexos de septinas isolados de *Candida albicans*. (118) Uma vez que diferentes organismos expressam números diferentes de septinas, não é surpreendente que eles produzam heterocomplexos de diferentes tamanhos. No caso de *Caenorhabditis elegans*, que possui apenas duas septinas, um heterotetrâmero com duas cópias de cada septina foi observado. (119) Não há ainda, entretanto, nenhuma evidência de que as septinas poderiam funcionar como unidade protéica independente, ou seja, fora de um complexo.

Como os mamíferos possuem 13 genes que codificam septinas, existe a possibilidade de estruturas de complexos muito grandes ou complicados. As primeiras preparações de septinas isoladas de cérebro de rato continham pelo menos cinco septinas e sua estequiometria não era clara. (120) Análise por espectrometria de massas de septinas imunoisoladas desse órgão identificou oito septinas diferentes presentes em níveis variados. (42) Em contrapartida, isolamento bioquímico das septinas do cérebro levou à purificação de um complexo de apenas três septinas, que foi previsto conter quantidades estequiométricas de SEPT3, SEPT5 e SEPT7. (121) Os complexos de septinas humanos isolados de célula HeLa são capazes de se associarem em complexos octaméricos (122-123), embora também encontrados como hexâmeros. As septinas de mamíferos são agrupadas em quatro subgrupos, de forma que os

complexos de septinas são compostos de uma combinação de membros de cada subgrupo. Entretanto, não se sabe ainda se todos os complexos funcionais de septinas requerem membros de cada subgrupo ou mesmo se todos os complexos possuem estequiometria definida. Septinas isoladas de tecidos com tipos variados de células, como o cérebro, por exemplo, podem participar de complexos distintos em cada tipo celular, resultando em uma estequiometria que representa a média da mistura dos complexos isolados. Estudos de *immunoblotting* revelaram que, embora pelo menos dez septinas diferentes fossem detectadas no tecido cerebral, culturas puras de neurônios primários do hipocampo expressaram apenas cinco, SEPT3, SEPT5, SEPT6, SEPT7 e SEPT11 (124), todas encontradas por coimunoprecipitação.

O complexo endógeno de septinas melhor caracterizado é o de *S. cerevisiae*. Estudos utilizando microscopia eletrônica revelaram que esse complexo existe como uma estrutura semelhante a um “bastão”, compreendendo as septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12. (115) Por marcação individual das septinas, ou anticorpos nas preparações de microscopia eletrônica, determinou-se que este “bastão” consistia em duas unidades tetraméricas posicionadas em simetria especular com a seguinte ordenação: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. (108)

A estrutura molecular de um complexo de septinas humanas foi resolvida utilizando cristalografia de raios-X, revelando, então, a formação de um hexâmero composto por SEPT2, SEPT6 e SEPT7, quando as septinas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli*. (125) Tal como o complexo de levedura, a estrutura cristalográfica mostrou que as septinas de mamíferos também apresentavam simetria especular, resultando em um “bastão” não-polar com a seguinte ordem: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. (125) Conforme ilustrado na Figura 7, a estrutura cristalográfica revelou ainda os pontos de contato entre as septinas, dentro do complexo, apresentando interações entre o domínio G das subunidades, com interfaces alternadas: aquela que inclui o sítio de ligação ao GTP, chamada de interface G, e a interface compreendida pelas porções N- e C-terminais do domínio G, conhecida como interface NC. Na estrutura, SEPT2-SEPT6 compartilham a interface G de interação, enquanto SEPT2-SEPT2 e SEPT6-SEPT7 estão associados por interfaces NC. (125) As regiões N- e C-terminais das septinas não apresentaram densidade eletrônica na estrutura cristalográfica, mesmo estando presentes na construções (na Figura 7, o C-terminal das moléculas estão projetados ortogonalmente ao eixo do hexâmero). (125) Uma vez que os domínios *coiled-coil* de SEPT6 e SEPT7 têm sido mostrados interagirem diretamente um com o outro (109,126-

127), prevê-se que eles ajudem nas interações ou até mesmo sejam responsáveis pela correta seleção dos parceiros na formação do complexo.

Figura 7 – Complexo hexamérico de septinas humanas.

Estrutura do complexo, representação por fita, formado por SEPT2 (azul), SEPT6 (rosa) e SEPT7 (ciano). Duas cópias de cada septina estão simetricamente arranjadas (SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7) para gerar o hexâmero. As setas indicam a posição e orientação das porções C-terminais que formam a interação *coiled-coil* prevista, a qual não foi possível observar na estrutura do cristal devido à não detecção de densidade eletrônica das mesmas. Os nucleotídeos ligados às subunidades estão representados por bastão nos sítios de ligação. As interfaces de interação estão indicadas abaixo da estrutura.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN et al. (125)

Verificou-se também que as septinas de mamíferos poderiam associar-se em uma organização octamérica, determinada por meios bioquímicos. (122-123) Segundo experimentos de imunoprecipitação usando células HeLa, o complexo de septinas compreende, então, SEPT2, SEPT6, SEPT7, SEPT9. (22,123) Análise de sedimentação revelou que a média dos complexos de septinas era consistente com o tamanho de um octâmero, e a depleção de SEPT9 resultava em oligômeros com massa média mais baixa. (123) Uma vez que essa massa menor foi comparável à do hexâmero SEPT2-SEPT6-SEPT7, sugeriu-se que SEPT9 também participa de complexos de septinas que são maiores que um hexâmero. (123) A ordem das subunidades dentro do complexo foi determinada coexpressando formas selvagens ou mutantes de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, nos quais as interface NC e G foram mudadas para prevenir a dimerização. Adicionalmente, à uma septina foi adicionado 6xHis-tag e à outra septina uma proteína ligadora de maltose. Utilizando purificação por afinidade em tandem, a ordem sequencial do octâmero foi determinada como sendo SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, como mostrado na Figura 8. (122)

Figura 8 – Complexo octamérico humano.

Esquema da unidade octamérica do complexo de septinas humano formado por associação alternada via interfaces G e NC de SEPT9 (laranja), SEPT7 (ciano), SEPT6 (rosa) e SEPT2 (azul), repetidas em imagem especular, na sequência.

Fonte: Adaptade de FUNG; DAI; TRIMBLE. (91)

Nos estudos realizados por Sellin e colaboradores, verificou-se também que SEPT6 e SEPT11 eram intercambiáveis no complexo de septina. A análise dos lisados de células K562, transfectadas com SEPT6 marcada no C-terminal (SEPT6-FLAG), revelou uma degradação seletiva apenas de SEPT6 e SEPT11 endógenas. (123) Uma análise de sedimentação mostrou que o tamanho do complexo de septinas contendo SEPT6-FLAG era indistinguível do complexo de septinas endógeno. (123) De modo geral, tais resultados sugerem que a superexpressão de SEPT6-FLAG competiu com SEPT6 e SEPT11 por uma posição específica no heterocomplexo em questão durante sua montagem. Mais tarde, verificou-se que os membros do mesmo subgrupo de septinas não eram permutáveis dentro de complexos de septinas premontados (128), os quais parecem ser estáveis.

O mecanismo de montagem do octâmero foi investigado por Kim e colaboradores, que sugeriram um papel para a hidrólise do GTP. Resumidamente, verificaram que uma construção de SEPT2 truncada no N-terminal (SEPT2 Δ 15) era capaz de oligomerizar-se e formar homofilamentos. Esse mutante foi então utilizado como modelo no estudo de interação septina-septina nas interfaces G e NC. Foram feitos mutantes de SEPT2 Δ 15 capazes de interromper a interação pela interface G ou pela interface NC. Experimentos de imunofluorescência e imunoprecipitação mostraram que os mutantes NC eram capazes de evitar a formação do filamento através da interação com SEPT2 Δ 15 não-mutada, enquanto os mutantes G não eram capazes de fazê-lo. A co-imunoprecipitação de dois mutantes SEPT2 Δ 15 NC marcados diferentemente foi possível, mas dois mutantes G diferentemente marcados não, indicando que a interação pela interface G é a dominante. De fato, quando

qualquer par de septinas de mamíferos foi coexpresso em células HeLa, todas as combinações foram encontradas coimunoprecipitadas por interação via interface G, exceto o par SEPT6-SEPT6. Esta descoberta foi inesperada pois a estrutura cristalográfica havia mostrado que algumas dessas combinações normalmente interagiam via interface NC. Contudo, aqueles pares que normalmente formaram interações via interface G ligaram-se com maior afinidade. (122) Em conjunto, esses dados sugerem que a afinidade da interação pelo domínio G é mais forte do que a interação NC, o que leva à hipótese que exista uma ordem sequencial de interação da seguinte forma: primeiro, as interações aconteceriam entre os pares de septinas que canonicamente interagem via interface G (como predito pela estrutura cristalográfica); esta interação desencadearia então a hidrólise do GTP, levando a uma alteração estrutural nas interfaces G e NC (97), que facilitaria a interação de dímeros entre si e, finalmente, resultaria na formação do octâmero.

Como já mencionado, o subgrupo de septinas de mamíferos contendo SEPT6 não hidrolisa GTP por não possuir a treonina catalítica na região do *switch I*, que também está ausente em Cdc3 e Cdc11 de levedura. (97) Verificou-se que a hidrólise do GTP não é essencial para Cdc3 e Cdc11, (97) sugerindo que a presença de uma fração de GTP poderia estabilizar a interface dimérica no *core* do complexo de septina. (97) Embora muito trabalho tenha sido feito para descobrir como as septinas se comportam e interagem *in vivo*, muito ainda está por ser determinado. Por exemplo, a gama de diferentes complexos de septinas que podem ser formados e a facilidade com que diferentes membros do mesmo subgrupo podem substituir uns aos outros durante a montagem (42) não é conhecida, bem como a contribuição específica das isoformas produzidas por *splicing* alternativo. Em qualquer caso, embora os complexos de septinas de diferentes espécies variem em composição e tamanho, um ponto em comum é a simetria com organização não polar das proteínas.

1.5.2 Estruturas de alta ordem

Os complexos heterooligoméricos de septinas acima descritos são os blocos de construção de ultraestruturas de septinas mais complexas. Dada a natureza em forma de “bastão” de um oligômero de septinas, os filamentos são formados pela união de cada oligômero, extremidade com extremidade, enquanto feixes também podem ser formados a partir da interação lateral entre os oligômeros. (15) Os feixes agrupados formam, então, estruturas de ordens ainda mais elevadas, como anéis, redes e filamentos. (108,117,42) O modelo de montagem octamérico é conservado entre mamíferos e levedura (95,108), mas os

feixes de septinas podem igualmente consistir em complexos hexaméricos (7-6-2-2-6-7) e tetraméricos (9-7-7-9). (110,129) Além disso, também podem existir heterooligômeros “não-canônicos” que consistem de múltiplas subunidades de septinas do mesmo subgrupo. (85)

Figura 9 – Associação dos complexos de septinas em estruturas de alta ordem.

Em A, complexos oligoméricos de septinas com tamanho e composições variados. Em B, polimerização dos oligômeros de septinas em estruturas de alta ordem, como anéis, redes ou filamentos. Em C, filamentos de septinas em diversos organismos observados por microscopia eletrônica: septinas de *C. elegans* produzido em *E. coli* (a), septinas de *S. cerevisiae* (b), septinas de *X. leavis* (c) septinas de *D. melanogaster* (d). As barras de escala representam 50 nm, 100 nm, 100 nm em (a), (b) e (c), respectivamente.

Fonte: (A) Adaptada de DOLAT; HU; SPILIOTIS (85); (B) Adaptada de FUNG; DAI; TRIMBLE (91); (C) (a) Adaptada de JOHN et al. (119); (b) Adaptada de FIELD; KELLOGG (105); (c) Adaptada de FIELD; AL-AWAR, et al. (1); (d) Adaptada de MENDOZA; HYMAN; GLOTZER. (94)

2 OBJETIVOS

Uma vez que as septinas exercem suas funções reunidas em complexos protéicos, idealmente esses seriam o meio de se obter informações mais precisas. Porém, trabalhar com tais complexos, triméricos ou tetraméricos, não é trivial. Para contornar essa dificuldade, buscou-se um modelo de estudo envolvendo as interfaces que permitem sua polimerização.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho constituiu em avaliar tanto a importância da região C-terminal na seleção de parceiros para interação septina-septina via interface NC, quanto a importância do nucleotídeo para a dimerização, via interface G na formação do heterocomplexo.

Fundamentado nesses objetivos, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) clonar, expressar e purificar as construções de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}, SEPT2G, SEPT2G^{T78M}, SEPT2G^{D185N}, SEPT6G;
- b) determinar o estado oligomérico das proteínas obtidas por cromatografia de exclusão molecular;
- c) avaliar a estabilidade térmica estrutural dos possíveis heterocomplexos e das proteínas individuais SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}, utilizando espectroscopia de dicroísmo circular;
- d) determinar a constante de afinidade para os heterodímeros SEPT7GC-SEPT6G, SEPT7GC-SEPT2G_{6C} por ressonância plasmônica de superfície;
- e) analisar o teor de nucleotídeo e atividade GTPásica nos mutantes de SEPT2G.

Posteriormente, com a construção do heterodímero SEPT6G-SEPT2G em mãos, estendeu-se o objetivo inicial, buscando identificar fatores na formação dos complexos fisiológicos de septinas que pudessem influenciar na formação de agregados protéicos do tipo amilóides. Para isso, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- f) otimizar a co-purificação do heterodímero SEPT6G-SEPT2G;
- g) avaliar a estabilidade estrutural térmica do heterodímero SEPT6G-SEPT2G por espectroscopia de dicroísmo circular;
- h) analisar a propensão do heterodímero SEPT6G-SEPT2G na formação de agregados do tipo amilóides pela utilização da sonda fluorescente Thioflavina-T (ThT), de forma comparativa às subunidades isoladas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagens e construção dos sistemas de expressão

3.1.1 Linhagens bacterianas, vetores, meios e condições de cultivo

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi utilizada para fins de propagação de DNA plasmidial e clonagens, já que a mesma permite a triagem azul/branca de colônias transformadas após inserção de DNA exógeno de interesse. Além disso, mutações específicas (recA1 e endA1) aumentam a estabilidade do inserto e melhoram a qualidade do DNA plasmidial extraído.

A linhagem escolhida para expressão das proteínas heterólogas foi a Rosetta (DE3) (Novagen), também de *E. coli*, uma vez que os genes que codificam tRNAs para seis códons raros para *E. coli* estão presentes no plasmídeo pRARE, inserido na linhagem, o qual possui marca de seleção para o antibiótico cloranfenicol (34 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, a linhagem possui o gene que codifica a T7 RNA polimerase, sob o controle do promotor *lac*.

