UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

SINARA TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS

Septinas de *Ciona intestinalis*: estudos voltados à formação de heterocomplexos

São Carlos

2019

SINARA TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS

Septinas de *Ciona intestinalis*: estudos voltados à formação de heterocomplexos

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Biomolecular
Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Ulian de Araújo

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2019

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

Morais, Sinara Teixeira do Brasil
Septinas de Ciona intestinalis: estudos voltados à formação de heterocomplexos / Sinara Teixeira do Brasil Morais; orientadora Ana Paula Ulian de Araújo - versão corrigida -- São Carlos, 2019.
107 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Septinas . 2. Filamentos. 3. Heterocomplexos. 4. Ciona intestinalis. I. Ulian de Araújo, Ana Paula, orient. II. Título.

Aos meus pais, Mara e Jefferson (*in memoriam*), com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre presente e pelo consolo e paz que me traz nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Ana Paula por ter sido sempre tão disponível, pela orientação e por todo o auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Aos técnicos do grupo de Biofísica, Andressa, Bel, Fernando e Rafael. Em especial, agradeço a Andressa que participou ativa e diretamente no desenvolvimento e execução desse trabalho. Muito obrigada por toda contribuição científica e técnica as quais foram de grande valor para a conclusão desse projeto.

Aos amigos que fiz, agradeço por todos os momentos de descontração, trocas de ideias e sessões de terapia em grupo. Aninha, Carla, Debora Orcia, Gabis Belem, Gabis Brognara, Helô, Heline, Higor Leozinho, Mari, Marina, Nati, Rapha, Samuel, Ton. Muito obrigada, queridos, vocês foram essenciais nessa caminhada.

Ao Dr. Rodrigo V. Portugal do LNNano, CNPEM, pela infraestrutura e colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

À Ms. Deborah C. Mendonça, por toda ajuda na execução e análise nos experimentos de MET e pela amizade.

Aos meus pais, por terem se doado uma vida inteira pra mim e meus irmãos. Vocês são meu exemplo todos os dias. Aproveito para agradecer também aos meus irmãos por estarem sempre presentes.

Ao meu marido, por todo amor, apoio, incentivo e ainda, por sempre ter as palavras certas nos momentos certos. Você é incrível! Obrigada pelo seu amor, amizade e cumplicidade.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela infraestrutura e; às agências de fomento CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa, e a FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

MORAIS, S.T.B**. Septinas de *Ciona intestinalis*:** estudos voltados à formação de heterocomplexos. 2019. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Septinas são proteínas que ligam GTP e interagem entre si formando heterocomplexos, os quais se organizam em filamentos e estruturas de maior nível de organização. Em humanos são encontrados 13 genes que codificam septinas, as quais se dividem em 4 grupos com base na similaridade de sua organização estrutural. Análises filogenéticas identificaram quatro septinas ortólogas no deuterostômio *Ciona intestinalis*, as quais apresentam, cada uma, identidade com um dos quatro grupos de septinas de mamíferos. Tais proteínas foram nomeadas *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9 devido a identidade com as septinas humanas. Sabe-se que septinas de diferentes grupos interagem entre si formando heterocomplexos e, assim, a possibilidade de formar um oligômero único em *C. intestinalis* permite um modelo mais simples para o estudo da organização dos filamentos. Análises de bioinformática identificaram nessas proteínas motivos estruturais típicos de septinas, incluindo resíduos conservados para a ligação e hidrólise do GTP. As proteínas foram produzidas de forma heteróloga e a capacidade hidrolítica tanto de *Ci*SEPT2 como de *Ci*SEPT7 foiram confirmadas diretamente. Em contrapartida, *Ci*SEPT6 não apresentou atividade catalítica. Um sistema de coexpressão foi construído no qual as quatro septinas de *C. intestinalis* foram co-expressas e co-purificadas em diferentes arranjos, resultando na formação de heterocomplexos parciais além daquele contendo as quatro subunidades. A avaliação do estado oligomérico dos heterocomplexos parciais mostrou que estes correspondem majoritariamente a tetrâmeros e hexâmeros quando formados, respectivamente, por duas ou três subunidades. Estes oligômeros foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em que se observou que os mesmos se dispõem na forma de um bastão. Ensaios ainda mostraram que a polimerização desses oligômeros é dependente de *Ci*SEPT2 sugerindo que esta subunidade esteja possivelmente posicionada na extremidade do heterocomplexo. Adicionalmente, ensaios de polimerização realizados com o complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 revelaram que este é capaz de interagir com filamentos adjacentes, possivelmente via *coiled-coil*, formando estruturas de mais alta ordem, similar aos já observados em *S. cerevisiae*. Finalmente, experimentos utilizando termoforese em microescala (MST) mostraram uma maior afinidade de interação entre as subunidades quando oligômeros estão envolvidos, indicando que estes podem atuar como fator de nucleação para a formação dos heterocomplexos. Esse trabalho apresenta os primeiros estudos de caracterização das septinas de *C. intestinalis* mostrando a formação do heterocomplexo e representa um modelo simplificado e viável para estudos estruturais relativos a formação de filamentos de septinas. Assim, através de uma abordagem comparativa com complexos oriundos de outros organismos, este novo complexo poderá contribuir para a compreensão do mecanismo de montagem e controle da polimerização de septinas.

Palavras-chave: Septinas. Filamentos. Heterocomplexos. *Ciona intestinalis*.

ABSTRACT

MORAIS, S.T.B. ***Ciona intestinalis* septins**: heterocomplex assembly studies**.** 2019. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Septins are GTP-binding proteins that interact with each other forming heterocomplexes, filaments and higher order structures. The human genome encodes 13 septins, which are divided into 4 subgroups based on sequence similarity. Phylogenetic analysis demonstrated that only a single representative of each of these subgroups is present in the non-vertebrate chordate *Ciona intestinalis*. These proteins are named *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 and *Ci*SEPT9 due to their great similarity with human septins. Once septins from different subgroups are able to interact among themselves to form hetero-oligomeric complex, *C. intestinalis* representatives can be used as a simpler model for studies of septin complex assembly. Bioinformatics analysis identified typical structural motifs of septins in these proteins, including conserved residues for binding and hydrolysis of GTP. These septins were expressed and characterized biophysically and biochemically revealing that *Ci*SEPT2 and *Ci*SEPT7 are capable of hydrolyzing GTP. In contrast, *Ci*SEPT6 showed no catalytic activity. A coexpression system were designed in which the four septins of *C. intestinalis* were co-expressed and co-purified in different arrangements, resulting the formation of partial heterocomplexes in addition to that containing the four subunits. The oligomeric state of the partial heterocomplexes were confirmed corresponding to tetramer and hexamers when formed, respectively, by two or three subunits. Transmission electron microscopy analysis revealed that these oligomers assemblies are rod-like structures. The polymerization of these oligomers is dependent on *Ci*SEPT2 suggesting that this subunit occupies possibly the terminal positions of the heterocomplex. Additionally, polymerization assays performed with the *Ci*SEPT2/6/7/9 complex revealed that it is capable of interacting with adjacent filaments, possibly via *coiled-coil*, forming higher order structures similar to those already reported in *S. cerevisiae*. Finally, the interaction strenght among *C. intestinalis* septins were determined using microscale thermoforesis (MST), revealing a higher binding affinity when titration involves small oligomers instead of monomers, indicating that these may act as a nucleating factor for heterocomplex assembly. This work constitutes the first characterization of *C. intestinalis* septins presenting the heterocomplex assembly and represents a simplified and potential model for structural studies regarding the filaments assembly of septins. Thus, comparative studies involving complexes from other organisms may contribute to the understanding of the assembly mechanism and polymerization control of septins.

Keywords: Septins. Filaments. Heterocomplexes. *Ciona intestinalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Septinas durante o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*.....211

Figura 2 - Atuação de septinas em células de mamíferos.....222

Figura 3 - Estrutura primária de septinas.....255

Figura 4 - Classificação das septinas de mamíferos em grupos considerando seus domínios estruturais. 277

Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas de levedura.....280

Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo UNC59/UNC61 de septinas de *C.elegans*.....29

Figura 7 - Estrutura tridimensional do heterocomplexo SEPT2/6/7.. 300

Figura 8 - Comparação dos aminoácidos envolvidos na coordenação do íon magnésio com base na estrutura cristalográfica de *Sm*SEPT10 e SEPT2.. 311

Figura 9 - Alinhamento das sequências de septinas de vários organismos. 322

Figura 10 - Representação das diferentes formas de polimerização dos oligômeros de septinas em estruturas de mais alta ordem.....344

Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de *S. mansoni*, *Sm*SEPT5/10/7 durante processo de diálise.....355

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de *S. cerevisiae*, CDC3/10/11/12, durante processo de diálise.....355

Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de septinas humanas SEPT2/6/7 durante processo de diálise. 355

Figura 14 - Formação de homofilamentos de septinas.....366

Figura 15 - Árvore filogenética dos animais com simetria bilateral. 377

Figura 16 - Alinhamento múltiplo das sequências das septinas de *C. intestinalis* e as homólogas correspondentes humanas. 566

Figura 17 - Representação dos motivos e domínios presentes nas septinas de *C. intestinalis*. 58

Figura 18 - Representação das construções idealizadas para expressão das septinas de *C. intestinalis*.....59

Figura 19 - Teste de solubilidade das construções contendo apenas o domínio G analisado por SDS-PAGE 12%.....600

Figura 20 - Teste de solubilidade das construções truncadas para ensaios de cristalização. SDS-PAGE 12% mostrando. 611

Figura 21 - Perfil cromatográfico das proteínas recombinantes na coluna Superdex 200..... 622

Figura 22 - Análise da purificação dos heterocomplexos formados pelas septinas de *C. intestinalis* 644

Figura 23 - Espectros de CD das construções de septinas de *C. intestinalis*. 655

Figura 24 - Determinação da massa molecular por SEC-MALS para as septinas de *C. intestinalis*. 677

Figura 25 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo por cromatografia de troca iônica. 700

Figura 26 - Avaliação da atividade hidrolítica de *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 sobre o GTP ao longo do tempo.. 722

Figura 27 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das septinas de *C. instestinalis* a 300mM de NaCl. 733

Figura 28 - Micrografia do complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 300mM de NaCl. 755

Figura 29 - Purificação e estimativa de massa do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800mM de NaCl..... 766

Figura 30 - Micrografia do complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800 mM de NaCl. 777

Figura 31 - Micrografias dos complexos *Ci*SEPT6/7/9 (A) e *Ci*SEPT2/6/7 (B) a 300 mM de NaCl.. 78

Figura 32 - Micrografia do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7 em tampão contendo 300Mm de NaCl. 78