O plasmídeo pET28a(+) (Novagen) permite que o gene de interesse clonado seja transcrito fusionado a códons de histidina na porção amino-terminal da proteína. A cauda com seis resíduos de histidina permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade a metal (níquel ou cobalto). O plasmídeo também possui os códons para um sítio de reconhecimento para a protease trombina, localizado entre a cauda de histidinas e o sítio múltiplo de clonagem (*multiple cloning sites* – MCS), e gene de resistência à canamicina (30 $\mu\text{g/mL}$). O plasmídeo pET-TEV é uma versão modificada do pET28a, ao qual se diferencia por possuir um sítio de reconhecimento da protease viral Tev no lugar do sítio de trombina.

O plasmídeo pET SUMO (Invitrogen) utiliza a fusão amino-terminal com uma pequena proteína modificadora relacionada à ubiquitina (*small ubiquitin-related modifier* – SUMO) para aumentar a solubilidade das proteínas expressas em fusão. Após a expressão, a porção SUMO (12 kDa) fusionada à seis resíduos de histidina, também amino-terminal, pode ser clivada pela protease SUMO (ULP-1) em sítio de reconhecimento específico localizado no carboxi-terminal. O plasmídeo confere ainda resistência à canamicina (30 $\mu\text{g/mL}$).

O plasmídeo pET-Duet (Novagen) é projetado para coexpressão de dois genes-alvo, codificando dois sítios múltiplos de clonagem. O plasmídeo pRSF-Duet (Novagen) é uma variação do pET-Duet, cujas diferenças essenciais consistem na origem de replicação e na marca de seleção, sendo o primeiro resistente à canamicina (30 $\mu\text{g/mL}$) e o segundo à

ampicilina (50 µg/mL), o que possibilita a transformação de ambos plasmídeos na mesma célula e expressão de até quatro proteínas diferentes.

As culturas de *E. coli* DH5α e Rosetta(DE3), previamente estocadas a -80 °C foram cultivadas conforme demanda em meio Lysogeny Broth (LB) da Sigma, a 37 °C e 250 rpm.

3.1.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular

Os kits de extração de DNA plasmidial e os vetores de clonagem foram adquiridos da Promega (www.promega.com). As enzimas de restrição e DNA polimerase foram adquiridas da Fermentas-Thermo Scientific. Ampicilina, canamicina e cloranfenicol foram adquiridos da Sigma.

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica ou superior. Técnicas de biologia molecular foram feitas em métodos padronizados (130), ou como detalhadas ao longo do trabalho.

3.1.3 Obtenção da proteína quimérica

O DNA codificante da proteína quimérica SEPT2Gα0_{6C} foi sintetizado comercialmente, sendo que a determinação das regiões Gα0 de SEPT2 e C de SEPT6 foi realizada como já descrito para SEPT4. (131) A empresa Genone-Soluções em Biotecnologia (<http://www.genone.com.br/>) sintetizou o gene flanqueado pelos sítios de restrição específicos em vetor pBluescript II SK(-). Cerca de 2 µg de DNA plasmidial adquirido foi submetido à dupla digestão com as enzimas específicas *Bgl*II e *Xho*I (20 U de cada) e o produto da digestão foi então submetido à eletroforese em gel de agarose para purificação do fragmento clonado, por meio do kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega). O fragmento purificado foi utilizado em reação convencional de ligação (50 ng vetor, razão molar vetor/inserto 3:1, 5 U T4 DNA ligase (Fermentas) e [1X] tampão da enzima) para subclonagem no vetor pRSF-Duet (MCS2), previamente digerido com as mesmas enzimas, *Bgl*II e *Xho*I, e purificado de gel de agarose. Após incubação por 16 horas a 4 °C, o plasmídeo resultante foi então utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5α competentes por tratamento com cloreto de cálcio (132) para fins de propagação e extração de DNA plasmidial. As células foram plaqueadas em meio LB contendo canamicina (30 µg/mL). Clones positivos (os quais apresentaram resistência ao antibiótico) foram confirmados por

dupla digestão do DNA plasmidial com endonucleases *Bgl*III e *Xho*I, em eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA).

3.1.4 Construções presentes no banco de plasmídeos

A partir de uma biblioteca comercial de cDNA de cérebro fetal humano, diversas construções das septinas humanas foram clonadas e subclonadas previamente em vetores de expressão por outros membros do grupo. Sendo assim, tais construções foram utilizadas nesse trabalho como molde específico para as amplificações das construções desejadas ou para subclonagem em outros vetores de expressão (Tabela 4).

Tabela 4 – Construções de septinas humanas, clonadas previamente e armazenadas no banco de plasmídeos do grupo de pesquisa, que foram utilizadas no presente trabalho.

As construções foram elaboradas com base nas sequências depositadas no Gen Bank, código de acesso NM_001008491.1 para septina 2, NM_015129.5 para septina 6 e NM_001788.4 para septina 7.

Nome	Vetor	Sítios de clonagem	Tamanho (pb)	Seq AA correspondente
SEPT7GCα0-His	pET-Duet (MCS 1)	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	1221	13-418
SEPT6GCα0	pRSF-Duet (MCS 1)	<i>Nco</i> I/ <i>Sal</i> I	1215	24-427
SEPT2NGC-His	pET-TEV	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	1086	1-361
SEPT2G-His	pET-TEV	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	825	35-308
*SEPT2Gα0 _{6C}	pRSF-Duet (MCS 2)	<i>Bgl</i> III/ <i>Xho</i> I	1224	19-300/303-427

*A construção foi obtida comercialmente, inserida no banco de plasmídeos do grupo e utilizada como molde para amplificação, posteriormente.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.5 Desenho de oligonucleotídeos para amplificação das construções de interesse

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados com base na sequência depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), código de acesso NM_001008491.1 para septina 2, NM_015129.5 para septina 6 e NM_001788.4 para septina 7. Além disso, foram acrescentados aos oligonucleotídeos sítios de restrição para endonucleases específicas, possibilitando posterior subclonagem em vetor de expressão. Os oligonucleotídeos foram desenhados conforme apresentado no apêndice A e sintetizados pela Life Technologies (<<http://www.invitrogen.com.br/>>).

3.1.6 Isolamento e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse

O isolamento dos fragmentos gênicos de interesse foi feito por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando-se o fragmento gênico referente à região codificante do gene de interesse, a partir do banco de plasmídeos do laboratório, para posterior construção de um sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. A amplificação foi realizada em um termocilador *Veriti 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) segundo a reação descrita na Tabela 5.

Tabela 5 – Reagentes, e quantidades dos mesmos, utilizados na reação de amplificação.

Reagente	Quantidade
DNA plasmidial (molde)	10 ng
Oligonucleotídeo forward	10 pMol
Oligonucleotídeo reverse	10 pMol
<i>High Fidelity PCR Enzyme Mix</i> (Fermentas)	1,5 U
Tampão da enzima (+MgCl ₂)	[1x]
dNTPs	10 nMol
Água MilliQ	q.s.p. 50 µL
Volume Final	50 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

O termociclador foi programado para realizar os ciclos descritos abaixo (Tabela 6).

Tabela 6 – Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.

Etapa da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Repetição
Desnaturação inicial	94	3	1x
Desnaturação	94	0,5	35x
Hibridização	Tm-5	0,5	
Extensão	72	1,5	
Extensão Final	72	10	1x

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel de agarose (0,8 %) em tampão TAE contendo brometo de etídeo, por meio do *kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega), e utilizados em reação convencional de ligação (50 ng vetor, razão molar vetor/inserto 3:1, 5 U T4 DNA ligase (Fermentas)) no vetor pUC19 (AddGene). A reação de ligação, após incubação por 16 horas a 4 °C, foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5α competentes por tratamento com cloreto de cálcio. (132) As células

transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 80 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-piranosídeo (X-Gal). As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C para a visualização de colônias transformadas por seleção azul/branca. Algumas colônias brancas foram cultivadas e submetidas à extração de DNA plasmidial para averiguação de clones positivos por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases específicas, seguida de análise por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8 %.

O clone positivo segundo análise descrita foi submetido a sequenciamento de DNA pelo método do didesoxinucleotídeo marcado (133) no aparelho *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante.

3.1.7 Construção dos mutantes

Os mutantes sítio-dirigidos foram sintetizados *in vitro* por amplificação do DNA plasmidial com o gene selvagem clonado, via PCR, utilizando oligonucleotídeos internos que continham a mutação desejada (apêndice B), a fim de amplificar o plasmídeo integralmente. Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa QuikChange® Primer Design (http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=80266).

A amplificação foi realizada em um termocilador *Veriti 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) segundo o descrito abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Reagentes, e quantidades dos mesmos, utilizados na reação de amplificação.

Reagente	Quantidade
DNA plasmidial (molde)	50 ng
Oligonucleotídeo forward	250 ng (~ 20 pMol)
Oligonucleotídeo reverse	250 ng (~ 20 pMol)
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent)	5 U
Tampão da enzima	[1x]
dNTPs	20 nMol
Água MilliQ	q.s.p. 100 µL
Volume Final	100 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

O termociclador foi programado para realizar os seguintes ciclos (Tabela 8).

Tabela 8 – Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.

Etapa da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Repetição
Desnaturação inicial	95	3	1x
Desnaturação	95	0,5	16x
Hibridização*	51-53-55-57-59	1	
Extensão	68	5	

* A reação descrita na Tabela 7 foi dividida em 5 alíquotas de 20 µL a fim de testar as diferentes temperaturas de hibridização.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos de PCR foram incubados por 4 horas a 37 °C com 10 U da enzima *DpnI* (ThermoScientific) e, posteriormente, foram usados para transformar células de *E. coli* DH5α competentes. (132) As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo 30 µg/mL de canamicina e incubadas por 16 horas, a 37 °C. Algumas colônias foram cultivadas e submetidas à extração de DNA plasmidial para averiguação de clones positivos (Tabela 9) por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases específicas, seguida de análise por eletroforese em gel TAE agarose 0,8 %. Um clone positivo foi submetido ao sequenciamento de DNA (133) no aparelho *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante.

Tabela 9 – Construções mutantes de septinas humanas utilizadas no presente trabalho.

Nome	Vetor	Sítios de clonagem	Tamanho (pb)	Seq AA correspondente
SEPT2G ^{T78M}	pRSF-Duet (MCS 2)	<i>NdeI/XhoI</i>	825	35-308
SEPT2G ^{D185N}	pRSF-Duet (MCS 2)	<i>NdeI/XhoI</i>	825	35-308

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.8 Construção dos sistemas de expressão

Cerca de 2 µg de DNA plasmidial de interesse foi submetido à dupla digestão total com as enzimas específicas e o produto da digestão foi então submetido à eletroforese em gel de agarose para purificação do fragmento de DNA. Após purificado, o fragmento foi subclonado no vetor de expressão desejado, após prévia digestão desse com as mesmas enzimas, seguida de reação de ligação convencional. O plasmídio resultante (Tabela 10) foi

então utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α competentes por tratamento com cloreto de cálcio (132), para fins de propagação do DNA plasmidial. As células foram plaqueadas em meio LB contendo antibióticos de seleção específicos de acordo com cada vetor de expressão, como descrito no item 3.1.1, e os clones positivos (os quais apresentaram resistência ao antibiótico) foram confirmados por análise de restrição.

Tabela 10 – Construções de septinas humanas clonadas que foram utilizadas no presente trabalho.

Nome	Vetor	Sítios de clonagem	Tamanho (pb)	Seq AA correspondente
SEPT7GC-His	pET SUMO	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	1173	29-418
SEPT6GC-His	pET SUMO	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	1167	40-427
SEPT2GC-His	pET SUMO	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I	984	35-361
SEPT2G _{6C} -His	pET SUMO	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1176	35-300/303-427
SEPT2G ^{T78M} -His	pET28a	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	825	35-308
SEPT2G ^{D185N} -His	pET28a	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	825	35-308
SEPT2G	pRSF-Duet (MCS 2)	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	825	35-308
SEPT6G-His	pET-Duet (MCS 1)	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	801	40-305

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Expressão heteróloga

Os vetores de expressão obtidos foram utilizados na transformação de *E. coli* Rosetta (DE3) competentes por tratamento com cloreto de cálcio. (132) Uma colônia isolada dos transformantes foi inoculada em LB líquido adicionado de antibiótico específico para posteriores ensaios de expressão. Esta foi induzida com IPTG 0,2 mM, adicionado na fase *mid-log* de crescimento populacional bacteriano (D.O. 600 nm entre 0,6 e 0,8). A cultura foi posteriormente incubada por 16 horas, a 18 °C, em agitador orbital a 200 rpm. Ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação (6000 g; 40 min; 4 °C), ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 25 mM pH 7,8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercapetanol 5 mM e 5 % de glicerol) e lisadas por pulsos de ultrassom (Fisher Scientific – *Sonic Dismembrator Model 500*) sob banho de gelo.

3.3 Purificação e preparação das amostras

3.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade

3.3.1.1 Construções em pET SUMO

Após a lise, a fração solúvel do lisado foi separada dos particulados insolúveis por centrifugação (6000 g; 20 min; 4 °C) e alíquotas destas, bem como alíquotas representando proteínas totais antes e depois da indução, foram submetidas à SDS-PAGE. A fração solúvel foi filtrada em papel de filtro e aplicada numa coluna de 2 mL de Ni-NTA (Qiagen) , pré-equilibrada com 10 vol de coluna de tampão de lise. Após a passagem do extrato bruto, a coluna foi lavada com 10 vol de tampão de lise, seguido de mais 10 vol de tampão de lise acrescido de 0,1 % de Triton; 10 vol de tampão de lise contendo 10 mM de imidazol, e 10 vol de tampão de lise. Após as lavagens, a resina com a proteína imobilizada foi incubada com 2 vol de tampão de lise acrescido de sumo protease e posterior eluição em 5 vol de coluna da proteína purificada. A purificação foi feita à 4 °C (geladeira) sob vazão por gravidade.

3.3.1.2 Coexpressões e construções em pET28 e pET-TEV

Após a lise das células, a fração solúvel do lisado foi separada dos particulados insolúveis por centrifugação (6000 g; 20 min; 4 °C) e alíquotas destas, bem como alíquotas representando antes e depois da indução, foram submetidas à SDS-PAGE. A fração solúvel foi filtrada em papel de filtro e aplicada sobre uma coluna de Ni-NTA (Qiagen) de 2 mL, pré-equilibrada em tampão de lise (10 vol). Após a passagem do extrato bruto, a coluna foi lavada com 20 vol de tampão de lise acrescido de 0,1 % de Triton e imidazol 5 mM, seguido de 10 vol de tampão de lise acrescido de imidazol 10 mM. A proteína foi eluída em 3 vol de tampão de lise com imidazol 400 mM e analisada em SDS-PAGE. A purificação foi feita à 4 °C (geladeira) sob vazão por gravidade.