Figura 33 - Representação do filamento formado pelo heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7..... 79

Figura 34 - Representação do hexâmero *Ci*SEPT2/6/7 apresentando *Ci*SEPT2 nas extremidades em comparação com leveduras. 800

Figura 35 - Representação do heterocomplexo *Ci*SEPT6/7/9, identificando as prováveis posições das septinas e respectivos nucleotídeos ligados.. 811

Figura 36 - Representação do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 com *Ci*SEPT2 nas extremidades e *Ci*SEPT9 no centro do oligômero. 811

Figura 37 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7 a 800mM de NaCl. 833

Figura 38 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800mM de NaCl após 10 minutos de diálise..... 844

Figura 39 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7/9 após 30 minutos de diálise. 855

Figura 40 - Representação da estrutura do tipo trilho de trem. 866

Figura 41 - Proposta para a estrutura formada pela interação dos *coiled-coils* das septinas do grupo III (em vermelho).. 877

Figura 42 - Ilustração das construções utilizadas na avaliação das interações entre as subunidades de septinas. 89

Figura 43 - Curvas de interação envolvendo a interface G mediada por *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6.. 922

Figura 44 - Curvas de interação envolvendo a interface NC mediada por *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7.. 944

Figura 45 - Curvas de interação envolvendo a interface NC mediada pelos heterotetrâmeros formados por *Ci*SEPT2/6 e *Ci*SEPT7/9.....966

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação do número de septinas em organismos modelo. 244

Tabela 2 - Detalhamento de todas as construções utilizadas nesse trabalho. 422

Tabela 3 - Estratégia para produção dos complexos. 477

Tabela 4 - Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica 522

Tabela 5 - Dados sumarizados dos experimentos que compreendem o controle negativo de dimerização. Na figura os tracejado em vermelho indicam a ausência de mudança na fluorescência. 900

Tabela 6 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface G entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6.....922

Tabela 7 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface NC entre *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7.....944

Tabela 8 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface NC entre complexos tetraméricos. 966

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cdc	Genes que codificam proteínas de controle do ciclo celular (do inglês, *Cell division cycle)*, neste trabalho referentes às septinas de *Saccharomyces cerevisiae*
CDS	Sequência de DNA codificante
CD	Dicroísmo circular
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
*Cr*SEPT	Septina de *Chlamydomonas reinhardtii*
*Ci*SEPT	Septina de *Ciona intestinalis*
DO	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Domínio G	Domínio de ligação ao nucleotídeo
EST	*Expressed Sequence Tag*
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GDP	Guanosina-5'-difosfato
His-*tag*	Cauda de hexahistidina
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil-1-piperazina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Interface G	Interface de interação entre subunidades de septina que compreende a região de ligação ao nucleotídeo
Interface NC	Interface de interação entre subunidades de septina que envolve as regiões N e C-terminais do domínio G
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	*Isothermal Titration Calorimetry* (Calorimetria de Titulação Isotérmica)
K_D	Constante de dissociação
LB	*Lysogeny Broth* (meio de cultivo bacteriano)
Mg^{2+}	Íon magnésio

MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MST	*Microscale Thermophoresis* (Termoforese em microescala)
MSC	Sítio múltiplo de clonagem
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
PDB	*Protein Data Bank* (banco de dados de estruturas de moléculas biológicas)
P-*loop*	*Loop* de interação com o fosfato
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PS	Fosfatidilserina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SEC-MALS	Cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento a múltiplos ângulos
SEPT	Septina de humanos
*Sm*SEPT	Septina de *Schistosoma mansoni*
SUE	Elemento único de septinas
SUMO	*Small Ubiquitin Modifier*
UNC	Septina de *Caenorhabditis elegans*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Septinas 21
1.2 Septinas – funções celulares 22
1.3 Distribuição filogenética das Septinas 23
1.4 Domínios Estruturais 25
1.5 Formação de complexos 27
1.6 O papel da ligação e hidrólide do GTP 31
1.7 Polimerização dos complexos – Formação de filamentos 34
1.8 As septinas de *Ciona intestinalis* 37
2 OBJETIVOS 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 41
3.1 Obtenção das sequências codificantes (CDS) das septinas de *C. intestinalis* 41
3.2 Subclonagem nos vetores de expressão bacteriano 41
3.2.1 Descrição das construções e estratégias de co-purificação 41
3.2.1.1 *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9 44
3.2.1.2 Construções visando cristalização do heterocomplexo 44
3.2.1.3 Construções contendo apenas o domínio G 45
3.2.1.4 Construções visando co-expressão e/ou co-purificação das subunidades para obtenção dos complexos 45
3.2.1.5 Co-expressão de *Ci*SEPT2/6 46
3.2.1.6 Co-expressão de *Ci*SEPT7/9 46
3.2.1.7 Co-purificação de *Ci*SEPT2/6/7 46
3.2.1.8 Co-purificação de *Ci*SEPT6/7/9 47
3.2.1.9 Co-purificação de *Ci*SEPT2/6/7/9 47
3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes 48
3.4 Estimativa da massa molecular das septinas de *Ciona intestinalis* (SEC-MALS) 49
3.5 Análise da estrutura secundária por Dicroísmo Circular 50
3.6 Análise do conteúdo de nucleotídeo e atividade GTPásica 50
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão 52
3.8 Estudo das interações entre as septinas de *C. intestinalis* utilizando termoforese em micro escala (MST) 53
4 RESULTADOS 55

4.1 Septinas de *Ciona intestinalis* – análises de bioinformática 55
4.2 Produção heteróloga das proteínas de *C. intestinalis* 59
4.3 Dicroísmo Circular (CD) 65
4.4 Determinação da massa molecular e oligomerização das proteínas de *C. intestinalis* 66
4.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e da atividade GTPásica 69
4.6 Análise da morfologia dos oligômeros por microscopia eletrônica de transmissão ... 73
4.7 Ensaios de polimerização dos complexos *Ci*SEPT6/7/9, *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9 *in vitro* 82
4.8 Avaliação da afinidade entre as subunidades (MST) 88
4.8.1 Avaliação das interações via interface G formada entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6 90
4.8.2 Avaliação das interações via interface N-C formada por *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 93
5 CONCLUSÕES 97
REFERÊNCIAS 99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

A descoberta das septinas se deu em 1971 por Hartwell, num estudo que visava identificar genes relacionados à divisão celular em linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.[1] Esse estudo levou à identificação de quatro mutantes que apresentavam deficiência na conclusão do ciclo celular. Esses mutantes, mesmo tendo finalizado a separação dos núcleos, não eram capazes de concluir a citocinese, levando ao fenótipo letal de formação de células multinucleadas (Figura 1A).[1-3] Hartwell observou que tais mutações encontravam-se nos genes que codificavam as proteínas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12, sendo estas, responsáveis pela formação de estruturas filamentosas presentes no septo que separa a célula-mãe da célula-filha. Por terem sido localizadas no septo de divisão, anos mais tarde tais proteínas passaram a ser denominadas septinas. [4]

Posteriormente, as estruturas formadas por essas proteínas foram identificadas por microscopia eletrônica como sendo estruturas filamentosas altamente ordenadas na forma de um anel de 10 nm de diâmetro, intimamente associado à membrana plasmática e circundando o septo de divisão da célula (Figura 1B).[5] Mais tarde, os produtos desses genes foram identificados por microscopia de imunofluorescência na estrutura filamentosa formada no septo entre as células mãe e filha, confirmando assim a participação de tais proteínas na formação do septo (Figura 1C). [6-10]

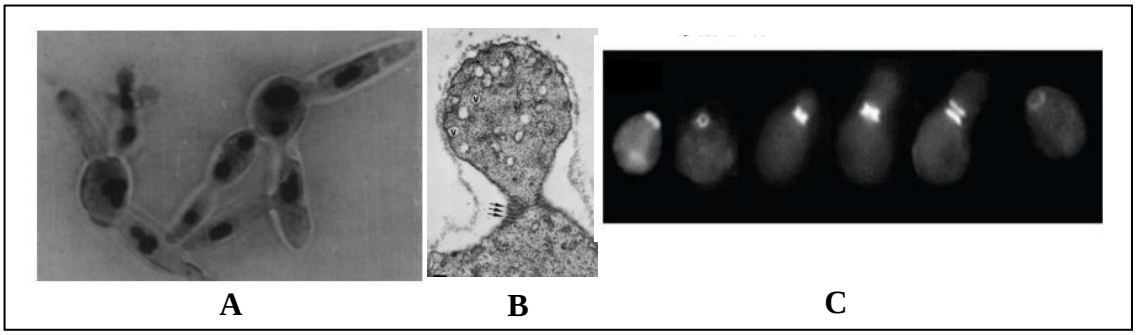


Figura 1 - Septinas durante o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*. A) Formação de células multinucleadas. B) Micrografia de uma célula em brotamento destacando-se os filamentos de septinas circundando o septo. C) Localização das septinas durante a citocinese, identificada por microscopia de fluorescência.

Fonte: a) HARTWELL[1]; b) BYERS[5]; c) GLADFELTER et al.[7]

1.2 Septinas – funções celulares

Estudos funcionais tem mostrado que a atuação das septinas não está restrita à citocinese, indicando que essas proteínas participam de diversos processos celulares importantes, tais como ciliogênese e neurogênese (Figura 2).[11-14] Em células que não sofrem processo de divisão celular, como neurônios e espermatozóides, as septinas podem atuar como uma base para o recrutamento de outras proteínas ou ainda, formando barreiras de difusão que compartimentam proteínas de membrana em domínios celulares específicos.[15-21] Estudos também relacionaram as septinas a outras funções celulares durante a infecção bacteriana e na imunidade inata.[22]

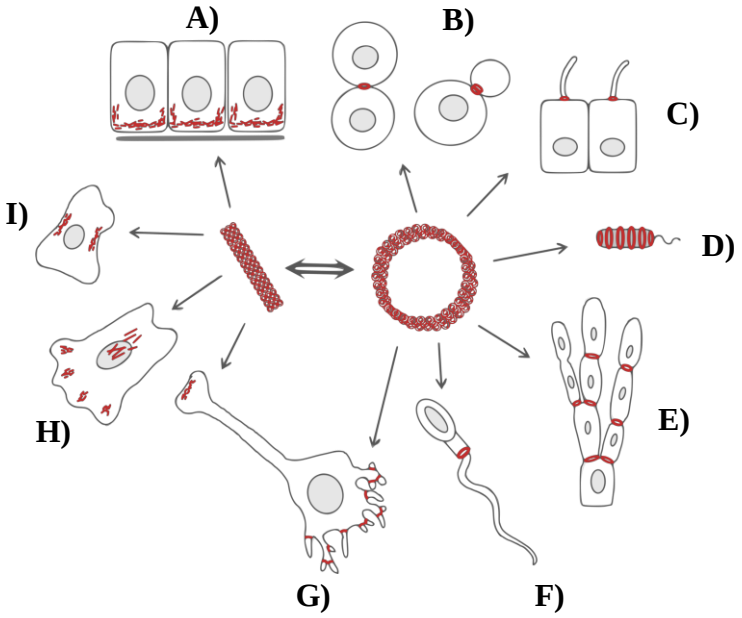


Figura 2 - Atuação de septinas em células de mamíferos. A) polarização em células epiteliais; B) formação do sulco de clivagem em células animais e levedura; C) barreira de difusão em cílios; D) imobilização de bactéria em células infectadas; E) crescimento de hifas em fungos filamentosos; F) barreira de difusão no ânulus de espermatozóides em mamíferos; G) mediação de exocitose durante sinapse neuronal e crescimento dos dendritos; H) migração celular e. I) rigidez celular. Em vermelho estão destacadas as estruturas formadas por septinas.