3.3.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular

Na segunda etapa do processo de purificação, as proteínas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular para separação de agregados protéicos e contaminantes. Para as proteínas expressas individualmente, amostras de 1 mL das proteínas provenientes da

cromatografia de afinidade foram aplicadas na coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi pré-equilibrada com o tampão de lise modificado (Tris-HCl 25 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercapetanol 5 mM e 5 % de glicerol) e acoplada a um sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare Life Sciences). A cromatografia foi realizada com uma eluição isocrática de 1,3 volume total da coluna, sob um fluxo de 0,5 mL/min e monitorada pela absorbância a 280 nm. Frações de 1 mL dos picos de interesse foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE. Para as proteínas co-expressas, a coluna utilizada foi a HiLoad Superdex 200 16/600 GL (GE Healthcare Life Sciences), com fluxo de 1,0 ml/min, pois a mesma permite maior resolução entre os picos do heterodímero e o excesso da proteína monomérica, garantindo uma amostra mais homogênea e pura.

3.3.3 Preparo das amostras

As proteínas foram produzidas conforme demanda, seguindo as etapas de expressão e lise bacteriana descritas anteriormente, utilizando-se 1 L de meio LB. As etapas de purificação sofreram modificações na composição dos tampões de lise e eluição, quando necessário, por restrição do experimento seguinte (apêndice C). Ao final da purificação, as proteínas purificadas foram concentradas em sistema de ultrafiltração (Millipore), *cutoff* de 10 kDa, para as proteínas individuais, e de 30 kDa, para aquelas coexpressas, aliquotadas e estocadas a -80 °C até a utilização nos experimentos biofísicos. A concentração das amostras foi determinada por absorbância em 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar calculado. (134)

3.4 Estudo da interface NC heterodimérica

3.4.1 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}

A massa molecular das construções recombinantes foi inicialmente determinada por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), utilizando-se padrões de massa molecular disponíveis no *Gel Filtration Calibration Kits* (GE Healthcare Life Sciences). Os padrões utilizados foram ribonuclease A (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (44 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa) com Abs₂₈₀ = 0,8; e ferritina (440 kDa) com Abs₂₈₀ = 1,2. O

Blue Dextran 2000 a 1 mg/mL foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão da coluna. Todos os padrões foram preparados em água. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 0,5 mL/min, com um volume total de eluição de 1,3 volume de coluna, sendo monitorada pela absorbância a 280 nm, e amostras de 1 mL foram aplicadas na coluna. Os volumes de eluição dos padrões e das proteínas foram determinados e utilizados para o cálculo de K_{av} usando a equação 1:

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

onde: V_e = volume de eluição de cada proteína;

V_0 = volume de exclusão da coluna;

V_c = volume total da coluna.

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

3.4.2 Estabilidade térmica dos possíveis heterodímeros por dicroísmo circular

Alíquotas de 200 μ L de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6c} a 3 μ M foram analisadas em um espectropolarímetro Jasco J815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura (*Peltier*), numa cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, no intervalo de 195 a 280 nm. Os espectros de CD foram coletados como uma média de 6 varreduras para cada espectro, a temperatura ambiente.

A fim de verificar a estabilidade do heterodímero SEPT7GC-SEPT2G_{6c} de forma comparativa a SEPT7GC-SEPT2GC e SEPT7GC-SEPT6GC, as proteínas foram incubadas, duas a duas, por 12 horas à 4 °C. SEPT7GC-SEPT2GC foi utilizada como controle negativo da interação, enquanto SEPT7GC-SEPT6GC foi utilizada como controle positivo da interação. As alíquotas foram então submetidas a um gradiente de temperatura de 10 a 50 °C, com incrementos de 5 °C e incubação de 5 minutos em cada temperatura antes das medidas. Para a construção das curvas de desnaturação, o mínimo situado em $\theta = 222$ nm foi monitorado e as curvas foram plotadas relacionando a temperatura com fração de proteína desnaturada (f_D), calculada a partir da equação 2:

$$f_D = \frac{\theta_{obs} - \theta_0}{\theta - \theta_0} \quad (2)$$

onde: θ_{obs} = valor da elipsidade medida ao longo da variação;

θ = valor da elipsidade em 50 °C;

θ_0 = valor da elipsidade em 10 °C.

3.4.3 Afinidade entre os possíveis heterodímeros por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A construção SEPT7GC foi utilizada como ligante e as demais construções, como analito, sendo SEPT2GC controle de não ligação e SEPT6GC controle positivo de ligação. O tampão utilizado na corrida foi o mesmo de estocagem (apêndice C) e as medidas foram realizadas no Biacore X (GE *Healthcare*). Uma alíquota de 14 µL de SEPT7GC (28 µM) foi diluída em 186 µL de tampão acetato, pH 5,5, a fim de obter uma solução com concentração final de 2 µM (90 µg/mL) para imobilização covalente por acoplamento amina no *Sensor Chip CM5* (GE *Healthcare*).

A ativação dos grupos carboxil da matriz de dextrana do chip é realizada pela adição, sob fluxo de 5 µL/min durante 5 min, de uma mistura de N-hidroxissuccinimida (NHS) a 0,1 M e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) a 0,4 M, formando grupos ésteres. O ligante, SEPT7GC em tampão acetato pH 5,5, foi então injetado, sob fluxo de 5 µL/min durante 4 min, sobre a superfície ativada e os grupos ésteres ativos reagiram espontaneamente com as aminas primárias para ligar covalentemente o ligante à matriz de dextrana. Em seguida, para desativação dos ésteres remanescentes, foi adicionada etanolamina-HCl pH 8,5 a 1 M, sob fluxo de 5 µL/min durante 3 min.

O preparo dos analitos para o ensaio de cinética constituiu em uma diluição seriada de alíquotas concentradas de SEPT2GC, SEPT6GC e SEPT2G_{6C} no tampão de corrida a fim de serem obtidas concentrações finais de 4 µM, 2 µM, 1 µM, 500 nM, 250 nM e 125 nM. As amostras foram injetadas em duplicata sob fluxo de 10 µL/min durante 2 min cada, e 10 min de tempo de dissociação. Entre as injeções foram aplicadas alíquotas arbitrárias de MgCl₂, a no máximo 4M, ou NaOH, a no máximo 50 mM, para regeneração do chip, ou seja, desligamento do analito que não se dissociou no tempo *delay*.

As constantes de dissociação foram, então, determinadas pelo *software* BIAevaluation utilizando o ajuste de cinética *Two State Reaction (conformation change)*, visando o melhor ajuste das curvas e o menor valor para χ^2 .

3.5 Estudo da interface G heterodimérica

3.5.1 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2G, SEPT2G^{T78M}, SEPT2G^{D185N}, SEPT6G e coexpressões

Foi realizado como descrito no item 3.4.1.

3.5.2 Análise do teor de nucleotídeo em SEPT2G, SEPT2G^{T78M}, SEPT2G^{D185N}, SEPT6G e SEPT6G-SEPT2G

Amostras de proteínas purificadas apenas por cromatografia de afinidade foram preparadas para análise do teor de nucleotídeo, verificando a presença e natureza de possíveis nucleotídeos ligados ao domínio GTPásico, segundo o método descrito por Seckler e colaboradores, com algumas modificações. (135) Adicionaram-se 250 μ L de ácido perclórico (HClO_4) a 1,5 M gelado em 500 μ L de proteína a, no mínimo, 30 μ M. A mistura foi incubada no gelo durante 10 minutos e em seguida as proteínas, então desnaturadas, foram removidas por centrifugação (16000 g; 10 min; 4 °C). Com o objetivo de neutralizar o pH e precipitar o perclorato (ClO_4^-) na forma de sal (KClO_4), 600 μ L do sobrenadante foram transferidos para um microtubo novo e foram adicionados 100 μ L de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) a 1 M, 100 μ L de hidróxido de potássio (KOH) a 3 M e 80 μ L de ácido acético (CH_3COOH) a 5M, gelados. Em seguida as amostras foram congeladas a -20 °C por, no mínimo, 1 hora.

O teor de nucleotídeo foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Para realizar o ensaio, as amostras tratadas foram descongeladas e centrifugadas (16000 g; 10 min; 4 °C). A seguir, 200 μ L do sobrenadante foram aplicados em uma coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE 5 PW*, 7,5 mm x 7,5 cm. As análises foram realizadas em um cromatógrafo *Waters Alliance 2695 HPLC System* e a absorbância a 253 nm foi monitorada durante o experimento. Foram utilizados dois tampões diferentes durante a cromatografia: tampão A (25 mM de Tris, pH 7,8) e tampão B (25 mM de Tris, pH 7,8, adicionado de 1 M de NaCl). As condições de gradiente de NaCl utilizado estão descritas da Tabela 11. Uma curva padrão de GDP e GTP (70 μ M) diluídos no

mesmo tampão da proteína (apêndice C), submetidos ao mesmo tratamento descrito anteriormente, foi obtida e utilizada como controle, juntamente com a solução tampão da proteína também tratada. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, o fluxo utilizado foi de 1 mL/min, e cada amostra da triplicata foi submetida a três leituras independentes na cromatografia.

Tabela 11 – Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5.3 Teste de atividade GTPásica de SEPT2G e SEPT2G^{T78M}

O teste de atividade foi realizado com a amostra de proteína recém eluída da cromatografia de afinidade, com a solução tampão descrita no apêndice C. Neste experimento, foi monitorada a presença do nucleotídeo hidrolisado, GDP, por HPLC ao longo do tempo de incubação da proteína com o GTP. Cerca de 20 μ M de cada proteína foram incubados com 60 μ M de GTP por 2 horas a 20 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 10 minutos na primeira hora e 20 minutos na segunda hora e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para que a reação fosse interrompida. As amostras foram posteriormente tratadas com ácido perclórico e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito no item 3.5.2 para análise de teor de nucleotídeo. O teste foi realizado em triplicata experimental e a leitura da cromatografia foi realizada três vezes para cada amostra de cada repetição.

3.5.4 Western Blot

Uma vez que os domínios expressos SEPT2G e SEPT6G-His têm tamanhos muito próximos, não é possível a distinção de duas bandas no gel de poliacrilamida. Para verificar a expressão e copurificação dos domínios em questão, foi realizada a transferência das bandas

protéicas para uma membrana de celulose e posterior incubação e revelação por fosfatase alcalina, seguindo um protocolo de *western blot*.

Após a eletroforese, um dos géis foi incubado por uma hora no tampão de transferência para *western* (25 mM de Tris, 20 mM de glicina, 0,02 % (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 20 % de metanol). Os filtros e a membrana de nitrocelulose foram incubados por 10 minutos no mesmo tampão. O gel, a membrana e os papéis de filtro foram montados (nesta ordem, de baixo para cima: papel filtro - membrana - gel - papel filtro) na cuba semi-seca BioRad para transferência e mantidos a 15 V por 60 minutos.

Após a transferência, a membrana foi incubada em 20 mL de solução TBS-T (100 mM de Tris, pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % (v/v) de Tween 20) acrescido de 5 % (p/v) de leite em pó desnatado (*Molico*), por 16 horas, sob agitação constante, a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T quatro vezes por 5 minutos, e incubada por duas horas com 15 mL da solução TBS-T, leite em pó 5% e anticorpo primário, Septin 2 antibody [N1N3] (*Gene Tex*), com diluição v/v de 1:3000. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e incubada por uma hora com 15 mL de solução TBS-T, leite em pó 5 % e anticorpo secundário, anti-rabbit IgG (Sigma), com diluição v/v 1:5000. Seguiu-se, então, mais quatro lavagens de cinco minutos com TBS-T e revelação da membrana por fosfatase alcalina (BioRad) por 10 minutos, seguindo protocolo do *kit* (800 µL de Tampão 25x, 200 µL de Reagente A, 200 µL de Reagente B e H₂O q.s.p. 20 mL). SEPT2GC e SEPT6G foram expressas e purificadas independentemente para serem usadas como controle positivo e negativo, respectivamente, da especificidade do anticorpo comercial utilizado.

3.6 Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides

3.6.1 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico, e verificação de homogeneidade da amostra por cromatografia de exclusão molecular acoplada à espalhamento de luz à múltiplos ângulos (SEC-MALS)

Amostras do heterodímero SEPT6G-SEPT2G, preparadas como descrito no apêndice C, foram descongeladas e submetidas à troca de tampão, visando diminuir a quantidade de aditivos para que os mesmos não interferissem nas medidas e possibilitando a comparação dos resultados dos experimentos já publicados para SEPT2G. (136) Para a troca de tampão foram utilizadas colunas pré-empacotadas com *Sephadex G-25 (PD SpinTrap G-25 – GE*

Healthcare Life Sciences). A coluna foi equilibrada com o novo tampão (25 mM Tris, pH 7,8 e 10 % glicerol) adicionando 400 μ L do mesmo e centrifugando (800 g; 1 min; 4 °C), por 5 vezes. Em seguida, 180 μ L de proteína foram aplicados na coluna e eluídos por centrifugação (800 g; 2 min; 4 °C).

Alíquotas de 20 μ L a 2 mg/mL foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular *WTC-030N5* (Wyatt Technology) e analisadas por HPLC em um cromatógrafo *Waters 600 Controler*. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 0,3 mL/min, com um volume total de eluição de 6 mL em tampão Tris 25mM , pH 7,8 e 10 % glicerol.

Acoplado à cromatografia, o sistema *mini DAWN TREOS* (Wyatt Technology) determina a distribuição de massa, tamanho e composição, independente da calibração da coluna por padrões referenciais, e o sistema *OptiLab T-rEX* (Wyatt Technology) determina o índice de refração diferencial. O estado oligomérico e a polidispersividade da amostra foram, então, determinados pelo processamento dos dados utilizando *software ASTRA7* (Wyatt Technology).

3.6.2 Influência da temperatura na estrutura secundária do heterodímero SEPT6G-SEPT2G analisado por dicroísmo circular (CD)

Alíquotas de 200 μ L de SEPT6G-SEPT2G a 3 μ M, previamente submetidas à troca de tampão como descrito no item 3.6.1 (25 mM Tris, pH 7,8 e 10 % de glicerol), foram analisadas em um espectropolarímetro *Jasco J815 CD Spectrometer* (Toquio, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura (*Peltier*), com uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, no intervalo de 195 a 280 nm. Os espectros de CD foram coletados como uma média de 16 varreduras para cada espectro, nas temperaturas de 15, 25, 37, 45, 50, 55, 60 e 70 °C. O tempo de incubação em cada temperatura foi de 30 minutos. Alíquotas de SEPT6G também foram submetidas à mesma experimentação, nas temperaturas de 15, 25, 37, 45 e 60 °C, e os resultados, junto com os já publicados para SEPT2G (136), foram utilizados como controles.

3.6.3 Espectroscopia de fluorescência com Thioflavina T (ThT) com SEPT6G-SEPT2G

A propensão do heterodímero SEPT6G-SEPT2G em formar fibras amilóides foi avaliada por incubação de 5 μ M de SEPT6G-SEPT2G, previamente submetida à troca de tampão como descrito no item 3.6.1 (25 mM Tris, pH 7,8 e 10 % de glicerol), com 50 μ M de

ThT (Sigma) nas temperaturas de 25, 37, 45, 55, 60 e 65 °C. As amostras foram excitadas a 450 nm (com fenda de 0,1 cm) e os dados foram coletados a 482 nm (com fenda de 0,05 cm) durante 5400 segundos, imediatamente após adição e homogeneização do ThT à amostra. As medidas foram realizada em um fluorímetro ISS-K2, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A solução estoque da sonda fluorescente, ThT, foi preparada a 10 mM em água. Alíquotas de SEPT6G também foram submetidas à mesma experimentação, nas temperaturas de 15, 25, 37 e 45 °C, e os resultados, junto com os já publicados para SEPT2G (136), foram utilizados como controles.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo da interface NC heterodimérica

Buscando avaliar a importância da região C-terminal na seleção de parceiros para interação septina-septina na composição de heterocomplexos, uma septina quimérica foi produzida de forma que o C-terminal de SEPT6 substituiu o mesmo domínio na estrutura da SEPT2G, gerando a quimera SEPT2G_{6C}. Lembrando que SEPT2 e SEPT7 não interagem, a proteína quimérica foi avaliada em termos de afinidade e estabilidade na formação do complexo com SEPT7GC. Todas as proteínas foram destituídas do domínio N-terminal, afim de excluir uma potencial interferência deste nas interações avaliadas.

4.1.1 Amplificação e clonagem de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}

A construção quimérica SEPT2G_{6C} foi primeiramente pensada com as regiões GCα0 e, portanto, adquirida como SEPT2Gα0_{6C} da Genone-Soluções em Biotecnologia. Tal construção foi sintetizada em plasmídeo de propagação pBSK com sítios de restrição específicos flanqueando o fragmento de interesse, com 1224 pb, e permitindo, assim, a transferência para o vetor de expressão pRSF-Duet (Figura 10).

Figura 10 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2Gα0_{6C}.

Em A e B, o padrão de restrição dos clones de SEPT2Gα0_{6C} em vetores de propagação, pBSK (2958 pb), e expressão, pRSF-Duet (3829 pb), respectivamente, submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas. (M) corresponde ao padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) em todas as imagens; (1) pBSK_SEPT2Gα0_{6C} após dupla digestão com *Bgl*II e *Xho*I; (2) pRSF-Duet_SEPT2Gα0_{6C} após dupla digestão com *Bgl*II e *Xho*I. As massas das bandas do padrão de massa molecular relevantes estão indicadas à esquerda de cada imagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como a hélice $\alpha 0$ trata-se de uma pequena região polibásica entre a região N-terminal e o domínio GTPásico, rica em aminoácidos carregados positivamente, e comumente envolvida com associação à membranas celulares, optou-se por removê-la para seguir as análises de interação. Sendo assim, a quimera adquirida comercialmente foi inserida em nosso banco de plasmídeos e seguiram-se as amplificações necessárias para o presente trabalho.

A partir do DNA plasmidial de construções presentes banco de plasmídeos do grupo de pesquisa, os pares de oligonucleotídeos (apêndice A) foram utilizados em reações convencionais de PCR. Após a amplificação, alíquotas das reações de PCR foram então submetidas à análise em gel de agarose (0,8 %) que confirmou sucesso na amplificação dos fragmentos de interesse. Na Figura 11 podem ser visualizadas as bandas correspondentes a 984 pb, 1167 pb, 1173 pb e 1176 pb, referentes as regiões codificantes de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}, respectivamente.

Figura 11 – Análise do produto de amplificação de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C}. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % TAE [1x]. (M) corresponde ao padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); produtos de PCR de SEPT2GC (1), SEPT6GC (2), SEPT7GC (3); e SEPT2G_{6C} (4).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos amplificados foram então inseridos no vetor de propagação pUC19 para sequenciamento e, a seguir, subclonados em vetor de expressão pET SUMO (Figura 12).

Figura 12 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C}.

Em A e B, o padrão de restrição dos clones em vetores de propagação, pUC19 (2686 pb), e expressão, pET SUMO (5643 pb), respectivamente, submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas. (M) corresponde ao padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) em todas as imagens; (1) clone de SEPT2GC após dupla digestão com *EcoRI* e *XhoI*; (2) clone de SEPT6GC após dupla digestão com *BamHI* e *HindIII*; (3) clone de SEPT7GC após dupla digestão com *BamHI* e *HindIII*; (4) clone de SEPT2G_{6C} após dupla digestão com *EcoRI* e *HindIII*.

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor de expressão escolhido adiciona à porção N-terminal da proteína de interesse a proteína SUMO e seis resíduos de histidina, sequencialmente, aumentando cerca de 14 kDa à massa molecular da proteína expressa. A partir da estrutura primária da proteína, alguns parâmetros físico-químicos necessários para análises posteriores foram determinados pela ferramenta ProtParam do ExPASy (Tabela 12).

Tabela 12 – Características físico-químicas das construções GC para SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2₆, após clivagem com SUMO protease.

Construção	Número aa	Massa molecular (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	Coefficiente de extinção (280 nm)	Abs _{280nm} 0,1 %
SEPT2GC	330	37 998,4	5,63	17 420	0,458
SEPT6GC	389	44 909,2	6,45	20 400	0,454
SEPT7GC	391	45 624,2	8,08	31 400	0,688
SEPT2G _{6C}	394	45 819,1	5,78	18 910	0,413

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Expressão heteróloga e purificação

A síntese das proteínas foi feita em *E. coli* Rosetta (DE3), após transformação dessas com o vetor de expressão. As colônias transformantes foram inoculadas em LB líquido adicionado de antibióticos de seleção específicos e incubadas por 16 horas a 18 °C após

indução com 0,2 mM de IPTG. Análise por SDS-PAGE 15 % verificou tanto a expressão quanto a solubilidade das proteínas produzidas (Figura 13). A cauda de histidinas N-terminal presente no produto de expressão permitiu a imobilização das proteínas de interesse ao Níquel imobilizado na coluna, seguindo-se a clivagem pela SUMO-protease. O produto de expressão clivado foi eluído da coluna e analisado por SDS-PAGE 15 % (Figura 13). Buscando aumentar o grau de pureza e homogeneidade das amostras para os experimentos subsequentes, após a cromatografia por afinidade, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular (Figura 13).

(continua)

(continuação)

Figura 13 – Análise da expressão e purificação das construções com as regiões GC de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2₆.

Em A, C, E e G, SDS-PAGE 15 % do perfil de expressão e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C}, respectivamente. (M) corresponde ao padrão de massa molecular, em kDa, indicado à esquerda das imagens; (1) extrato protéico bruto antes da adição de IPTG; (2) extrato protéico bruto após indução com IPTG por 16 horas a 18 °C; (3) fração insolúvel após lise celular; (4) fração solúvel; (5) fração solúvel após passagem pela resina de afinidade; (6) (7) (8) e (9) eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão; (10) proteína eluída após clivagem *overnight* com sumo-protease, indicada por uma seta com sua respectiva massa molecular calculada; (11) e (12) eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão, após eluição; (13) eluição da SUMO com tampão contendo 400 mM de imidazol, indicada por uma seta. Em B, D, F e H, perfil cromatográfico de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C}, respectivamente, em coluna de exclusão molecular Superdex 200. O pico que aparece após a eluição da proteína corresponde ao imidazol utilizado na cromatografia de afinidade. Nos insertos, SDS-PAGE 15 % das frações que correspondem ao pico de eluição das proteínas na cromatografia de exclusão molecular: (a) amostra aplicada na cromatografia de exclusão molecular; (b) a (f) proteína após exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

As frações que continham proteína após a cromatografia de exclusão molecular foram concentradas e quantificadas, sendo possível determinar o rendimento para cada uma das construções, em ordem crescente, de: 2,8; 3,7; 3,8 e 5,8 mg de proteína por litro de cultura para SEPT6GC, SEPT2G_{6C}, SEPT2GC e SEPT7GC, respectivamente.

4.1.3 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC, SEPT2G_{6C}

Os volumes de eluição verificados na cromatografia de exclusão molecular sugerem que SEPT2GC apresenta-se em um estado oligomérico diferente das demais construções, uma vez que o pico no cromatograma apresenta-se deslocado para um volume maior. Para confirmar o estado oligomérico de todas as construções, a massa molecular aparente das proteínas purificadas foi determinada a partir da calibração da coluna Superdex 200 com proteínas globulares disponibilizadas no *Gel Filtration Calibration Kits* (GE Healthcare Life Sciences). A partir dos perfis cromatográficos, os volumes de eluição obtidos foram utilizados para montar uma curva de calibração (Figura 14 - inserto) que permitiu a estimativa da massa molecular aparente (Tabela 13).

Figura 14 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.

Perfis cromatográficos de SEPT2GC (laranja), SEPT6GC (roxo), SEPT7GC (azul) e SEPT2G_{6C} (verde). Os volumes de eluição das proteínas estão indicados próximo ao eixo das abscissas. No inserto, a regressão linear utilizando as proteínas de calibração: ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa) e ferritina (440 kDa). A localização das proteínas purificadas na regressão linear estão indicadas no inserto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 13 – Massas moleculares observada e calculada para as construções GC de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT2₆.

	Massa molecular observada (kDa)	Massa molecular calculada (kDa)			
		monômero	dímero	trímero	tetrâmero
SEPT2GC	80,8	38,0	76,0	114,0	152,0
SEPT6GC	179,0	44,9	89,8	134,7	179,6
SEPT7GC	211,8	45,6	91,2	136,8	182,4
SEPT2G _{6C}	177,7	45,8	91,6	137,4	183,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela estimativa das massas moleculares obtida é razoável acreditar que SEPT2GC foi purificada como um dímero e as demais construções como um estado oligomérico maior. No entanto, é difícil de afirmar se SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C} foram purificadas como trímeros ou tetrâmeros, visto que o ajuste linear da calibração apresentou um coeficiente de determinação de 0,97 e a técnica considera as proteínas em conformação globular. Como a

região C-terminal das septinas não é muito estável e, para as três construções em questão, são preditas estruturas *coiled-coil*, dificilmente as proteínas apresentam-se globulares, adicionando erro à técnica.

4.1.4 Estabilidade térmica dos possíveis heterodímeros por dicroísmo circular

Os espectros de CD de todas as construções foram obtidos na faixa de 195 a 280 nm, região responsável pelo monitoramento das transições da cadeia peptídica da proteína, os quais oferecem informações sobre a estrutura secundária global da proteína em solução. Os espectros foram caracterizados pela presença de dois mínimos localizados em 222 nm e 208 nm, típicos de proteínas contendo elementos α -hélice em sua estrutura secundária (Figura 15). Os espectros não foram desconvoluídos, uma vez que essa análise consistiu em uma verificação do enovelamento da proteína para as posteriores análises de estabilidade térmica.

Figura 15 – Espectros de CD de SEPT2GC, SEPT6GC, SEPT7GC e SEPT2G_{6C}.

Os espectros foram obtidos com as proteínas em solução tampão, 3 μ M, contendo 20 mM de fosfato de sódio (pH 7,8), 150 mM de NaCl e 5 % de glicerol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificação da estabilidade térmica e indicação de possível interação, as alíquotas de proteínas foram aquecidas de 10 a 50 °C, separadamente e aos pares, buscando-se determinar a temperatura de transição a partir da qual a estrutura pode ser considerada desenovelada e, portanto, ser determinada a estabilidade dos possíveis dímeros.

Inicialmente foi observado ganho na temperatura de transição do heterodímero fisiológico, SEPT7GC-SEPT6GC, já esperado (Figura 16-D). Quando aquecidas separadamente, as construções SEPT7GC (Figura 16-A) e SEPT6GC (Figura 16-B) apresentam temperaturas de transição entre o estado estruturado e desenovelado de 43,4 e 23,8 °C, respectivamente. Após incubação de SEPT7GC e SEPT6GC (Figura 16-C), a nova temperatura de transição observada, agora para o dímero, foi de 54,0 °C.

Figura 16 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT6GC quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.

Em A e B, os espectros de CD de SEPT7GC e SEPT6GC, respectivamente, em cada uma das temperaturas durante o aquecimento. Em C, os espectros de CD para o dímero SEPT7GC-SEPT6GC durante o aquecimento. Em D, as curvas de desnaturação térmica para as proteínas separadamente e para o dímero. As curvas foram obtidas a partir da variação no valor da elipsidade em 222 nm, expressa em fração de proteína desnaturada em função da temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, o mesmo conjunto de medidas foi obtido para SEPT7GC e SEPT2GC. No caso de SEPT2GC separadamente, não foi possível observar a transição entre os estados (Figura 17-B) e obter uma temperatura para esse evento. No entanto, quando um possível heterodímero de SEPT7GC-SEPT2GC é submetido à rampa de aquecimento (Figura 17-C) não há ganho algum na temperatura de transição, quando comparada à de SEPT7GC separadamente, já que a mesma passa de 43,4 para 39,5 °C, indicando maior instabilidade de SEPT7GC na presença de SEPT2GC do que sozinha.

Figura 17 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT2GC quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.

Em A e B, os espectros de CD de SEPT7GC e SEPT2GC, respectivamente, em cada uma das temperaturas durante o aquecimento. Em C, os espectros de CD para o dímero SEPT7GC-SEPT2GC durante o aquecimento. Em D, as curvas de desnaturação térmica para as proteínas separadamente e para o dímero. As curvas foram obtidas a partir da variação no valor da elipsidade em 222 nm, expressa em fração de proteína desnaturada em função da temperatura.

Finalmente, a proteína quimérica foi analisada (Figura 18-B), apresentando temperatura de transição de 46,3 °C, isoladamente, enquanto o possível dímero, SEPT7GC-SEPT2G_{6C} (Figura 18-C), apresentou temperatura de transição de 43,3 °C.

Figura 18 – Espectros de CD para as proteínas SEPT7GC e SEPT2G_{6C} quando submetidas à desnaturação térmica e suas curvas de desnaturação.