Fonte: AKHMETOVA[23]

A associação de septinas com proteínas do citoesqueleto e com membranas, além de sua capacidade de formar filamentos, levou à sua identificação como o ‘quarto componente do citoesqueleto’. [22]

Além de seu papel fisiológico, estudos indicam que alterações no nível de expressão de septinas estão relacionados com diversos tipos de câncer e outras desordens como a infertilidade masculina.[24-25] Além disso, por terem sido encontradas em agregados proteicos característicos presentes em cérebros de paciente acometidos com as doenças de Alzheimer e Parkinson, as septinas também são associadas às doenças degenerativas.[25-26]

1.3 Distribuição filogenética das Septinas

Até recentemente, acreditava-se que os genes que codificam septinas estivessem restritos a leveduras e animais.[27] Porém, a medida que são disponibilizados dados de sequenciamento de novos genomas, tem sido possível identificar a presença de sequências homólogas em diversos eucariotos, como outros fungos, nemátodos, moscas e mamíferos.[28-34] Em 2007, um estudo utilizando a sequência de nucleotídeos da proteína Cdc3 de *S. cerevisiae* na busca por sequências homólogas nos bancos de dados disponíveis, revelou a presença de septinas também em algas verdes, alga marrom e protozoários ciliados.[35-43] Também no mesmo ano, análises filogenéticas realizadas por Cao e colaboradores levaram a identificação de septinas ortólogas nos genomas do equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* e do urocordado *Ciona intestinalis*.[44] Sucessivas análises filogenéticas tem sido realizadas por grupos independentes ampliando a presença dessa classe de proteínas a diversos outros organismos eucariotos. No entanto, até o momento não foi reportada a presença de genes codificando septinas em nenhum representante do reino Plantae.[27, 35]

O número de genes codificando septinas é bastante variável entre os organismos, sendo apenas 1 em *Chlamydomonas reinhardtii* e 13 em humanos (Tabela 1).[27,35] Em humanos, o número de produtos gênicos é ainda maior devido a expressão de isoformas resultantes de *splicing* alternativo e modificações pós traducionais que estão relacionadas com expressão tecido-específica.[45-47] Embora a função das diferentes isoformas ainda não seja conhecida,[48] sugere-se que nem todas desempenhem a mesma função contribuindo para a complexidade funcional dessas proteínas.

Tabela 1 - Variação do número de septinas em organismos modelo.

Organismo	Número de septinas	Nome
Homo sapiens	13	SEPT1; SEPT2; SEPT3; SEPT4; SEPT5; SEPT6; SEPT7; SEPT8; SEPT9; SEPT10; SEPT11; SEPT12 e SEPT14
Eremothecium gossypii	7	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6 e Hyp7
Candida albicans	7	Cdc3, Cdc10; Cdc11; Cdc12; Sep7, Spr3 e Spr28
Schizosaccharomyces pombe	7	Spn1; Spn2; Spn3; Spn4; Spn5; Spn6 e Spn7
Saccharomyces cerevisiae	7	Cdc3, Cdc10; Cdc11; Cdc12; Shs1, Spr3 e Spr28
Neurospora crassa	6	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5 e Hyp6
Aspergillus nidulans	5	ASPA; ASPB; ASPC; ASPD e ASPE
Schistosoma mansoni	4	*Sm*SEPT5; *Sm*SEPT10; *Sm*SEPT7.1 e *Sm*SEPT7.1
Ciona intestinalis	4	----
Xenopus leavis	2	Hyp1 e SEPT2
Caenorhabditis elegans	2	UNC-51 e UNC-59
Chlamydomonas reinhardtii	1	SEP1 (ou CrSEPT)

Fonte: Adaptada de WEIRICH[10]; ZERAIK[49]; CAO[44]; PINTO[50]

A recente descoberta de septinas em organismos fotossintetizantes mudou o que se pensava sobre a origem e evolução dessas proteínas. Embora ausente em plantas, a identificação de tais proteínas em grupos evolutivamente distintos sugere a existência de um ancestral comum para septinas que possivelmente ocupava um nível basal no processo evolutivo dos eucariotos. A partir deste ancestral, ao longo da evolução, alguns grupos perderam os genes de septinas, como no caso das plantas, outros mantiveram apenas um gene,

como é o caso da alga *C. reinhardtii*, enquanto outras linhagens os proliferaram, como ocorreu, por exemplo, nos humanos.[27, 35] O aumento no número de genes para septinas em humanos é atribuído, por alguns autores, pela duplicação de genes pré-existentes.[44]

Uma questão envolvendo septinas, e em aberto ainda, está relacionada a função da septina ancestral e quais seriam as razões da perda desse gene em algumas linhagens eucarióticas, enquanto em outras linhagens o gene foi mantido e amplificado.

1.4 Domínios Estruturais

Tipicamente, as septinas apresentam três domínios estruturais (Figura 3), sendo eles: um N-terminal variável, que pode incluir uma região polibásica; um domínio central GTPásico responsável pela ligação e, em muitos casos, pela hidrólise do nucleotídeo de guanina; e ainda, uma região C-terminal que pode incluir sequências características do tipo *coiled-coil*, as quais estão relacionadas com interações entre septinas ou outras proteínas.

Por apresentarem domínio conservado de ligação ao nucletídeo guanina, as septinas estão classificadas na família das P-*loop* GTPases.[51] No entanto, por não apresentarem os motivos G2 e G5, as septinas estão mais relacionadas ao grupo das Ras GTPases do que de outros membros dessa superclasse.

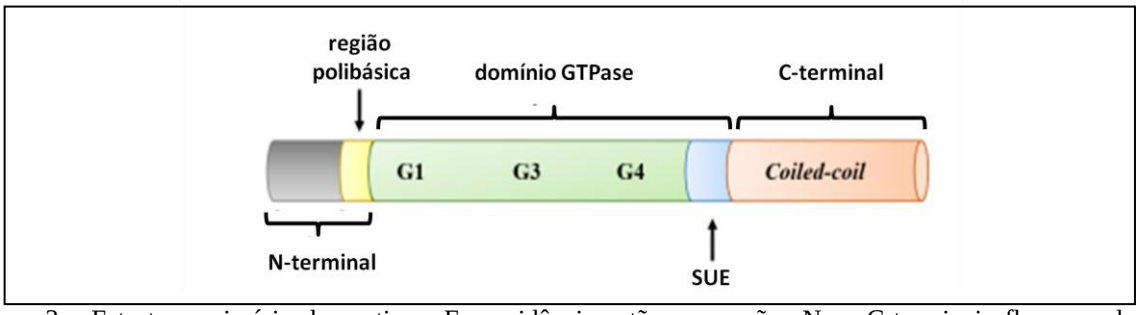


Figura 3 - Estrutura primária de septinas. Em evidência estão as porções N- e C-terminais flanqueando o domínio GTPásico. Além disso estão ilustradas as posições da região polibásica no domínio N-terminal bem como o motivo que contém o elementos único de septinas (SUE).

Fonte: Adaptada de NEUBAUER[54]

Por ser bastante variável, o domínio N-terminal não apresenta similaridade entre as septinas, exceto pela região polibásica (hélice α0), que está na interface entre os domínios N e

G. Apesar de não ser conservada, essa porção rica em resíduos básicos, apresenta um resíduo básico (H, K ou R) nas posições 1, 2, 5 e 6 de 60-78% de 162 septinas analisadas.[27] Dados na literatura apontam que essa região desempenha um papel regulatório por meio da interação com fosfolipídeos da membrana plasmática.[55-57] Já foi observado que septinas de diferentes organismos são capazes de interagir com fosfolipídeos, sendo que esta interação ocorre preferencialmente com fosfolipídeos de carga negativa.[19,58-59] Outros trabalhos evidenciaram ainda a capacidade dessas proteínas induzirem a tubulação em vesículas unilamelares gigantes, sendo este um indício de que essas proteínas podem levar a mudanças na membrana.[58]

O domínio de ligação ao nucleotídeo guanina, caracterizado por ligar e hidrolisar moléculas de GTP é a região mais conservada entre as septinas, apresentando no mínimo 75% de similaridade entre septinas de organismos da mesma espécie. [31, 34, 60-61] Nesse domínio, o motivo P-*loop*, caracterizado pelo consenso G1 (GxxGxGKST),[52] forma um *loop* flexível que interage com o grupo fosfato do nucleotídeo.[62] O motivo G3, caracterizado pelo consenso DxxG, é precedido por uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos e se liga ao íon Mg^{2+} interagindo com os fosfatos-β e -γ do GTP. O motivo G4, caracterizado pelo consenso xKxD completamente conservado em septinas, corresponde à sequência AKAD e determina a especificidade à ligação do GTP.[27, 51, 53] Precedendo o domínio C-terminal existe uma região que engloba 53 aminoácidos altamente conservados entre as septinas, denominada *Septin Unique Element* (SUE).[63] Além de distinguir as septinas de outras GTPases, estudos sugerem que o SUE contribua para a estabilização das interfaces entre as subunidades para a formação de filamentos.[51, 64]

O domínio C-terminal das septinas apresenta comumente sequências preditas como sendo capazes de formar estruturas do tipo *coiled-coil*.[65] Essa região pode estar relacionada com a estabilização em interações entre septinas, de septinas com outras proteínas e, além disso, pode estar envolvida no controle da montagem dos filamentos.[51, 64 e 66]