Em A e B, os espectros de CD de SEPT7GC e SEPT2G_{6C}, respectivamente, em cada uma das temperaturas durante o aquecimento. Em C, os espectros de CD para o dímero SEPT7GC-SEPT2G_{6C} durante o aquecimento. Em D, as curvas de desnaturação térmica para as proteínas separadamente e para o dímero. As curvas foram obtidas a partir da variação no valor da elipsidade em 222 nm, expressa em fração de proteína desnaturada em função da temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas de desnaturação dos pares de proteínas (Figura 19) sugerem que o possível complexo SEPT7GC-SEPT2G_{6C} seria mais estável do que a dupla de proteínas que espera-se

que não interajam, SEPT7GC-SEPT2GC, mas não tão estável quanto o heterodímero fisiológico SEPT7GC-SEPT6GC.

Figura 19 – Curvas de desnaturalização térmica dos pares de SEPT7GC com SEPT6GC, SEPT2GC e SEPT2G_{6C}. As curvas foram obtidas a partir da variação no valor da elipsidade em 222 nm, expressa em fração de proteína desnaturalizada em função da temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da evidência de um aumento de estabilidade de SEPT7GC-SEPT2G_{6C}, quando comparada a SEPT7GC-SEPT2GC (lembrando que estas não interagem), é importante notar que as temperaturas de transição obtidas para SEPT7GC-SEPT2G_{6C} e para SEPT7GC, isoladamente, são muito próximas ($43,3^{\circ}\text{C}$ e $43,4^{\circ}\text{C}$, respectivamente), bem como possuem espectros muito semelhantes durante o aquecimento. Sabe-se que as proteínas não foram purificadas em estado monomérico e, além disso, o perfil do espectro de CD de SEPT7GC isolada é típico de interação protéica do tipo *coiled-coil*, com o mínimo em 222 nm menor que o mínimo em 208 nm (137-138). Sendo assim, ou a interação SEPT7GC-SEPT2G_{6C} promoveu estabilidade igual à interação promíscua SEPT7GC-SEPT7GC ou o que é visto nos espectros de SEPT7GC-SEPT2G_{6C} sob aquecimento (Figura 18-C) é decorrente apenas da transição dos dois homodímeros promíscuos.

4.1.5 Afinidade entre os possíveis heterodímeros avaliada por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A fim de confirmar se o ganho de estabilidade observado nas análises de dicroísmo circular poderia ser mesmo atribuído à interação da proteína quimérica SEPT2G_{6C} com SEPT7GC, foram realizados experimentos de ressonância plasmônica de superfície. Primeiramente, a proteína SEPT7GC purificada foi imobilizada por acoplamento amina a um sensorchip. Em seguida, as outras construções foram passadas, uma a uma, sob fluxo contínuo por 2 minutos sobre o chip, e foram aguardados 10 minutos para dissociação da proteína ligante.

A proteína SEPT6GC, a qual já era esperado interagir via interface NC com SEPT7GC, apresentou um sensorgrama típico de ligação com a proteína imobilizada e dissociação parcial no tempo de *delay* (Figura 20-A). O ajuste de cinética (Figura 20-B) determinou $k_D = 7,15 \times 10^{-6}$ M. O controle de não interação, a proteína SEPT2GC, apresentou sensorgrama sem indicação de ligação (Figura 20-C).

O sensorgrama de SEPT2G_{6C} apresentou perfil de ligação semelhante ao de SEPT6GC, mas com intensidade de resposta mais baixa e dissociação menos acentuada (Figura 20-D), o que justifica o ajuste de cinética indicando maior afinidade (Figura 20-E), $k_D = 8,02 \times 10^{-7}$ M. Sendo assim, pode-se afirmar que a septina quimérica possui afinidade pela septina 7.

(continua)

(continuação)

Figura 20 – Sensorgramas da ressonância plasmônica de superfície.

Em A, C e D os gráficos para SEPT6GC, SEPT2GC e SEPT2G_{6C}, respectivamente, usadas como analito e aplicadas em concentrações crescentes sobre a proteína SEPT7GC, imobilizada. Cada sensorgrama apresenta seis concentrações diferentes, em duplicata. Em B e E, o ajuste de cinética para SEPT6GC e SEPT2G_{6C}, respectivamente, utilizando o modelo que considera dois estados de reação (com mudança conformacional).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Estudo da interface G heterodimérica

Buscando avaliar a importância do nucleotídeo para a dimerização no heterocomplexo, foram construídos mutantes de SEPT2G no domínio GTPásico, SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}, já que esses resíduos são importantes na hidrólise e ligação do nucleotídeo, respectivamente. (66) Tais construções foram avaliadas em termos de estado oligomérico, teor de nucleotídeo e atividade GTPásica, quando expressas sozinhas, e em termos de estado oligomérico e copurificação quando coexpressas com SEPT6G.

4.2.1 Construção dos mutantes

A construção de SEPT2G, cujo DNA codificante possui 825 pb, já estava presente no banco de plasmídeos do grupo de pesquisa. Porém, estava inserida no vetor de expressão pET-TEV (Figura 21-A) e precisou ser subclonada em outro vetor de expressão, pRSF-Duet (Figura 21-B), para permitir as coexpressões desejadas (item 4.2.6).

Os mutantes sítio-dirigidos foram sintetizados *in vitro* por amplificação do DNA plasmidial com o DNA selvagem clonado, em vetor de coexpressão pRSF-Duet (Figura 21-B), por PCR. Os oligonucleotídeos (apêndice B) foram desenhados com as mutações internas e amplificou-se todo o plasmídeo. Após a amplificação, as reações de PCR foram então incubadas com *DpnI*, para degradação do DNA molde e, em seguida, transformadas em células competentes de *E. coli* DH5 α . Após confirmação das mutações por sequenciamento, os fragmentos de interesse foram subclonados no vetor de expressão pET28a (Figura 21-C)

Figura 21 – Análise do padrão de restrição dos clones de SEPT2G.

Em A e B, o padrão de restrição dos clones de SEPT2G em vetores de expressão diferentes, pET-TEV (5343 pb) e pRSF-Duet (3829 pb), respectivamente, submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas. Em C, o padrão de restrição dos clones dos mutantes sítio-dirigidos produzidos por PCR e posteriormente subclonados em pET28a (5369 pb). (M) corresponde ao padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) em todas as imagens; (1) pET-TEV_SEPT2G antes da digestão; (2) pET-TEV_SEPT2G após dupla digestão com *NdeI* e *XhoI*; (3) pRSF-Duet_SEPT2G após dupla digestão com *NdeI* e *XhoI*; (4) pET28a_SEPT2G^{T78M} após dupla digestão com *NdeI* e *XhoI*; (5) pET28a_SEPT2G^{D185N} após dupla digestão com *NdeI* e *XhoI*. As massas das bandas do padrão de massa molecular relevantes estão indicadas à esquerda de cada imagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os vetores de expressão escolhidos adicionaram à porção N-terminal da proteína de expressa um sítio de clivagem, trombina para pET28a e protease viral Tev para pET-TEV, e seis resíduos de histidina, sequencialmente, aumentando cerca de 2 kDa à massa molecular da proteína expressa. A partir da estrutura primária da proteína, alguns parâmetros físico-

químicos necessários para análises posteriores foram determinados pela ferramenta ProtParam do ExPASy (Tabela 14).

Tabela 14 – Características físico-químicas das construções G para, SEPT2, SEPT2^{T78M} e SEPT2^{D185N}, sem remoção da cauda de histidinas.

Construção	Número aa	Massa molecular (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	Coefficiente de extinção (280 nm)	Abs _{280nm} 0,1 %
SEPT2G	296	34 105,8	6,1	18 910	0,554
SEPT2G ^{T78M}	295	33 893,7	6,28	17 420	0,514
SEPT2G ^{D185N}	295	33 862,6	6,38	17 420	0,514

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Expressão heterolológica e purificação

A síntese das proteínas foi feita em *E. coli* Rosetta(DE3), como descrito anteriormente para as construções GC. A análise por SDS-PAGE 15 % verificou tanto a expressão quanto a solubilidade das proteínas produzidas (Figura 22). A cauda de histidinas N-terminal presente no produto de expressão possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade (Figura 22). As alíquotas eluídas da cromatografia de afinidade foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular para posterior determinação da massa molecular aparente.

(continua)

(continuação)

Figura 22 – Análise da expressão e purificação de SEPT2G, SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}.

Em A, C e E, SDS-PAGE 15 % do perfil de expressão e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado de SEPT2G, SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}, respectivamente. (M) corresponde ao padrão de massa molecular, em kDa, indicado à esquerda das imagens; (1) extrato protéico bruto antes da adição de IPTG; (2) extrato protéico bruto após indução com IPTG por 16 horas a 18 °C; (3) fração insolúvel após lise celular; (4) fração solúvel; (5) fração solúvel após passagem pela resina de afinidade; (6) e (7) eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão contendo 5 mM e 10 mM de imidazol, respectivamente; (8) proteína eluída com tampão contendo 400 mM de imidazol, indicada por uma seta com sua respectiva massa molecular calculada. Em B, D e F, perfil cromatográfico de SEPT2G, SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}, respectivamente, em coluna de exclusão molecular Superdex 200. O pico que aparece após a eluição da proteína corresponde ao imidazol utilizado na cromatografia de afinidade. Nos insertos, SDS-PAGE 15 % das frações que correspondem ao pico de eluição das proteínas na cromatografia de exclusão molecular: (a) amostra aplicada na cromatografia de exclusão molecular; (b) a (f) proteína eluída da exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a cromatografia de afinidade, visto que o imidazol estava presente, não foi possível uma quantificação precisa, mas foi feita uma estimativa do rendimento para cada uma das construções. O rendimento, em ordem crescente, para as proteínas purificadas foi de aproximadamente 32, 34 e 40 mg de proteína por litro de cultura para SEPT2G^{D185N}, SEPT2G e SEPT2G^{T78M}, respectivamente.

4.2.3 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico de SEPT2G e seus mutantes

Os volumes de eluição verificados na cromatografia de exclusão molecular sugerem que SEPT2G^{D185N} apresenta-se em um estado oligomérico diferente das demais construções, uma vez que o pico no cromatograma apresenta-se deslocado para um volume maior. Para confirmar o estado oligomérico de todas as construções, a massa molecular aparente das proteínas purificadas foi determinada a partir da calibração da coluna Superdex 200 com proteínas globulares disponibilizadas no *Gel Filtration Calibration Kits* (GE Healthcare Life Sciences). A partir dos perfis cromatográficos, os volumes de eluição obtidos foram utilizados para montar uma curva de calibração (Figura 23 - inserto) que permitiu a estimativa da massa molecular aparente (Tabela 15).

Figura 23 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular. Perfis cromatográficos de SEPT2G (verde), SEPT2G^{T78M} (laranja) e SEPT2G^{D185N} (azul). Os volumes de eluição das proteínas estão indicados próximo ao eixo das abscissas. No inserto, a regressão linear utilizando as proteínas de calibração: ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa) e ferritina (440 kDa). A localização das proteínas purificadas na regressão linear estão indicadas no inserto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 15 – Massas moleculares observada e calculada para as construções de SEPT2G.

	Massa molecular observada (kDa)	Massa molecular calculada (kDa)	
		monômero	dímero
SEPT2G	50,3	34,1	68,2
SEPT2G ^{T78M}	50,6	33,9	67,8
SEPT2G ^{D185N}	31,1	33,9	67,8

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela estimativa das massas moleculares obtida é possível afirmar que SEPT2G^{D185N} foi purificada como monômero e as demais construções como dímeros. Sendo assim, o resultado confirma a eficiência da mutação D185N impedindo a complexação das proteínas pelo domínio G para formar o homodímero.

4.2.4 Confirmação da mutação T78M por atividade

A mutação T78M, que deveria permitir a ligação do nucleotídeo mas não sua hidrólise, foi confirmada por teste de atividade GTPásica seguindo protocolo de desnaturação química estabelecido por Seckler e colaboradores. (135) Primeiramente, foi realizada a calibração da coluna de troca iônica com os nucleotídeos a serem analisados, GTP e GDP, afim de confirmar a resolução para que os mesmos possam ser diferenciados durante o ensaio (Figura 24-A). Em seguida, para avaliar a capacidade de SEPT2G e SEPT2G^{T78M} hidrolisarem GTP, as proteínas foram incubadas com GTP numa razão 3:1 (GTP:proteína), a 20 °C, durante 120 minutos. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 10 min, na primeira hora, e de 20 min na segunda, e congeladas em nitrogênio líquido a fim de que a reação fosse interrompida. A análise do conteúdo de nucleotídeo foi realizada em HPLC após desnaturação da proteína, como já descrito. As Figura 24-B e Figura 24-C mostram a primeira e a última alíquota de SEPT2G e SEPT2G^{T78M}, respectivamente. Enquanto SEPT2G apresentou atividade hidrolítica lenta, como já esperado, SEPT2G^{T78M} não apresentou nenhuma atividade, sendo a mutação eficiente e suficiente para anular a atividade catalítica da proteína.

Figura 24 – Análise de atividade GTPásica de SEPT2G e SEPT2G^{T78M} por cromatografia de troca iônica. Em A, perfil da separação da mistura de GDP e GTP e seus respectivos picos de eluição, que estão destacados junto ao eixo das abscissas. Em B e C, o perfil cromatográfico do ensaio de atividade GTPásica para SEPT2G e SEPT2G^{T78M}, respectivamente, mostrando atividade GTPásica para a construção selvagem e ausência de atividade para o mutante.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5 Análise do teor de nucleotídeo em SEPT2G e seus mutantes

O perfil na cromatografia de exclusão molecular indicou que a ligação do nucleotídeo, mas não sua hidrólise, é necessária para dimerização promíscua de SEPT2, via interface G. Para confirmar essa hipótese, foi realizado o ensaio de análise do teor de nucleotídeo, cujo resultado esperado era que a construção selvagem de SEPT2G, dimerizada como mostrado anteriormente, fosse purificada com o nucleotídeo hidrolisado, GDP, enquanto a construção mutante SEPT2G^{T78M}, também em estado dimérico, fosse purificada com o nucleotídeo não hidrolisado, GTP, e a construção mutante SEPT2G^{D185N}, monomérica, fosse purificada sem nucleotídeo ligado. Os resultados (não mostrados) foram inconsistentes e inconclusivos, sendo necessário ainda mais experimentos.

4.2.6 Coexpressões

Para fazer qualquer inferência da importância de ligação e hidrólise do nucleotídeo na dimerização fisiológica partiu-se para a coexpressão de SEPT6G e SEPT2G e seus mutantes.