Considerando as similaridades de seus domínios estruturais, as septinas de mamíferos foram classificadas em 4 grupos, os quais podem ser observados na Figura 4.[48, 67-68] Os grupos II e IV são caracterizados por apresentarem uma sequência longa no C-terminal predita como *coiled-coil*. O grupo III, por sua vez, é caracterizado por um C-terminal contendo uma sequência curta *coiled-coil* e, por fim, as septinas classificadas no grupo I não apresentam sequência que corresponde a esse tipo de estrutura. Ainda, enquanto a maioria das

septinas são cataliticamente ativas, os representantes do grupo II são incapazes de hidrolizar o GTP.[22, 47]

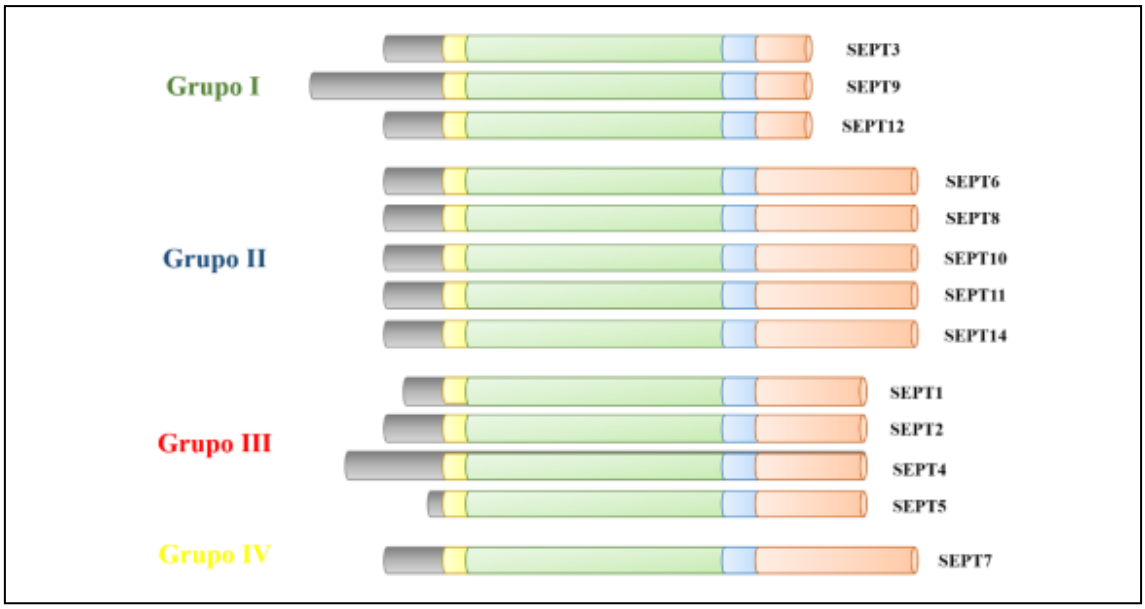


Figura 4 - Classificação das septinas de mamíferos em grupos considerando seus domínios estruturais.

Fonte: Adaptada de NEUBAUER[54]

1.5 Formação de complexos

As septinas são proteínas capazes de interagirem entre si formando hetero-oligômeros apolares que se organizam na forma de um bastão, os quais são capazes de polimerizar formando filamentos. Até o momento não há consenso que elas possam atuar como uma unidade independente e, talvez por isso, muitas septinas quando expressas individualmente são pouco solúveis tendendo a agregação.[63, 69-70] Em leveduras, mutações que impedem a formação de filamentos de septinas são letais, indicando que complexos e filamentos parecem ser a forma funcional das septinas.[71] De todo modo, uma característica comum a todos complexos de septinas descritos até o momento é o arranjo linear dos monômeros, de modo a formar polímeros não polares, diferentes daqueles formados por actina e microtúbulos cujas extremidades são quimicamente distintas.[22, 54]

Complexos hetero-oligoméricos foram isolados em leveduras, moscas, camundongos e humanos, tendo sido obtidos também *in vitro*. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas, no entanto, sua função ainda não está bem estabelecida.[9, 15, 31, 72-73]

Como dito anteriormente, diferentes organismos expressam um número diferente de septinas e, por consequência disso, observa-se a produção de heterocomplexos de diferentes tamanhos e composições. Em *Candida albicans* e *S. cerevisiae*, por exemplo, foram isolados heterocomplexos octaméricos.[74] Em *S. cerevisiae*, o complexo hetero-oligomérico é formado pelas quatro septinas tidas como essenciais para a viabilidade celular (Cdc11, Cdc12, Cdc3 e Cdc10). Esse complexo foi analisado por microscopia eletrônica, revelando que se tratava de um octâmero contendo duas cópias de cada septina na seguinte conformação: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 (Figura 5). O mesmo heterocomplexo foi obtido *in vitro* com a estequiometria de 2:2:2:2.[75-77]

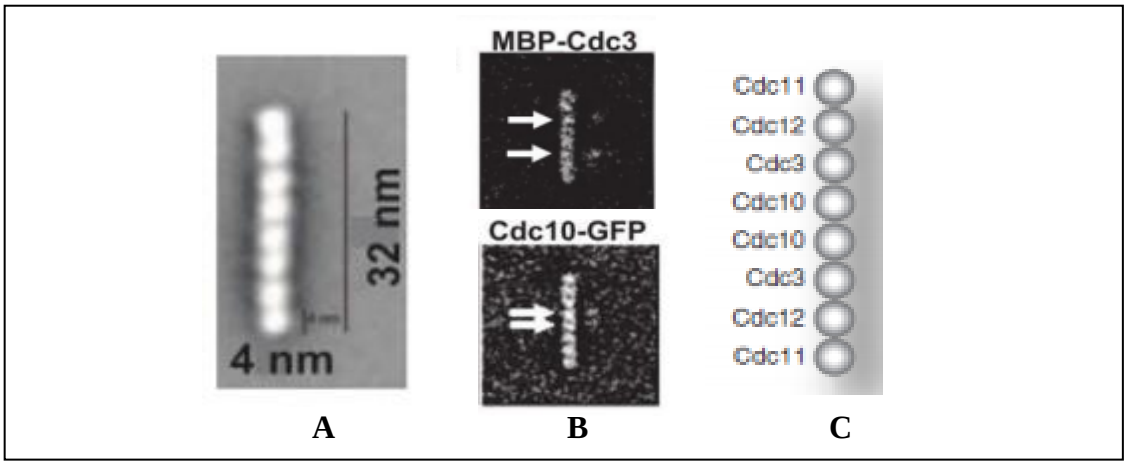


Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas de levedura. A) Complexo octamérico em forma de bastão em alta concentração de sal. B) Classes representativas do complexo utilizando MBP e GFP para a localização da septina Cdc3 e Cdc10 respectivamente. C) Representação do complexo octamérico com a posição de cada uma das quatro septinas envolvidas, que em levedura são chamadas de Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12.

Fonte: Adaptada de BERTIN[36]; FRAZIER[75]

Já em *D. melanogaster*, estudos bioquímicos indicaram a formação de um complexo hexamérico formado por três das cinco septinas expressas por esse organismo sendo denominadas *Pnut*, Sep1 e Sep2, na proporção de 2:2:2.[78] Composição similar foi observada em *Schistosoma mansoni*, em que o complexo recombinante formado pelas septinas *Sm*Sept5, *Sm*SEPT10 e *Sm*SEPT7.2 foi identificado por espectroscopia de massas.[49] Já em *C. Elegans*, que apresenta apenas duas septinas, foi observada a formação de heterotetrâmeros dispostos da seguinte forma: UNC-59/UNC-61/UNC61/UNC-59 (Figura 6).[64]

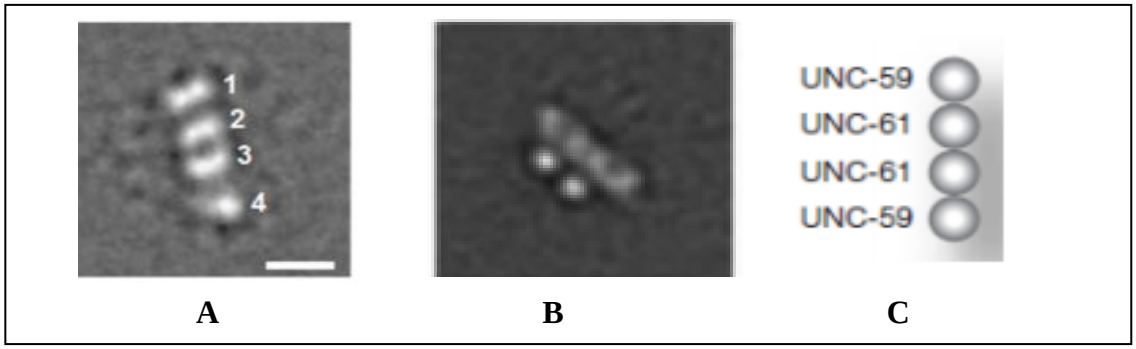


Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo UNC59/UNC61 de septinas de *C.elegans*. A) Unidades do complexo tetramérico UNC-59/UNC61. B) Classes representativas do complexo tetramérico em forma de bastão em alta concentração de sal e localização da septina UNC-61 fusionada à GFP. C) Representação do complexo tetramérico com a posição das septinas envolvidas.

Fonte: JOHN[64]

A única estrutura tridimensional de um complexo de septinas disponível no PDB (*Protein data bank*) é composta pelas septinas humanas SEPT2/6/7.[79] Nessa estrutura, embora com resolução de 4 Å, dentro da célula unitária foi possível distinguir a presença de um trímero contendo uma cópia de cada septina. A estrutura foi capaz de revelar ainda a formação de um filamento formado por subunidades hexaméricas apolares apresentando duas cópias de cada septinas, arranjadas simetricamente.

Os pontos de interação entre as septinas para a formação do heterocomplexo também puderam ser observados de modo que SEPT2 forma um homodímero pela interface NC (que envolve regiões N e C-terminais do domínio G) deixando livre a interface G (que envolve a região de ligação do nucleotídeo) para interagir com a SEPT6. Esta, por sua vez, está ligada à SEPT7 pela interface NC.[79] Mesmo estando presentes nas construções, os domínios N- e C-terminais não apresentaram densidade eletrônica na estrutura e assim, na Figura 7, o C-terminal de cada septina está representado apenas por setas, as quais projetam-se ortogonalmente ao eixo do hexâmero indicando a orientação desses domínios.

Baseando-se em dados complementares envolvendo microscopia eletrônica de transmissão, os autores deste trabalho propuseram a posição das subunidades de modo que estas se dispõem como mostra a Figura 7.