4.2.6.1 Amplificação e clonagem do domínio G de SEPT6 para coexpressão

A partir do DNA plasmidial (molde) de construções presentes no banco de plasmídeos do grupo de Biofísica Molecular, os pares de oligonucleotídeos (apêndice A) foram utilizados em reações convencionais de PCR. Após a amplificação do domínio G de SEPT6, alíquotas das reações de PCR foram então submetidas à análise em gel de agarose (0,8 %) para verificação dos produtos esperados. A análise da eletroforese em gel de agarose confirma sucesso na amplificação do fragmento de interesse, cuja banda correspondente possui 801 pb (Figura 25-A). O produto amplificado foi então clonado no vetor de propagação pUC19 e, após confirmação da ligação por análise de restrição com endonucleases específicas e sequenciamento do fragmento de interesse, subclonado em vetor de expressão pET-Duet (Figura 25-B e Figura 25-C).

Figura 25 – Análise do produto de amplificação e do padrão de restrição dos clones de SEPT6G.

Em A, o produto da reação de PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose (0,8 %). Em B e C, o padrão de restrição dos clones de SEPT6G em vetor de clonagem, pUC19 (2686 pb), e em vetor de expressão, pET-Duet (5420 pb), respectivamente, submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas. (M) corresponde ao padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) em todas as imagens; (1) pPCR de SEPT6G; (2) pUC19_SEPT6G após dupla digestão com *Bam*HI e *Hind*III; (3) pET-Duet_SEPT6G após dupla digestão com *Bam*HI e *Hind*III. As massas das bandas do padrão de massa molecular relevantes estão indicadas à esquerda de cada imagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os vetores de expressão escolhidos adicionam à porção N-terminal de SEPT6G seis resíduos de histidina, aumentando cerca de 2 kDa à massa molecular da proteína expressa e apenas alguns aminoácidos em SEPT2G e mutantes, acréscimo não significativo na massa molecular destas. A partir da estrutura primária da proteína, alguns parâmetros físico-químicos necessários para análises posteriores foram determinados pela ferramenta ProtParam do ExPASy (Tabela 16).

Tabela 16 – Características físico-químicas das construções G para, SEPT6G, SEPT2, SEPT2^{T78M} e SEPT2^{D185N}, em vetor para coexpressão.

Construção	Número aa	Massa molecular (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	Coefficiente de extinção (280 nm)	Abs _{280nm} 0,1 %
SEPT6G-His	280	32 035,5	6,2	18 910	0,59
SEPT2G	275	31 700,3	5,85	17 420	0,55
SEPT2G ^{T78M}	275	31 730,4	5,85	17 420	0,549
SEPT2G ^{D185N}	275	31 699,3	5,97	17 420	0,55

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6.2 Coexpressões e copurificações

A síntese das proteínas foi feita em *E. coli* Rosetta (DE3), após cotransformação dessas com os dois vetores de expressão. As colônias transformantes foram inoculadas em LB líquido adicionado de antibióticos de seleção específicos e incubadas por 16 horas a 18 °C após indução com 0,2 mM de IPTG. Análise por SDS-PAGE 15 % verificou tanto a expressão quanto a solubilidade das proteínas produzidas (Figura 26). A cauda de histidinas N-terminal presente em SEPT6G possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade (Figura 26). As alíquotas eluídas da cromatografia de afinidade foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular para posterior determinação da massa molecular aparente.

(continua)

(continuação)

Figura 26 – Análise da expressão e purificação de SEPT6G e das coexpressões e copurificações de SEPT6G e SEPT2G ou seus mutantes.

Em A, C, E e G, SDS-PAGE 15 % do perfil de expressão e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado de SEPT6G, SEPT6G-SEPT2G, SEPT6G-SEPT2G^{T78M}, SEPT6G-SEPT2G^{D185N}, respectivamente. (M) padrão de massa molecular, em kDa, indicado à esquerda das imagens; (1) extrato protéico bruto antes da adição de IPTG; (2) extrato protéico bruto após indução com IPTG por 16 horas a 18 °C; (3) fração insolúvel após lise celular; (4) fração solúvel; (5) fração solúvel após passagem pela resina de afinidade; (6) e (7) eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão contendo 5 mM e 10 mM de imidazol, respectivamente; (8) proteína eluída com tampão contendo 400 mM de imidazol, indicada por uma seta com sua respectiva massa molecular calculada. Em B, D, F e H, perfil cromatográfico de SEPT6G, SEPT6G-SEPT2G, SEPT6G-SEPT2G^{T78M}, SEPT6G-SEPT2G^{D185N}, respectivamente, em coluna de exclusão molecular Superdex 200. O pico que aparece após a eluição da proteína corresponde ao imidazol utilizado na cromatografia de afinidade. Nos insertos, SDS-PAGE 15 % das frações que correspondem ao pico de eluição das proteínas na cromatografia de exclusão molecular: (a) amostra aplicada à cromatografia de exclusão molecular; (b) a (f) proteína eluída da exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6.3 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico

Os volumes de eluição verificados na cromatografia de exclusão molecular sugerem que, como visto para as proteínas expressas individualmente, SEPT6G-SEPT2G^{D185N} apresenta-se em um estado oligomérico diferente das demais coexpressões, uma vez que o pico no cromatograma apresentou-se único e deslocado para um volume maior. Para confirmar o estado oligomérico de todas as construções, a massa molecular aparente das proteínas purificadas foi determinada a partir da calibração da coluna Superdex 200 com proteínas globulares disponibilizadas no *Gel Filtration Calibration Kits* (GE Healthcare Life Sciences). A partir dos perfis cromatográficos, os volumes de eluição obtidos foram utilizados para montar uma curva de calibração (Figura 27 - inserto) que permitiu a estimativa da massa molecular aparente (Tabela 17).

Figura 27 – Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.

Perfis cromatográficos de SEPT6G (roxo), SEPT6G-SEPT2G (verde), SEPT6G-SEPT2G^{T78M} (laranja) e SEPT6G-SEPT2G^{D185N} (azul). Os volumes de eluição das proteínas estão indicados próximo ao eixo das abscissas. No inserto, a regressão linear utilizando as proteínas de calibração: ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa) e ferritina (440 kDa). A localização das proteínas purificadas na regressão linear estão indicadas no inserto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 17 – Massas moleculares observada e calculada para as construções de SEPT2G e copurificações.

	Massa molecular observada (kDa)		Massa molecular calculada (kDa)	
	Pico 1	Pico 2	dímero	monômero (SEPT6G)
SEPT6G		38,5	64,0	32,0
SEPT6G-SEPT2G	76,0	35,1		
SEPT6G-SEPT2G ^{T78M}	65,4	29,5	63,7	32,0
SEPT6G-SEPT2G ^{D185N}		31,7		

Fonte: Elaborada pela autora

Pela estimativa das massas moleculares obtida é possível afirmar que na coexpressão de SEPT6G-SEPT2G^{D185N}, SEPT6G, que contém o His-tag, foi purificada sozinha não havendo copurificação de SEPT2G^{D185N}. Consequentemente, isso indica que, assim como

na homodimerização, tal mutação foi suficiente para impedir a formação do heterodímero. A mutação T78M, entretanto, embora tenha inviabilizado a hidrólise de GTP, permitiu a formação do heterodímero com SEPT6G.

4.2.6.4 Western Blot

Ainda para confirmar a ausência de SEPT2G^{D185N} na copurificação com SEPT6G, mas garantir que isso não ocorreu por problemas na coexpressão das proteínas, foi realizado um *western blot* (Figura 28), já que as proteínas coexpressas apresentam massas moleculares muito próximas, não possibilitando a distinção de duas bandas na análise por SDS-PAGE.

Nesse experimento, como SEPT6G foi expressa com His-tag, o ensaio consistiu na marcação das construções de SEPT2G na fração solúvel do lisado celular induzido antes e depois da cromatografia de afinidade. Paralelamente, foi realizado um controle de especificidade do anticorpo anti-SEPT2 adquirido comercialmente, com SEPT2GC purificada (controle positivo) e SEPT6G purificada (controle negativo).

Figura 28 – Ensaio de *Western Blot* para diferenciar SEPT6G de SEPT2G ou seus mutantes.

Em A, SDS-PAGE 15 % e B, membrana de nitrocelulose: (M) corresponde ao padrão de massa molecular Precision Plus Protein^{TM} Prestained Standards (BioRad), (1) SEPT2GC (38,0 kDa) purificada por cromatografia de afinidade. (2) SEPT6G (32,0 kDa) purificada por cromatografia de afinidade. (3) Fração solúvel do extrato protéico da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G ao final da indução. (4) Purificação por cromatografia de afinidade da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G. (5) Fração solúvel do extrato protéico da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G^{T78M} ao final da indução. (6) Purificação por cromatografia de afinidade da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G^{T78M}. (7) Fração solúvel do extrato protéico da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G^{D185N} ao final da indução. (8) Purificação por cromatografia de afinidade da coexpressão de SEPT6G-SEPT2G^{D185N}. As massas das bandas do padrão de massa molecular relevantes estão indicadas à esquerda de cada imagem. A membrana de nitrocelulose mostrada em B foi incubada com anti-SEPT2 como anticorpo primário e revelada com fosfatase alcalina.

Após a revelação da membrana de nitrocelulose com fosfatase alcalina podem ser observadas as bandas de expressão das construções de SEPT2G, SEPT2G^{T78M} e SEPT2G^{D185N}, porém não foi observada banda desta última após a cromatografia de afinidade, indicando ausência de SEPT2G^{D185N} na copurificação, como esperado.

4.3 Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides

Buscando identificar fatores na formação dos complexos fisiológicos de septinas que pudessem influenciar na formação de agregados protéicos do tipo amilóides, o heterodímero SEPT6G-SEPT2G foi produzido e analisado. As análises consistiram em avaliar a estabilidade térmica e a capacidade de ligação à sonda fluorescente ThT, além de medidas de SAXS (espalhamento de luz à baixo ângulo, dados não mostrados). Os resultados foram comparados com os controles das proteínas separadas, SEPT2G (136) e SEPT6G.

4.3.1 Determinação da massa molecular aparente e estado oligomérico, e verificação de homogeneidade da amostra por cromatografia de exclusão molecular acoplada à espalhamento de luz à múltiplos ângulos (SEC-MALS)

As construções SEPT6G e SEPT6G-SEPT2G foram produzidas conforme descrito anteriormente. As frações protéicas eluídas da cromatografia de exclusão molecular foram concentradas e quantificadas, sendo possível determinar o rendimento para cada uma das construções de 1,3 e 2,6 mg de proteína por litro de cultura para SEPT6G e SEPT6G-SEPT2G, respectivamente. Uma vez que os estudos de formação de amilóides para SEPT2G já haviam sido realizados pelo grupo e a comparação seria utilizada para proposições futuras, optou-se pela troca de tampão no qual as alíquotas foram armazenadas. Foram utilizadas colunas pré-empacotadas com *Sephadex G-25 (PD SpinTrap G-25 – GE Healthcare Life Sciences)* e o tampão foi trocado por centrifugação para 25 mM Tris, pH 7,8 e 10 % glicerol.

A homogeneidade das alíquotas foi monitorada por espalhamento de luz a múltiplos ângulos (MALS), o qual indicou amostras monodispersas para o heterodímero SEPT6G-SEPT2G e a presença de duas populações de oligômeros para SEPT6G (Figura 29).

Figura 29 – Dispersividade das amostras de SEPT6G-SEPT2G e SEPT6G.

Em A, gráfico da variação do índice de refração diferencial pelo tempo (vermelho) para o heterodímero SEPT6G-SEPT2G, mostrando uma amostra monodispersa, e a massa molecular calculada (preto). Em B, o mesmo gráfico para SEPT6G, mostrando que a amostra contém duas populações distintas de proteínas em proporção equivalente.

Fonte: Elaborada pela autora.

O processamento dos picos utilizando o software *ASTRA7* permitiu concluir que a amostra de SEPT6G-SEPT2G encontrava-se dimerica, enquanto a amostra de SEPT6G passou a formar dímeros na nova solução tampão (sem adição de NaCl) (Tabela 18), embora tenha sido purificada como monômero na cromatografia de exclusão molecular (150 mM NaCl) (Figura 27). Assim, a presença de dímeros de SEPT6G nos experimentos subsequentes pode ser decorrente da ausência de força iônica do novo tampão.

Tabela 18 – Parâmetros obtidos para as análises por SEC-MALS de SEPT6G-SEPT2G e de SEPT6G, individualmente.

Parâmetro	SEPT6G-SEPT2G	SEPT6G	
	Pico 1	Pico 1	Pico 2
Raio hidrodinâmico (nm)	1,868 ($\pm$ 0,022)	2,004 ($\pm$ 0,200)	10,298 ($\pm$ 2,942)
Massa total estimada (μ g)	22,70	1,72	1,64
Fração de massa (%)	100	51,2	48,8
Massa molecular (kDa)	62,90 ($\pm$ 1,32)	62,45 ($\pm$ 8,010)	31,86 ($\pm$ 7,781)
Polidispersividade	1,002 ($\pm$ 0,029)	1,000 ($\pm$ 0,181)	1,003 ($\pm$ 0,347)
Raio quadrático médio (nm)	28,5 ($\pm$ 2,6)	13,6 ($\pm$ 32,4)	9,3 ($\pm$ 88,7)

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Influência da temperatura na estrutura secundária do heterodímero SEPT6G-SEPT2G avaliada por dicroísmo circular (CD)

Para verificação da estabilidade térmica e identificação da temperatura de transição a partir da qual a estrutura pode ser considerada desenovelada, uma alíquota do heterodímero, submetida à troca de tampão como descrito anteriormente, foi aquecida de 15 a 70 °C e os espectros coletados em oito temperaturas diferentes (Figura 30-A). Pelos espectros, é possível notar que SEPT6G-SEPT2G perde os mínimos 208 nm e 222 nm quando a temperatura de 60 °C é atingida, indicando que a temperatura de transição está entre 55 e 60 °C. A diminuição na intensidade do sinal, destacada à temperatura de 65 °C (Figura 30-A – inserto), indica formação de precipitado protéico, verificados ao final da coleta na cubeta (Figura 30-B)

Figura 30 – Alterações conformacionais em SEPT6G-SEPT2G em função da temperatura.

Em A, espectros de CD para SEPT6G-SEPT2G, a 3 μ M, obtidos a 15, 25, 37, 45, 55, 60, 65 e 70 °C. No inserto, espectros de CD evidenciando a formação de agregados durante a coleta dos dados que correspondem a temperatura de 65 °C. Em B, agregados protéicos visualizados a olho nu obtidos nas temperaturas mais elevadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o Tris não é um agente tamponador indicado para experimentos de estabilidade térmica, já que o pH é suscetível a variações com mudanças de temperatura, foi

realizado um controle da estrutura secundária a temperatura ambiente em função dos pHs mínimo e máximo que o tampão atingiria durante o experimento (Figura 31-A).

A construção SEPT6G também foi analisada quanto à estabilidade térmica (Figura 31-B), como um dos controles, seguindo o mesmo procedimento de troca de tampão e análise do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular. Uma variação no experimento, foi apenas o intervalo de temperatura no qual os dados foram coletados, de 15 e 60 °C, uma vez que essa construção mostrou-se menos estável. Pelos espectros, é possível notar que a amostra perde os mínimos de 208 nm e 222 nm a 37 °C, indicando que a temperatura de transição está entre 25 e 37 °C. Essa temperatura de transição é fisiológica e está cerca de 30 °C mais baixa que a obtida para o heterodímero.

Figura 31 – Controles experimentais de estabilidade térmica.

Em A, espectros de CD obtidos para SEPT6G-SEPT2G em diferentes pHs (6,3; 7,8; e 9,3) para controle de que a alteração conformacional observada é provocada pelo aumento da temperatura.

Em B, espectros de CD para SEPT6G, a 3 μM, obtidos a 15, 25, 37, 45 e 60 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Espectroscopia de fluorescência com Thioflavina T (ThT) com SEPT6G-SEPT2G

Em função da mudança do espectro de CD típico de estruturas contendo α -hélices para um perfil de estruturas compostas por fitas- β , avaliou-se a capacidade dessas estruturas ligarem o fluoróforo Thioflavina-T, nas mesmas temperaturas utilizadas no experimento de CD. O ThT é um fluoróforo largamente usado para detecção de estruturas amilóides e que não se liga a agregados amorfos, já que possui especificidade de ligação a estruturas compostas por folhas- β cruzadas, arranjo típico da fibra amilóide. A emissão de fluorescência foi

monitorada durante 1,5 h para SEPT6G-SEPT2G a 25, 37, 45, 55, 60 e 65 °C (Figura 32-A), e para SEPT6G a 15, 25, 37 e 45 °C (Figura 32-B). Os resultados mostram que a emissão de fluorescência aumentou até um valor máximo, em ambos os casos, e que tal comportamento foi dependente da temperatura. No caso das medidas feitas com SEPT6G, o máximo de fluorescência foi obtido a 37 °C, já para o heterodímero, o máximo, sem precipitação, ocorreu a 55 °C, novamente indicando maior estabilidade da estrutura do dímero fisiológico. À temperaturas acima de 55 °C, a ligação da sonda ThT ao heterodímero ocorre muito rapidamente, o que pode ser observado pela inclinação inicial das curvas de 60 e 65 °C, até que se formam os precipitados desordenados e a intensidade da fluorescência decai.

Figura 32 – Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT6G-SEPT2G e a SEPT6G, em função da temperatura.

Em A, o heterodímero, SEPT6G-SEPT2G. Em B, SEPT6G. As amostras, a 5 μ M, foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm, usando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ensaio de espalhamento de luz à baixo ângulo (dados não mostrados), que foram realizados em colaboração com a Prof^a Dr^a Rosângela Itri, do Instituto de Física da USP – São Paulo, vão ao encontro dos resultados mostrados e confirmam a maior estabilidade da estrutura heterodimérica.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudo da interface NC heterodimérica

Atualmente, mesmo para o complexo de septinas humano melhor caracterizado estruturalmente, composto por SEPT2, SEPT6 e SEPT7, o papel da região C-terminal não está bem definido na polimerização das unidades monoméricas em filamentos, devido principalmente à ausência de densidade eletrônica dessa região na estrutura resolvida. Em um estudo realizado previamente, as regiões C-terminais de SEPT6 e SEPT7 mostraram interagir de forma específica e com alta afinidade ($K_D = 15,8 \text{ nM}$). (109) Mais recentemente, diversas das possíveis interações de regiões C-terminais das septinas dos grupos de SEPT6 e de SEPT7 foram avaliadas por dicroísmo circular, ultracentrifugação analítica e ressonância plasmônica de superfície, quantificando-se a estabilidade térmica e determinando-se as constantes de dissociação para homo e heterocomplexos. A partir desses dados, concluiu-se que os C-terminais são determinantes na preferência por interações heterotípicas às homotípicas, na interação NC. (127) Porém a influência do domínio G neste tipo de interação não pode ser avaliada, uma vez que as proteínas correspondiam apenas a região C-terminal das septinas estudadas.

No presente trabalho, ao ser adicionado o domínio G de SEPT2 à região C-terminal de SEPT6, buscou-se determinar se a presença da região C-terminal num domínio que não interage com SEPT7 seria suficiente para torná-lo parceiro de interação, via interface NC. Os resultados de ressonância plasmônica de superfície apresentados corroboram com as evidências que, de fato, a região C-terminal é responsável por selecionar o correto parceiro na montagem do filamento. A constante de dissociação obtida para o par SEPT7GC-SEPT2G_{6C} é significativa, superando a constante de dissociação do par de interação fisiológica SEPT7GC-SEPT6GC em uma ordem de grandeza, e indica interação específica.

Apesar dos valores de K_D indicarem maior afinidade no par constituído pela proteína quimérica quando comparado ao par fisiológico, tal diferença pode não ser real e estar associada a fatores experimentais, tais como: i) a utilização do mesmo chip durante todo o experimento, podendo as condições inicial e final diferirem, já que seguidamente utiliza-se uma solução de regeneração para desligar as proteínas do analito que interagiram à proteína imobilizada; ii) os qui-quadrados (χ^2) obtidos no ajuste das curvas do sensorgrama foram de 29,7 e 12,3 para os pares fisiológico e quimérico, respectivamente.

É importante destacar, ainda, que os experimentos de ressonância plasmônica de superfície com finalidade quantitativa realizados (109,127) utilizaram outro chip para o acoplamento do ligante, o qual imobiliza a proteína pela cauda de histidinas N-terminal, deixando-a “livre” para interação. No presente trabalho, a imobilização, feita por acoplamento amina, que não permite saber em qual posição a proteína se liga ao chip, podendo a mesma assumir um número variado delas. Esse fato pode interferir na troca da interação homoprotéica, uma vez que SEPT7GC não foi purificada na forma monomérica e possui interação promíscua via *coiled-coil*.

De qualquer forma, numa análise qualitativa pode-se afirmar que foi confirmada a interação entre SEPT7 e SEPT2, via interface NC, quando a região C-terminal de SEPT2 foi trocada com a sequência equivalente de SEPT6. A análise comparativa quantitativa dos valores de afinidade, por constante de dissociação, entre os resultados publicados para as porções C-terminais, apenas (109,127), e os valores obtidos no presente trabalho, na ordem de η M e μ M, respectivamente, sugere que mesmo o domínio G das septinas não participando na seleção dos parceiros de interação, eles auxiliam na estabilidade dos heteroligômeros.

Essa estabilidade dos heterodímeros conferida pela interação via região C-terminal foi também observada nos resultados de estabilidade térmica por dicroísmo circular. A temperatura de transição do par SEPT7GC-SEPT2G_{6C} (43,3 °C) mostrou um aumento, quando comparada a do par que não interage, SEPT7GC-SEPT2GC (39,5 °C), mas não alcançou a temperatura do par de interação fisiológica, SEPT7GC-SEPT6GC (54,0 °C), sugerindo, mais uma vez, a participação do domínio G na estabilização dos heteroligômeros.

Para confirmar os valores de K_D , experimentos adicionais ainda são necessários, seja alterando o chip para imobilização ou, ainda, utilizando outra técnica biofísica que permita esse cálculo. De qualquer modo, qualitativamente é evidente que a troca da região C-terminal de SEPT2 por SEPT6 fez com que a nova proteína passasse a interagir com SEPT7.

5.2 Estudo da interface G heterodimérica

Vários resultados suportam a ideia de que o ciclo do estado do nucleotídeo têm consequências estruturais na interface G e, possivelmente, contribui para a regulação da dinâmica de septinas. Estruturas anteriores mostraram a interface G homodimérica promíscua de SEPT2 na ausência do parceiro fisiológico, SEPT6, levando ao questionamento de se a natureza do nucleotídeo influencia ou não na dimerização e estabilidade dos filamentos de septinas. Um estudo recente mostrou que defeitos na ligação do nucleotídeo e na atividade

hidrolítica de SEPT12, identificados anteriormente nas mutações específicas D197N e T89M, respectivamente, interferiram na interação SEPT7-SEPT12, dissociando SEPT12 do complexo octamérico 12-7-6-2/4-2/4-6-7-12. (62)

No presente trabalho, o mutante SEPT2G^{D185N}, que não liga GTP, não foi capaz de formar homo ou heterodímeros, confirmando mais uma vez a necessidade do nucleotídeo para a formação da interface G de dimerização. O fato do mutante SEPT2G^{T78M}, incapaz de hidrolisar GTP mas ainda apto a ligar GTP, formar dímeros, também reforça a necessidade do nucleotídeo mas não de sua hidrólise para a formação da interface G homo ou heterodimérica. Sendo assim, o nucleotídeo é essencial na formação do dímero, via interface G, mas sua hidrólise não o é, ou seja, a ligação do GTP é suficiente para estabilizar o dímero SEPT2G-SEPT6G.

Outro estudo focado em SEPT7G e sua dimerização, via interface G, analisou a atividade GTPásica de diferentes subgrupos de septinas e o efeito da mesma na dimerização, concluindo que a estabilidade da interação foi dramaticamente diminuída pela troca do GDP pelo GTP, no caso de SEPT7 (113), aparentando contradição com os resultados apresentados. No entanto, é importante ressaltar que no presente trabalho foi identificada formação de dímeros com GTP, mas sua estabilidade não foi quantificada. Além disso, também seria interessante adicionar à coexpressão a SEPT7G, que poderia elucidar a questão das modificações da hidrólise no favorecimento da interação via interface NC.

5.3 Estudo de estabilidade e propensão à formação de amilóides

A alteração de espectro de CD típico de estruturas contendo α -hélice para fitas- β já foi observado para septinas individuais *in vitro* e foram caracterizados como amilóides. (136, 139) Foi mostrado que o domínio G é suficiente e capaz de levar a formação de amilóides sob temperaturas fisiológicas, particularmente para SEPT2. (136) Neste contexto, surge a questão de o quanto a formação de interfaces fisiológicas e prosmíscuas podem intereferir na estabilidade das septinas.

Para trazer luz a esta questão, foi explorada a estabilidade estrutural do heterocomplexo SEPT6G-SEPT2G, em comparação aos respectivos homocomplexos, via análises de CD e emissão de fluorescência do ThT. Os resultados apresentados mostraram que o heterodímero SEPT6G-SEPT2G ganha estabilidade térmica e resistência à formação de estruturas amilóides em temperaturas fisiológicas, frente ao homodímero promíscuo SEPT2G ou mesmo a SEPT6G, nesse caso como uma mistura de dímeros e monômeros.

A formação de estruturas tipo amilóides carecem de uma convergência da estrutura secundária para elementos do tipo fitas- β , que serão organizados nas folha- β cruzadas características. Esse novo arranjo estrutural geralmente demanda a dissociação das subunidades originais (no caso, dos dímeros) para assumir a nova organização estrutural (140). Assim, podemos sugerir que a maior estabilidade do heterodímero fisiológico tem um papel importante em evitar que estruturas amilóides sejam formadas em condições de temperatura fisiológicas, diferente do que ocorre nos casos de homodímeros promíscuos via interface G, como ocorre com SEPT2. (136) Tendo em mente que as septinas se organizam em estruturas poliméricas, utilizando mais de duas subunidades diferentes (3 a 4 septinas diferentes formando hexâmeros ou octâmeros, respectivamente), seria interessante estender esse trabalho para incluir um terceiro parceiro de interação (SEPT7), a fim de averiguar se haverá ganho de estabilidade estrutural adicional.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que a seleção de septinas parceiras via interação NC independe do domínio G, pois a proteína quimérica SEPT2G_{6C} é capaz de interagir e formar um heterodímero com SEPT7GC. Tal interação, no entanto, não se mostrou tão estável quanto o heterodímero fisiológico devido, possivelmente, a restrições estéricas impostas pelo domínio G trocado.

Além disso, a formação do heterodímero via interface G depende da ligação do nucleotídeo, mas não de sua hidrólise, uma vez que a mutação sítio-dirigida no domínio G de SEPT2, D185N, foi suficiente para impedir a complexação das proteínas e formação do dímero, enquanto a mutação que aboliu sua atividade catalítica, T78M, não.

Finalmente, também é possível afirmar que a elevada temperatura de transição observada para o dímero SEPT6G-SEPT2G, por volta de 55 °C, indica um aumento significativo de estabilidade conformacional do heterocomplexo. Uma vez que se espera que o aumento da temperatura induza a dissociação de dímeros em monômeros, precedendo o rearranjo de agregados amilóides, a interação com o parceiro correto via interface G parece, portanto, ser um fator importante na prevenção da formação de amilóides sob temperaturas fisiológicas.

REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 2 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 96, n. 2, p. 265-276, 1971.
- 3 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast, I. detection of mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, n. 2, p. 352-359, 1970.
- 4 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 717-721, 1976.
- 5 BYERS, B.; GOETSCH, L. Loss of the filamentous ring in cytokinesis-defective mutant of budding yeast. **Journal of Cell Biology**, 70, n. 1, p. 35, 1976b.
- 6 HAARER, K.; PRINGLE, R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678-3687, 1987.
- 7 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. **Journal of Cell Biology**, v. 112, n. 4, p. 535-544, 1991.
- 8 BYERS, B. Cytology of the yeast life cycle. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981. cap. 4, p. 59-96.
- 9 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681-689, 2001.
- 10 SANDERS, S. L.; FIELD, C. M. Cell division. Septins in common? **Current Biology**, v. 4, n. 10, p. 907-910, 1994.
- 11 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 681-687, 2011.
- 12 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, 2007. doi: 10.1186/1471-2148-7-103.
- 13 KINOSHITA, M. The septins. **Genome Biology**, v. 4, n. 11, p. 236, 2003.
- 14 RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Septin genomics: a road less travelled. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 763-767, 2011.

- 15 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 478-489, 2008. doi:10.1038/nrm2407.
- 16 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.
- 17 DE VIRGILIO, C.; DEMARINI, D. J.; PRINGLE, J. R. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. **Microbiology**, v. 142, Pt. 10, p. 2897-2905, 1996.
- 18 FARES, H.; GOETSCH, L.; PRINGLE, R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 399-411, 1996.
- 19 HALL, P. A. et al. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269-278, 2005.
- 20 MCILHATTON, M. A. et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. **Oncogene**, v. 20, n. 41, p. 5930-5939, 2001.
- 21 KALIKIN, L. M.; SIMS, H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. **Genomics**, v. 63, n. 2, p. 165-172, 2000.
- 22 ESTEY, M. P. et al. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 4, p. 741-749, 2010.
- 23 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183-194, 2012.
- 24 KINOSHITA, M.; NODA, M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 6, p. 667-670, 2001.
- 25 JOO, E.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. **Traffic**, v. 6, n. 8, p. 626-634, 2005.
- 26 SELLIN, E. et al. Microtubules support a disc-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 23, p. 4588-4601, 2011.
- 27 MOSTOWY, S. et al. A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB and the Met receptor. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 8, p. 1949-1959, 2011.
- 28 HAGIWARA, et al. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. **Cytoskeleton**, v. 68, n. 9, p. 515-525, 2011.