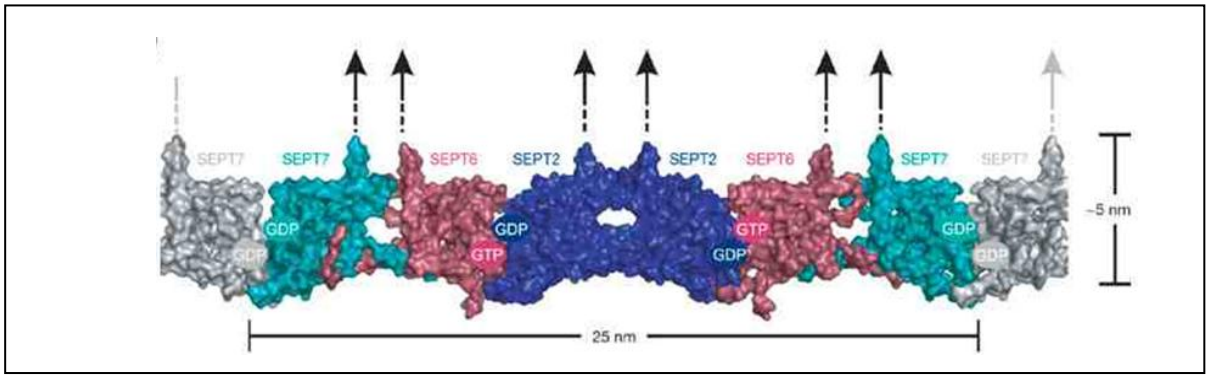


Figura 7 - Estrutura tridimensional do heterocomplexo SEPT2/6/7. As proteínas e a natureza dos nucleotídeos estão mostradas. A suposta orientação dos C-terminais estão representadas pelas setas. As letras G e NC identificam as interfaces de interação.

Fonte: SIRAJUDDIN[79]

No entanto, dados obtidos por microscopia eletrônica e estudos bioquímicos em trabalhos recentes refutam a posição das subunidades dentro desse oligômero.[80, 81] Estes trabalhos apontam que SEPT2, na verdade, ocupa as posições terminais enquanto SEPT7 forma homodímeros no *core* do complexo hexamérico. Assim, a posição das subunidades dentro do hexâmero estaria invertida em relação à estrutura reportada inicialmente por Sirajjudin e colaboradores, sendo a interface NC a responsável pela polimerização.

Uma fração deste mesmo complexo foi obtida por imunoprecipitação utilizando células HeLa, porém apresentou-se na forma de um octâmero, contendo a SEPT9.[82-83] Por meio de estudos bioquímicos e de mutagênese em octâmeros isolados de células de mamífero contendo SEPT9, um trabalho recente de Soroor e colaboradores apontou que este octâmero é formado apresentando duas cópias de SEPT9 formando homodímeros no centro deste oligômero.[81] A possibilidade de um octâmero incluindo SEPT9 foi validada pela técnica de duplo híbrido em levedura, em que SEPT7, usada como isca, apresentou preferência de mais de 70% pela septina 9.[84]

Com base nesse complexo e na divisão das septinas nos quatro grupos já citados, Kinoshita propôs que cada septina particular pode ser substituída por outra do mesmo grupo e ainda formar um heterocomplexo viável.[85] No entanto, essa hipótese não é totalmente estabelecida uma vez que a expressão dessas proteínas nos diferentes tecidos é menor do que o número de combinações teóricas possíveis. Além disso, há relatos de arranjos não canônicos na literatura.[22, 36, 47] É sabido também que as septinas podem associar-se de forma não

específica, ou seja, compreendendo interações não nativas (promíscuas), as quais ocorrem na ausência do parceiro fisiológico.[86]

Ainda hoje, pouco se sabe como essas proteínas se comportam e interagem entre si para a montagem do heterocomplexo *in vivo*. Assim, toda a gama de complexos possíveis, como septinas de diferentes grupos podem substituir umas as outras durante a montagem e ainda, como se dá a contribuição específica das isoformas produzidas por *splicing* alternativo devem ser investigados.

1.6 O papel da ligação e hidrólise do GTP

Em geral, septinas de diferentes organismos são capazes de ligar e ainda, embora a uma taxa bastante lenta, hidrolisar o GTP.[87] No entanto, algumas septinas são cataliticamente inativas devido a ausência de um resíduo de treonina no *switch* I. Tal resíduo está diretamente envolvido na coordenação do íon de magnésio, o qual desempenha um papel crucial na hidrólise.[79] A importância deste resíduo de treonina na catálise foi inicialmente estabelecida por estudos bioquímicos, tendo sido destacada pela estrutura da septina cataliticamente inativa de *S.mansoni*, *Sm*SEPT10 ligada ao GTP, em que pôde-se observar mais detalhadamente o papel desse resíduo na estabilização do íon magnésio.[62, 88] Nessa estrutura, o *switch* I permanece desordenado e, a ausência do resíduo de treonina resulta em uma coordenação diferente do Mg^{2+}, impedindo a hidrólise (Figura 8).

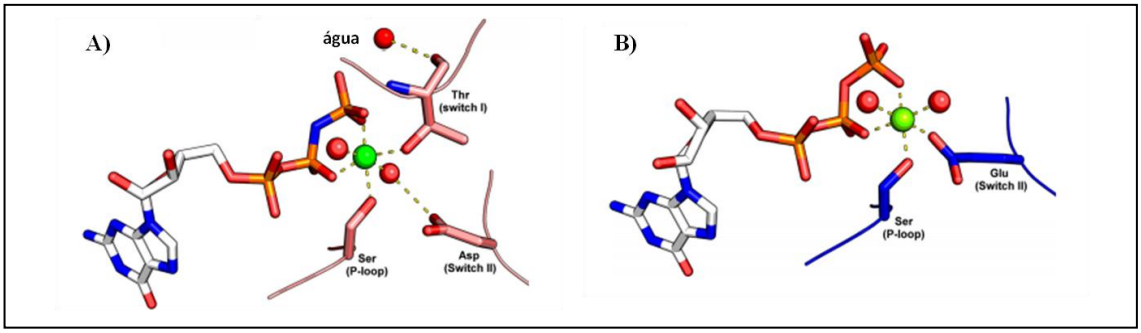


Figura 8 - Comparação dos aminoácidos envolvidos na coordenação do íon magnésio com base na estrutura cristalográfica de *Sm*SEPT10 e SEPT2. A) SEPT2. B) *Sm*SEPT10. Em verde está representado o íon magnésio; bolas em vermelho representam as moléculas de água.

Fonte: VALADARES[47]

Anterior a esses dados estruturais, um trabalho apontou a partir de estudos bioquímicos e alinhamento de sequências de septinas de diferentes organismos, que essa treonina, Thr-78, está ausente em septinas membros do grupo II (Figura 9). A partir de então, baseando-se nessas observações, para septinas que ainda não foram caracterizadas, a presença ou ausência de um resíduo de treonina correspondente no *switch* I passou a ser um indicativo da capacidade de hidrólise do nucleotídeo.

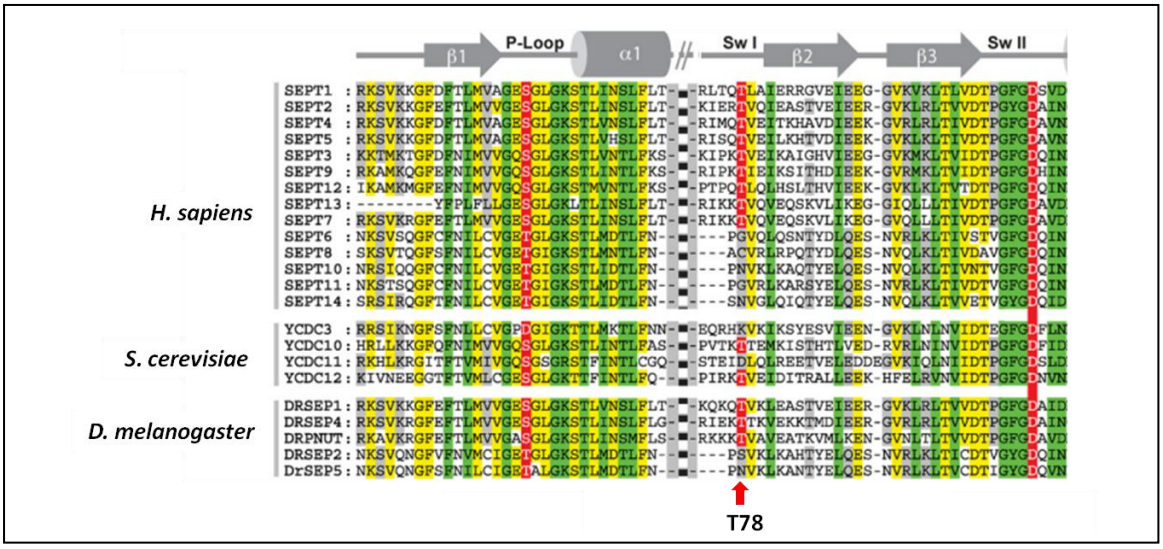


Figura 9 - Alinhamento das sequências de septinas de vários organismos. Indicada pela seta vermelha está a treonina (T78), conservada na região do *switch* I (SwI) e ausente no grupo II. Elementos de estrutura secundária e motivos característicos das septinas estão mostrados esquematicamente no topo, em cinza.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN[62]

A ausência da atividade catalítica em algumas septinas sugere que a hidrólise não é essencial para a função dessas proteínas. Ainda, o fato dos domínios G das subunidades que compõem os complexos humano e de levedura estarem associados com nucleotídeos, GDP ou GTP,[79, 89] sugere que os nucleotídeos em seus diferentes estados são requeridos para a formação e manutenção da estabilidade das interfaces que compõem os heterocomplexos e por consequência, dos filamentos.[90]

Sabe-se que a ligação e hidrólise do GTP ocorre na interface G, no entanto mudanças conformacionais na interface NC são observadas dependendo da natureza do nucleotídeo ligado. Isto sugere que deve haver um mecanismo de comunicação entre as interfaces ao

longo do filamento de forma que a troca de GTP por GDP, ocasionada pela hidrólise, seja transmitida de um lado do monômero para o outro.[47] Um possível mecanismo, envolvendo o deslizamento de uma fita β, já foi descrito em *S. mansoni*.[88] Neste evento, a ligação ao GTP leva a um impedimento estérico que culmina com o deslizamento desse componente estrutural levando a exposição da região polibásica, a qual está relacionada com interação com os fosfolipídeos de membrana. No heterofilamento de septinas humanas, a estrutura de SEPT6 é a única ligada a GTP e não a GDP e, apesar da baixa resolução, a posição das fitas β foi interpretada da mesma forma que o observado para *Sm*SEPT10.[79]

Embora ainda não totalmente esclarecido, estudos envolvendo septinas de levedura e humanos indicam a importância da ligação e hidrólise do GTP para a formação do filamento.[90-92] Assim é possível que a hidrólise esteja relacionada tanto com o controle da montagem e desmontagem do filamento, quanto com a interação desses filamentos com a membrana.

A dependência do nucleotídeo para a dimerização via interação pela interface G também tem sido investigada. Foi observado que quando tratados com a enzima fosfatase alcalina, os dímeros SEPT6/2 que interagem via G dissociam-se.[90] Com base nos dados estruturais do complexo SEPT2/6/7, sabe-se que o dímero SEPT2/6 interage via interface G, compondo uma interface mista, ou seja, apresentando GTP e GDP complexados.[79] Em levedura, as septinas Cdc3 e Cdc10 também interagem via interface G mista, uma vez que Cdc3 também é cataliticamente inativa. Estudos bioquímicos envolvendo mutações pontuais em Cdc3 mostraram que os contatos induzidos pelo GTP nessa interface são essenciais para a estabilidade dessa interação levando a formação de um núcleo rígido e estável.[62] Assim, pode-se dizer que a incapacidade de hidrolisar o nucleotídeo deve exercer um papel regulatório. Uma vez que esse nucleotídeo fica retido na interface G, autores sugerem que é possível que ele desempenhe algum papel na seleção de parceiros de interação.[47]

Embora muito tenha sido discutido sobre o papel da ligação e hidrólise do nucleotídeo, a falta de dados estruturais em alta resolução das interfaces de interação, principalmente as heterotípicas, ainda é um gargalo no completo entendimento dessa questão.

1.7 Polimerização dos complexos – Formação de filamentos

Uma das características de septinas que está intimamente relacionada a sua função citoesquelética é a habilidade de interagirem entre si como hetero-oligômeros para a formação de filamentos e estruturas mais complexas.

Os filamentos são formados pela união longitudinal de cada heterocomplexo por meio da polimerização. Adicionalmente, a partir da interação lateral dos oligômeros por meio dos *coiled-coils* também podem ser formados feixes, os quais podem se agrupar levando a formação de estruturas de mais alta ordem como anéis e redes (Figura 10).[10, 36, 72, 93]

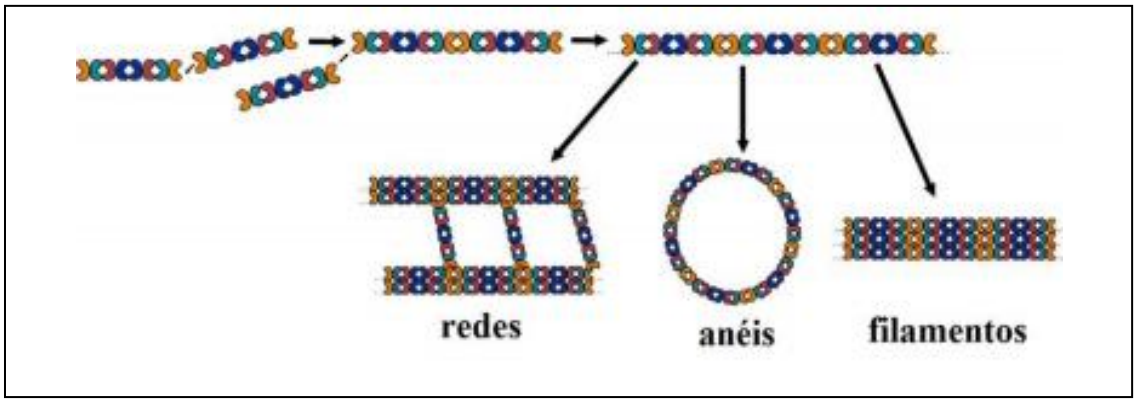


Figura 10 - Representação das diferentes formas de polimerização dos oligômeros de septinas em estruturas de mais alta ordem. As diferentes cores representam subunidades dos quatro grupos de septinas envolvidos.

Fonte: FUNG[94]

Pouco se sabe a respeito da formação exata das interfaces para a montagem correta de filamentos. Apesar disso, estudos de caracterização biofísica do *coiled-coil* de septinas humanas, sugerem que essa região pode ser responsável por reconhecer e selecionar o parceiro correto, levando à montagem ordenada do filamento.[66, 95]

O processo de polimerização para a formação de filamentos tem sido monitorado através de microscopia eletrônica de transmissão pela técnica de contrastação negativa (*negative stain*). O que tem sido observado é que a concentração de sal influencia na polimerização dos oligômeros de modo que a polimerização é favorecida conforme vai sendo diminuída a força iônica do meio.[36, 64, 72, 75, 88]

As figuras abaixo apresentam o processo de polimerização *in vitro*, evidenciando a formação de filamentos e estruturas com alto grau de organização de complexos oriundos de diferentes espécies (Figuras 11-13).

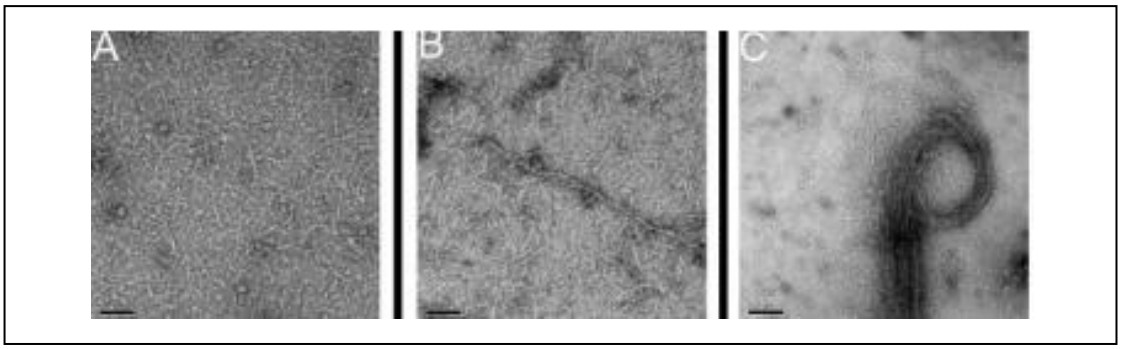


Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de *S. mansoni*, *Sm*SEPT5/10/7 durante processo de diálise. A) após 1 minuto de diálise; B) após 20 minutos e; C) após 3 horas. Em A e B, barra corresponde a 100 nm e; em C, barra corresponde a 200 nm.

Fonte: ZERAIK[88]

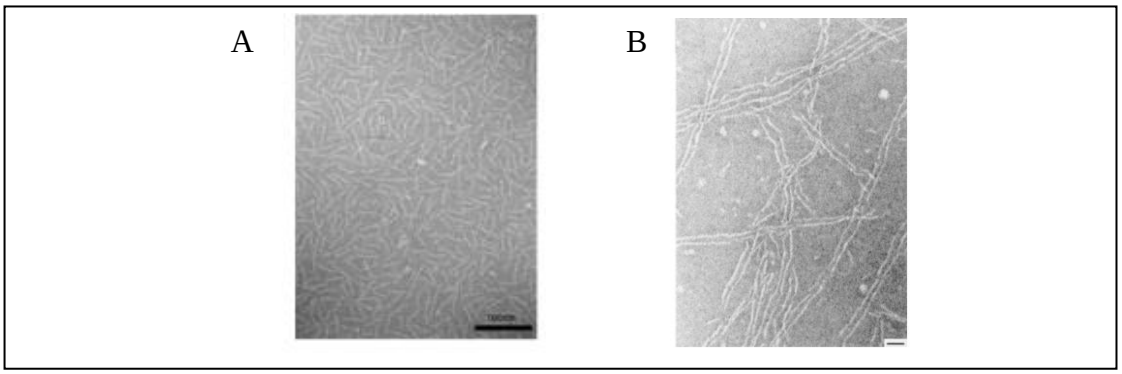


Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de *S. cerevisiae*, CDC3/10/11/12, durante processo de diálise. A) Complexo em alta concentração de sal evidenciando forma de bastonete dos oligômeros; B) Formação de filamentos sob baixa concentração de sal após diálise. A barra corresponde a 100 nm.

Fonte: FRAZIER[75]

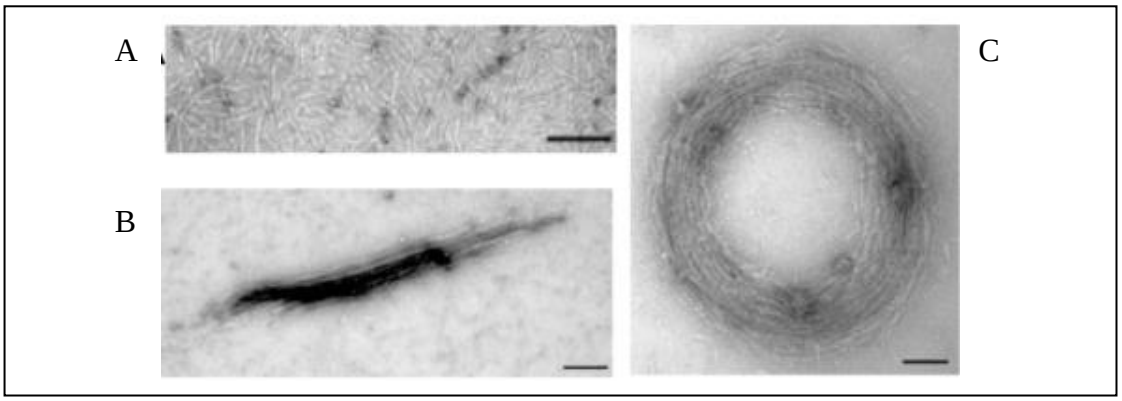


Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do complexo de septinas humanas SEPT2/6/7 durante processo de diálise. A) Complexo em alta concentração de sal evidenciando forma de bastonete antes da formação de filamentos; B) Formação de feixes e filamentos em baixa concentração de sal após diálise; C) Formação de anéis.