- 29 KISSEL, H. et al. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 353-364, 2005.
- 30 IHARA, et al. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 343-352, 2005.
- 31 HU, et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436-439, 2010.
- 32 KIM, S. K. et al. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1337-1340, 2010.
- 33 CHIH, et al. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 61-72, 2011.
- 34 TADA, et al. Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1752-1758, 2007.
- 35 XIE, Y. et al. The GTP-binding protein septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.
- 36 MOSTOWY, S. et al. Septins regulate bacterial entry into host cells. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4196, 2009.
- 37 MOSTOWY, S. et al. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 5, p. 433-444, 2010.
- 38 NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The mammalian septin interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2017.
- 39 NAKAHIRA, et al. A draft of the human septin interactome. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13799, 2010.
- 40 BEITES, C. L.; PENG, X.-R.; TRIMBLE, W. S. Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. **Methods in Enzymology**, v. 329, p. 499-510, 2001.
- 41 ZHANG, et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13354-13359, 2000.
- 42 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 43 SPILIOTIS, T.; KINOSHITA, M.; NELSON, J. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science**, v. 309, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.

- 44 SURKA, C.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 10, p. 3532-3545, 2002.
- 45 NAGATA, K.-I. et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18538-18543, 2003.
- 46 KREMER, B. E.; HAYSTEAD, ; MACARA, I. G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 10, p. 4648-4659, 2005.
- 47 JOO, ; SURKA, C.; TRIMBLE, W. S. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. **Developmental Cell**, v. 13, n. 5, p. 677-690, 2007.
- 48 BOWEN, R. et al. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 187-197, 2011.
- 49 TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHI, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. **Current Biology**, v. 19, n. 2, p. 140-145, 2009.
- 50 GHOSSOUB, R. et al. Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 12, p. 2583-2594, 2013.
- 51 AGETA-ISHIHARA, et al. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. **Nature Communications**, v. 4, n. 2532, 2013. doi: 10.1038/ncomms3532.
- 52 HU, et al. Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. **Current Biology**, v. 22, n. 12, p. 1109-1115, 2012.
- 53 QI, M. et al. Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 3, p. 994-1000, 2005.
- 54 ESTEY, M. P. et al. Mitotic regulation of SEPT9 protein by cyclindependent kinase 1 (Cdk1) and Pin1 protein is important for the completion of cytokinesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30075-30086, 2013.
- 55 PAGLIUSO, A. et al. A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. **EMBO Reports**, v. 17, n. 6, p. 858-873, 2016.
- 56 TAKEHASHI, M. et al. Septin 3 gene polymorphism in Alzheimer's disease. **Gene Expression**, v. 11, n. 5-6, p. 263-270, 2004.

- 57 DONG, et al. Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vectormediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12438-12443, 2003.
- 58 IHARA, et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24095-24102, 2003.
- 59 MEGONIGAL, M. D. et al. t(11;22)(q23;q11.2) in acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6413-6418, 1998.
- 60 ZIEGER, B. et al. Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. **Gene**, v. 261, n. 2, p. 197-203, 2000.
- 61 ENGIDAWORK, E. et al. Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. **Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 145-154, 2003.
- 62 KUO, Y.-C. et al. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 5, p. 923-934, 2015.
- 63 JOBERTY, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 861-866, 2001.
- 64 BAUST, T. et al. Protein networks supporting AP-3 function in targeting lysosomal membrane proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 5, p. 1942-1951, 2008.
- 65 TRAIKOV, S. et al. Septin6 and Septin7 GTP binding proteins regulate AP-3- and ESCRT-dependent multivesicular body biogenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e109372, 2014.
- 66 KUO, Y.-C. et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. **Human Mutation**, v. 33, n. 4, p. 710-719, 2012.
- 67 CHANCE, F.; WINDEBANK, A. J. Hereditary neuralgic amyotrophy. **Current Opinion in Neurology**, v. 9, n. 5, p. 343-347, 1996.
- 68 KUHLENBÄUMER, G. et al. Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. **Nature Genetics**, v. 37, n. 10, p. 1044-1046, 2005.
- 69 LÓPEZ, J. A. et al. Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, v. 91, n. 12, p. 4397-4418, 1998.
- 70 KATO, et al. Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ib β produces a Bernard-Soulier phenotype with increased α -granule size. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2339-2344, 2004.

- 71 ZIEGER, ; HASHIMOTO, Y.; WARE, J. Alternative expression of platelet glycoprotein Ib(β) mRNA from an adjacent 5' gene with an imperfect polyadenylation signal sequence. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 3, p. 520-525, 1997.
- 72 BARTSCH, I. et al. Deletion of human GP1BB and SEPT5 is associated with Bernard-Soulier syndrome, platelet secretion defect, polymicrogyria, and developmental delay. **Thrombosis Haemostasis**, v. 106, n. 3, p. 475-483, 2011.
- 73 TANAKA, et al. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, bradeion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 3, p. 547-553, 2001.
- 74 TANAKA, M. et al. Rapid and quantitative detection of human septin family Bradeion as a practical diagnostic method of colorectal and urologic cancers. **Medical Science Monitor**, v. 9, n. 7, p. MT61-MT68, 2003.
- 75 CRAVEN, R. A. et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. **Proteomics**, v. 6, n. 9, p. 2853-2864, 2006.
- 76 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.
- 77 BONGIOVANNI, L. et al. Bradeion (SEPT4) as a urinary marker of transitional cell bladder cancer: a real-time polymerase chain reaction study of gene expression. **Journal of Urology**, v. 187, n. 6, p. 2223-2227, 2012.
- 78 SITZ, J. H. et al. The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. **Neuroscience**, v. 157, n. 3, p. 596-605, 2008.
- 79 PENNINGTON, K. et al. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 12, p. 1102-1117, 2008.
- 80 KINOSHITA, A. et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551-1560, 1998.
- 81 AGETA-ISHIHARA, et al. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. **Molecular Brain**, v. 6, n. 35, 2013. doi: 10.1186/1756-6606-6-35.
- 82 IWAISAKO, et al. Loss of Sept4 exacerbates liver fibrosis through the dysregulation of hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 768-778, 2008.
- 83 GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Sept4/ARTS is required for stem cell apoptosis and tumor suppression. **Genes & Development**, v. 24, n. 20, p. 2282-2293, 2010.

- 84 FUCHS, et al. Sept4/ARTS regulates stem cell apoptosis and skin regeneration. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 286-289, 2013.
- 85 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.
- 86 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.
- 87 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.
- 88 CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2762-2777, 2003.
- 89 VERSELE, M. et al. Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 10, p. 4568-4583, 2004.
- 90 TRIMBLE, W. S. Septins: a highly conserved family of membrane-associated GTPases with functions in cell division and beyond. **Journal of Membrane Biology**, v. 169, n. 2, p. 75-81, 1999.
- 91 FUNG, K. Y. Y.; DAI, L.; TRIMBLE, S. Cell and molecular biology of septins. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 310, p. 289-339, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4
- 92 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.
- 93 SHEFFIELD, P. J. et al. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.
- 94 MENDOZA, M.; HYMAN, A. A.; GLOTZER, G. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. **Current Biology**, v. 12, n. 21, p. 1858-1863, 2002.
- 95 FARKASOVSKY, M. et al. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 643-656, 2005.
- 96 HUANG, Y.-W. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **FEBS Journal**, v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.
- 97 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.

- 98 MACEDO, 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.
- 99 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.
- 100 VEGA, I. E.; HSU, S. C. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. **NeuroReport**, v. 14, n. 1, p. 31-37, 2003.
- 101 ROBERTSON, C. et al. Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 1, p. 519-527, 2004.
- 102 NAGARAJ, S. et al. Role of nucleotide binding in septin-septin interactions and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 16, p. 5120-5137, 2008.
- 103 VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701-715, 2004.
- 104 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.
- 105 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.
- 106 VETTER, R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299-1304, 2001.
- 107 LUPAS, A.; VAN DYKE, M.; STOCK, J. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-1164, 1991.
- 108 BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.
- 109 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. 317-328, 2012.
- 110 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003a.
- 111 NAKATSURU, S.; SUDO, K.; NAKAMURA, Y. Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, p. 82-87, 1994.

112 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. **Clinical Genetics**, v. 77, n. 6, p. 511-524, 2010.

113 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 169-180, 2014.

114 OEGEMA, K. et al. Purification and assay of a septin complex from Drosophila embryos. **Methods in Enzymology**, v. 298, p. 279-295, 1998.

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

116 MORTENSEN, H. et al. A molecular genetic dissection of the evolutionarily conserved N terminus of yeast Rad52. **Genetics**, v. 161, n. 2, p. 549-562, 2002.

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

118 KANEKO, A. et al. Tandem affinity purification of the Candida albicans septin protein complex. **Yeast**, v. 21, n. 12, p. 1025-1033, 2004.

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

120 HSU, S.-C. et al. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1111-1122, 1998.

121 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.

122 KIM, 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.

123 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.

124 TSANG, C. W. et al. Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 739-749, 2011.

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

126 LOW, C.; MACARA, G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697-30706, 2006.

127 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.

128 SELLIN, M. E. et al. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Molecular Biology of The Cell**, v. 22, n. 23, p. 4588-4601, 2011.

129 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.

130 AUSUBEL, F. M. et al. (Ed.). **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 5th ed. New York: Wiley, 2002.

131 SHEFFIELD, P. J. et al. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.

132 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

133 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

134 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. cap. 52, p. 571-607.

135 SECKLER, R.; WU, G.-M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate. formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 13, p. 7655-7661, 1990.

136 DAMALIO, J. C. P. et al. Self assembly of human septin 2 into amyloid filaments. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 628-636, 2012.

137 COOPER, T. M.; WOODY, R. W. The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin. **Biopolymers**, v. 30, n. 7-8, p. 657-676, 1990.

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

139 GARCIA, W. et al. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro. **Biochemistry**, v. 46, n. 39, p. 11101-11109, 2007.

140 ORTORE, et al. Structural and thermodynamic properties of septin 3 investigated by small-angle X-ray scattering. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 12, p. 2896-2902, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação das construções das septinas de interesse. Os nucleotídeos sublinhados constituem o sítio de reconhecimento da enzima de restrição.

Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	T _m (°C)
SEPT6G-Forward- <i>Bam</i> HI (pET-Duet)	CGGGATCCGGGCTTCTGCTTCAACATCC	56,4
SEPT6G-Reverse- <i>Hind</i> III (pET-Duet)	CAAGCTTTTACTCCTCCAGCTTACAGCG	56,4
SEPT6GC-Forward- <i>Bam</i> HI (pET SUMO)	CGGGATCCGGGCTTCTGCTTCAACATCC	54,0
SEPT6GC-Reverse- <i>Hind</i> III (pET SUMO)	CCCAAGCTTTTAAATTTTCTTCTCTTTGTCTCTC	49,5
SEPT7GC-Forward- <i>Bam</i> HI (pET SUMO)	CGGGATCCGGTTTTGAATTCACGCTTATGG	52,7
SEPT7GC-Reverse- <i>Hind</i> III (pET SUMO)	CCCAAGCTTTTAAAAGATCTTCCCTTTCTTCTTG	51,3
SEPT2GC-Forward- <i>Eco</i> RI (pET SUMO)	GGAATTCGGTTTTGAGTTCACACTGATGGTGG	58,2
SEPT2GC-Reverse- <i>Xho</i> I (pET SUMO)	GCTCGAGTTACACGTGGTGCCCGAG	63,2
SEPT2G _{6C} -Forward- <i>Eco</i> RI (pET SUMO)	GGAATTCGGTTTTGAGTTCACACTGATG	51,9
SEPT2G _{6C} -Reverse- <i>Hind</i> III (pET SUMO)	CCCAAGCTTTTAAATTTTCTTCTCTTTGTCTCTC	49,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice B – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação das construções das septinas mutantes. Os nucleotídeos sublinhados constituem as mutações sítio-dirigidas.

Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
SEPT2G ^{T78M} -Forward	CCTGGAGCAGCAGAAAAAATTGAAAGAAT <u>TGG</u> TCCAGATTGAGGCT
SEPT2G ^{T78M} -Reverse	AGCCTCAATCTGGACCA <u>TT</u> CTTTCAATTTTTCTGCTGCTCCAGG
SEPT2G ^{D185N} -Forward	TGTGCCTGTCATTGCAAAAGCTA <u>A</u> CACTCTCACCCCT
SEPT2G ^{D185N} -Reverse	AGGGTGAGAGTGT <u>T</u> AGCTTTTGCAATGACAGGCACA

Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice C – Composição dos tampões utilizados nas diferentes etapas de purificação no preparo das amostras para cada experimento realizado.

Objetivo	Experimento	Tampão de lise	Tampão de eluição na afinidade	Tampão da gel filtração e estocagem
Estudo na interface NC heterodimérica	Estado oligomérico por massa molecular aparente Dicroísmo Circular (CD)	25 mM Tris (pH 7,8) 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol	Tampão de lise	20 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 150 mM NaCl 5 % glicerol
	Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	10 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol	Tampão de lise	10 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 150 mM NaCl
Estudo na interface G heterodimérica	Estado oligomérico por massa molecular aparente	25 mM Tris (pH 7,8) 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol	[SEPT2G] 20 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 2 mM MgCl ₂ 10 % glicerol	20 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 5 % glicerol
			[SEPT6G e Coexpressões] Tampão de lise	
	Western Blot Teor de nucleotídeo Atividade enzimática	25 mM Tris (pH 7,8) 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol	[SEPT2G e SEPT6G] 20 mM Fosfato de Na (pH 7,8) 2 mM MgCl ₂ 10 % glicerol	—
			[Coexpressões] Tampão de lise	

(continua)

(continuação)

Objetivo	Experimento	Tampão de lise	Tampão de eluição na afinidade	Tampão da gel filtração e estocagem
Estudo de estabilidade e propensão à formação de amiloides	Dicroísmo circular (CD) Espectroscopia de fluorescência com ThT Espalhamento de luz a múltiplos ângulos (MALS) Espalhamento de luz à baixo ângulo (SAXS)	25 mM Tris (pH 7,8) 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol	Tampão de lise	25 mM Tris (pH 7,8) 150 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 5 mM β-mercapetanol 5 % glicerol

Fonte: Elaborada pela autora.