Fonte: KINOSHITA[72]; SIRAJUDDIN[79]

Contrastando com os complexos formados por mais de uma septina, estudos apontam evidências para a formação de homofilamentos (Figura 14). O primeiro registro foi descrito em um trabalho em que *in vitro*, na presença de GTP, se observou a polimerização de Sept2 recombinante de *Xenopus laevis*.[96] Já para SEPT2 humana foram observados homofilamentos *in vitro* tanto na presença de GTP quanto de GDP.[97] Homofilamentos caracterizados como amilóides foram observados *in vitro* tanto para SEPT2 quanto para SEPT4 de humanos.[70, 98] Segundo os autores, tais formações podem estar relacionadas com um processo patológico possivelmente associado a doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Por fim, o mais recente registro de formação de homofilamentos por septinas foi publicado em 2017, mostrando que a única septina de *C. reinhardtii*, *Cr*SEPT, foi capaz de polimerizar-se na presença de GTP. Interessantemente, observou-se que essa polimerização não requer os domínios N- e C-terminais, uma vez que os filamentos foram observados com a construção que possui apenas o domínio G.[50]

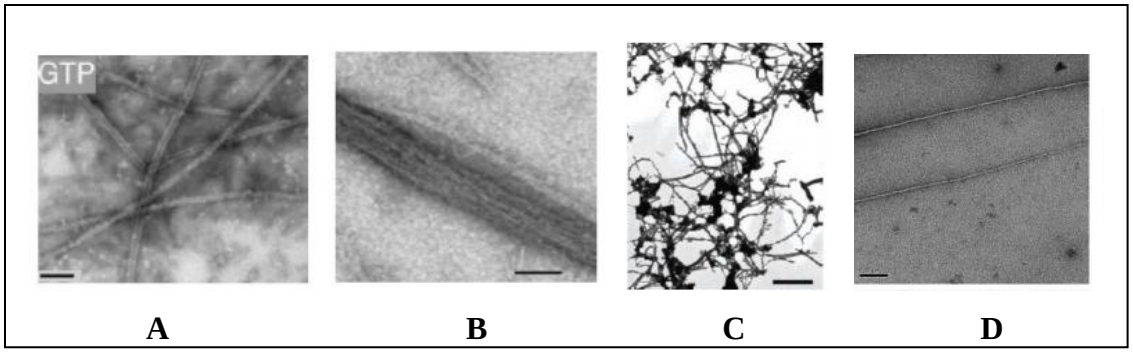


Figura 14 - Formação de homofilamentos de septinas. A) Homofilamentos formados por Sept2 de *Xenopus*. Barra de escala representa 100 nm. B) homofilamentos formados por SEPT2 humana. Barra de escala = 100 nm. C) homofilamentos formados por SEPT4 humana. Barra de escala = 1000 nm. D) Homofilamentos formados por *Cr*SEPT de *C. reinhardtii*. Barra de escala = 200 nm.

Fonte: MENDOZA[96]; HUANG[97]; GARCIA[70] ; PINTO[50]

Enquanto os heterofilamentos são associados a várias funções, para os homofilamentos ainda não está claro se essas estruturas são fisiológicas ou patológicas, nem mesmo se este é um fenômeno geral ou quais septinas são capazes de formar tais estruturas e como sua organização é regulada.

1.8 As septinas de *Ciona intestinalis*

Ciona intestinalis, conhecido popularmente como ascídia (Figura 15A), é um representante deuterostômio urocordado marinho. Este invertebrado urocordado tem sido muito utilizado como organismo modelo em estudos evolutivos justamente por estar classificado num grupo basal dentro dos Cordados (Figura 15B).[99-101]

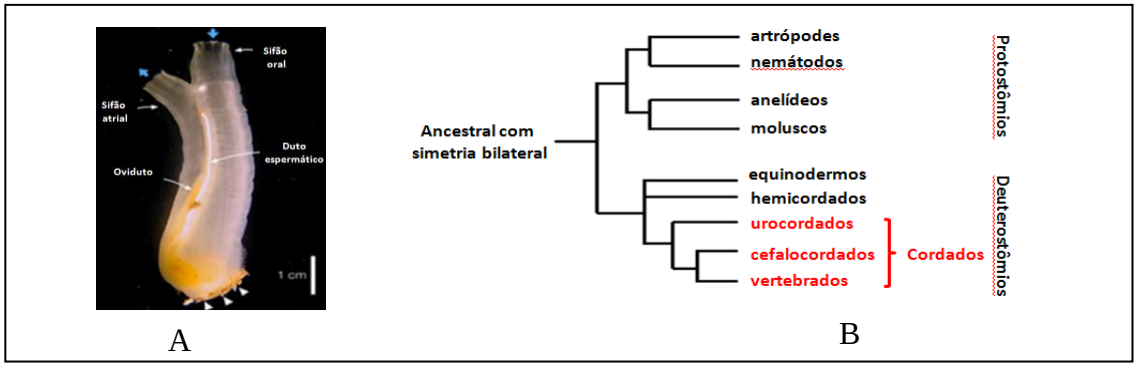


Figura 15 - Árvore filogenética dos animais com simetria bilateral: A) *C. intestinalis* quando adulto evidenciando seus dois sifões (oral e atrial); como são animais sésseis filtradores, o fluxo de água está indicado pelas setas azuis; *C. intestinalis* é hermafrodita e o oviduto e ducto espermático estão indicados. B) *C. intestinalis* é membro do clado urocordado, o ramo mais primitivo dos Cordados.

Fonte: Adaptada de DEHAL[101]

Em 2007, análises filogenéticas usando sequências de septinas pertencentes a diferentes metazoários incluindo representantes de protostômios (*C. elegans*, *D. melanogaster*) e deuterostômios (*Strongylocentrotus purpuratus*, *C. intestinalis* e *Homo sapiens*) demonstraram que estes organismos possuem ortólogos de septinas.[44] Em *C. intestinalis*, foram identificados quatro genes codificando septinas ortólogas que, considerando a classificação das septinas humanas, apresentam cada uma, identidade com um dos quatro grupos.[44]A identificação de apenas um representante de cada grupo de septinas nesse organismo sugere que tais grupos tenham emergido antes da separação entre vertebrados.[44, 102]

Para as septinas humanas sabe-se que, em termos funcionais, estão relacionadas com diversas funções e que, para desempenhá-las, organizam-se em filamentos por meio da polimerização, como já descrito anteriormente. Esses heterofilamentos são montados,

preferencialmente, a partir de septinas de grupos diferentes, seguindo determinada ordem.[79] Devido a importância dessas proteínas em processos celulares, diversos estudos tem sido realizados para compreender desde o papel do GTP e sua hidrólise na montagem do filamento bem como a realização de estudos estruturais tanto das septinas individuais, quanto do complexo formado pelas septinas SEPT2/6/7 afim de entender a relação de sua estrutura/função.[62, 79, 87, 90, 96, 103] No entanto, a multiplicação de genes para septinas em mamíferos levou a um aumento no número de processos celulares que envolvem a participação dessas proteínas e, ao mesmo tempo aumentaram a possibilidade de substituição entre diferentes septinas para o desempenho de funções celulares, o que torna o estudo funcional de septinas bastante desafiador. Assim, uma vez que *C. intestinalis* apresenta somente uma septina representante de cada grupo, é possível que tais proteínas possam se organizar de forma similar à observada em humanos e outros vertebrados, mas num único heterofilamento possível, compreendendo assim um modelo menos complexo para o estudo desses oligômeros.[31, 49, 60, 64, 75-77, 79]

2 OBJETIVOS

A produção heteróloga e os estudos estruturais das septinas de *Ciona intestinalis* consistiram os objetivos gerais deste trabalho. O fato de *C. intestinalis* ser um grupo basal dentro dos Cordados e apresentar somente uma septina de cada grupo estimularam tais estudos, particularmente com relação ao possível heterocomplexo. Nesse contexto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Desenho e síntese das sequências de DNA codificantes (CDS) das quatro septinas de *C. intestinalis*, visando a expressão individual e a co-expressão dessas proteínas, bem como de construções truncadas representando seus domínios;

- Avaliação do estado oligomérico das septinas individuais de *C. intestinalis* e dos complexos;

- Estudos bioquímicos das proteínas e complexos, visando a avaliação da atividade GTPásica e teor de nucleotídeo das proteínas recombinantes;

- Avaliação da capacidade de formação de filamentos pelo heterocomplexo *in vitro* através de microscopia eletrônica de transmissão;

- Avaliação das interações entre as septinas utilizando termoforese em micro escala (MST).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sequências codificantes (CDS) das septinas de *C. intestinalis*

As CDSs das septinas de *C. intestinalis* foram obtidas como genes sintéticos junto a empresa *GenScript USA Inc*., tendo como base as sequências depositadas no GenBank sob os números de acesso XM_002125416.2, XM_002123318.1, XM_002131313.2 e XM_002129160.2 que correspondem respectivamente às proteínas inteiras *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9. Aos genes sintéticos foram adicionados sítios de restrição específicos para possibilitar a clonagem em vetores de expressão apropriados. As CDSs foram obtidas liofilizadas, sendo fornecidas já inseridas no plasmídeo de propagação pBSK.

3.2 Subclonagem nos vetores de expressão bacteriano

Os vetores liofilizados contendo as CDSs foram solubilizados em água estéril e então uma alíquota foi usada para transformar células quimiocompetentes da linhagem DH5α de *Escherichia coli* para propagação. Em seguida, segundo as técnicas padrão de clonagem molecular,[104] os plasmídeos já propagados foram extraídos e as CDSs correspondentes às septinas inteiras de *C. intestinalis* foram isoladas por meio de endonucleases específicas e inseridas nos vetores de expressão apropriados. Visando verificar a fidelidade das sequências, os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático do DNA no equipamento ABI 3130xl (*Applied Biosystems*). Finalmente, uma vez subclonadas em vetores de expressão, tais construções foram utilizadas para transformar células de expressão da linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli*.

3.2.1 Descrição das construções e estratégias de co-purificação

Como dito anteriormente, os cDNAs codificando as proteínas inteiras *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9 foram obtidos comercialmente e subclonados em vetores de expressão. Porém, visando aumentar as chances de se obter um produto final o mais estável e

solúvel possível, fez-se necessário ainda a amplificação de regiões correspondentes a domínios específicos e combinações dos mesmos. Para tanto, foram desenhados um par de *primers* específicos para cada sequência a ser amplificada, utilizando como molde um plasmídeo contendo o DNA obtido comercialmente.

Uma vez que neste trabalho foram utilizadas diferentes construções e diferentes estratégias para a co-expressão e co-purificação das proteínas, as seções abaixo detalham cada construção e cada estratégia afim de facilitar a compreensão. Detalhes dos sítios de restrição, domínios compreendidos e coordenadas de todas as construções estão mostrados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Detalhamento de todas as construções utilizadas nesse trabalho.

	Construção número/descrição	**Plasmídeo de expressão**	**Sítios de restrição**	**Coordenadas***	**Massa molecular predita (KDa)**
1	***Ci*SEPT2-MBP**	pMBPtDuet	*Bam*HI/*Not*I	1 – 413	92,3
2	***Ci*SEPT2-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Not*I	1 – 413	59,1
3	***Ci*SEPT2-His**	pET28a	*Bam*HI/*Not*I	1 – 413	47,1
4	***Ci*SEPT2G-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Xho*I	82 – 356	51,5
5	***Ci*SEPT6-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Xho*I	1 – 431	61,6
6	***Ci*SEPT6**	pETDuet	*Bam*HI/*Xho*I	1 – 431	49,6
7	***Ci*SEPT6G-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Xho*I	47 – 314	50,8
8	***Ci*SEPT7-His**	pETDuet	*Bam*HI/*Hind*III	1 – 423	48,9

(Continua)

(Continuação)

9	***Ci*SEPT7-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Hind*III	1 – 423	60,9
10	***Ci*SEPT7G-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Xho*I	36 – 306	51
11	***Ci*SEPT9-His**	pET28a(+)	*Nde*I/*Xho*I	1 – 358	40,4
12	***Ci*SEPT9G-SUMO-His**	pETSUMO	*Bam*HI/*Xho*I	26 – 296	51,3
13	***Ci*SEPT7-His**	pETDuet	*Bam*HI/*Hind*III	1 – 423	48,9
	+				
	***Ci*SEPT9**		*Nde*I/*Xho*I	1 – 358	40,4
14	***Ci*SEPT2.1-His**	pRSFDuet	*Nde*I/*Xho*I	68 – 411	39,1
	+				
	***Ci*SEPT9.1**		*Nco*I/*Not*I	22 – 356	40,4
15	***Ci*SEPT2.2-His**	pRSFDuet	*Nde*I/*Xho*I	68 – 356	33,1
	+				
	***Ci*SEPT9.2**		*Nco*I/*Not*I	1 – 308	35,4
16	***Ci*SEPT7.1-His**	pETDuet	*Bam*HI/*Hind*III	22 – 421	46,5
	+				
	***Ci*SEPT6.1**		*Bam*HI/*Xho*I	24 – 429	47
17	***Ci*SEPT7.2-His**	pETDuet	*Bam*HI/*Hind*III	22 – 307	32,8
	+				
	***Ci*SEPT6.2**		*Bam*HI/*Xho*I	24 – 327	33,6

Fonte: Elaborada pela autora.
*Obs: as coordenadas referrem-se aos aminoácidos iniciais e finais da construção, baseando-se na posição ocupada na sequência primária completa de cada septina.

3.2.1.1 *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9

Essas construções correspondem às proteínas inteiras, ou seja, apresentando os três domínios estruturais, NGC, as quais foram utilizadas nas análises estruturais e bioquímicas.

As CDSs de *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 foram inseridas no vetor de expressão pETSUMO (pET28a modificado), no qual a proteína é expressa fusionada com a proteína modificada 6xHis-*SUMO (Small Ubiquitin Modifier*) na sua porção N-terminal. A CDS de *Ci*SEPT2 foi inserida no vetor pETSUMO, no vetor pET28a(+) (*Novagen*) e no vetor pMBPtDuet (Tabela 2). Neste último, o produto proteico expresso é obtido fusionado à proteína ligante de maltose (MBP). Já a sequência codificante de *Ci*SEPT9 foi inserida no vetor de expressão pET28a apenas.

.

3.2.1.2 Construções visando cristalização do heterocomplexo

A cristalização do heterocomplexo humano SEPT2/6/7 foi obtida a partir das proteínas inteiras. No entanto, somente o domínio G e porções dos domínios N e C terminais apresentaram densidade eletrônica. A ausência de densidade eletrônica nos domínios N e C é um indicativo de que tais domínios apresentam-se flexíveis, podendo assim contribuir para a instabilidade estrutural.

Assim, com base na estrutura cristalográfica do complexo das septinas humanas SEPT2/6/7 depositada no PDB (*Protein Data Bank*) sob o código 2QAG, foram realizadas análises *in silico* afim de se obter versões mais estáveis e consequentemente mais favoráveis à cristalização. Esse trabalho foi feito em colaboração com o prof. Marcos V. A. S. Navarro, do IFSC. Nessas versões, os resíduos correspondentes às regiões flexíveis e/ou desordenadas (que não apresentaram densidade eletrônica na estrutura tridimensional humana) foram extraídos. Assim, para cada septina de *C. intetinalis* foram desenhadas duas construções truncadas, as quais foram nomeadas “.1” e “.2”. Em todas elas, as regiões com predição de estrutura secundária foram preservadas de cortes internos.

Estas construções foram idealizadas visando a co-expressão em vetores bicistrônicos de modo a produzir o heterocomplexo formado pelas 4 septinas de *C. intestinalis*, como mostra a Tabela 2 (construções 14 a 17).

3.2.1.3 Construções contendo apenas o domínio G

A dificuldade em trabalhar com construções inteiras, ou seja, com os três domínios, já foi reportada.[62 e 102] Das dez estruturas depositadas no PDB, 9 foram obtidas a partir de construções contendo apenas o domínio G. Visando estudos bioquímicos comparativos com resultados de septinas humanas de outros organismos e ainda, buscando produtos mais estáveis e solúveis, foram desenhadas versões truncadas compreendendo apenas o domínio G. Para isso, as CDSs dessas construções foram individualmente subclonados no vetor de expressão pETSUMO e então utilizados para transformar células de expressão da linhagem *E. coli* Rosetta (DE3). Nessas construções a determinação das regiões correspondentes ao domínio G foram resultado de análises *in silico* tendo como base as sequências correspondentes de septinas humanas. Em todas as construções foram conservadas regiões com predição de estruturas secundárias (construções 4, 7, 10 e 12 da Tabela 2).

3.2.1.4 Construções visando co-expressão e/ou co-purificação para obtenção dos complexos

Com o intuito de verificar a formação de heterocomplexos por meio da interação entre as septinas de *C. intestinalis* foram utilizadas diferentes construções. A incompatibilidade de sítios de restrição comprometeu o desenho de construções para co-expressão e por conta disso foi necessário e possível, em alguns casos, mesclar co-expressão e co-purificação para a obtenção desses heterocomplexos. Por co-expressão entende-se que houve a expressão de pelo menos duas CDSs, utilizando um mesmo vetor (bicistrônico) ou vetores independentes transformados na mesma célula de expressão. Por outro lado, a co-purificação se refere tanto a purificação de produtos co-expressos, quanto daqueles produtos provenientes de expressões realizadas em células separadas. Nesse último caso de co-purificação, as células contendo as

proteínas expressas de forma independente foram misturadas e então, seguiram-se os protocolos de lise e purificação predeterminados.

3.2.1.5 Co-expressão de *Ci*SEPT2/6

Para essa construção, a CDS de *Ci*SEPT6 foi subclonada no sítio múltiplo de clonagem 2 (MSC2) do vetor bicistrônico pETDuet (*Novagen*) sem adição de nenhum *tag* (construção 6, Tabela 2). Em seguida, os clones positivos foram utilizados para co-transformar células de *E. coli* Rosetta (DE3) juntamente com plasmídeo pET28-*Ci*SEPT2-His (construção 3, Tabela 2). Nessa construção, apenas *Ci*SEPT2 se encontra fusionada à cauda de histidina e, desse modo, a recuperação das duas proteínas ao final da cromatografia de afinidade é indicativo de interação entre as mesmas.

3.2.1.6 Co-expressão de *Ci*SEPT7/9

As CDSs correspondentes às septinas *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9 foram inseridas no vetor de expressão bicistrônico pETDuet (*Novagen*) de modo que apenas a *Ci*SEPT7 estivesse fusionada ao His-*tag* (construção 13, Tabela 2).

3.2.1.7 Produção do complexo *Ci*SEPT2/6/7

As construções *Ci*SEPT2/6 (descrita no item 3.2.1.5) e pETSUMO-*Ci*SEPT7 (descrita no item 3.2.1.1) foram utilizadas independentemente para transformar células de *E. coli*. Ao final dos protocolos de expressão, as células foram coletadas e misturadas na proporção 1:1 para a co-purificação.

3.2.1.8 Produção do complexo *Ci*SEPT6/7/9

As proteínas *Ci*SEPT6, 7 e 9 foram co-purificadas a partir da expressão das construções pETDuet-*Ci*SEPT6 (descrita no item 3.2.1.5) e pETDuet-*Ci*SEPT7-His/9 (descrita no item 3.2.1.6). Nessa estratégia, cada construção foi utilizada para transformar células de expressão independentes. A partir destas transformações foram feitas culturas de cada transformante e a expressão foi induzida. Ao final da expressão, as células foram coletadas por centrifugação e misturadas na proporção 1:1, seguindo o protocolo de purificação padrão, que será descrito no item 3.3.

3.2.1.9 Produção do *Ci*SEPT2/6/7/9

Para este complexo, as construções pET28-*Ci*SEPT2 juntamente com pETDuet-*Ci*SEPT6 e pETDuet-*Ci*SEPT7-His/9 foram utilizadas para transformar células de expressão em eventos independentes. Uma vez produzidas as proteínas, as células foram coletadas por centrifugação e misturadas na proporção 1:1, seguindo o protocolo de purificação padrão (item 3.3).

A seguir, a Tabela 3 apresenta todos os detalhes das estratégias de co-expressão e co-purificação para a obtenção dos heterocomplexos.

Tabela 3 - Estratégia para produção dos complexos.

Heterocomplexo	Construções	Co-expressão	Co-purificação
***Ci*SEPT2/6**	*Ci*SEPT2-His (3)*	✓	✓
	+		
	*Ci*SEPT6 (8)*	✓	✓
***Ci*SEPT7/9**	*Ci*SEPT7-His/9 (21)*	✓	✓

(Continua)

(Continuação)

***Ci*SEPT2/6/7**	*Ci*SEPT2-His (3)*	✓	✓
	+		
	*Ci*SEPT6 (8)*	✓	✓
	+	✗	✓
	*Ci*SEPT7-SUMO-His (13)*		
***Ci*SEPT6/7/9**	*Ci*SEPT6 (8)*	✗	✓
	+		
	*Ci*SEPT7-His/9 (21)*	✓	✓
***Ci*SEPT2/6/7/9**	*Ci*SEPT2-His (3)*	✓	✓
	+		
	*Ci*SEPT6 (8)*	✓	✓
	+		
	*Ci*SEPT7-His/9 (21)*	✓	✓

Fonte: Elaborada pela autora.
*Obs: Os números entre parênteses correspondem à identificação das construções descritas na Tabela 2.

3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Para a expressão e purificação das proteínas recombinantes seguiu-se um mesmo protocolo. Desse modo, as células de expressão foram induzidas com 0,4mM de IPTG e, após 18hs de incubação a 18°C, as culturas foram centrifugadas por 40 minutos a 11000 x g, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado de células (*pellet*) foram adicionados 20 mL do tampão A: 25 mM HEPES contendo 500 mM de NaCl (pH 8 para *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 e pH 8,2 para *Ci*SEPT9), 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de β-mercaptoetanol e 10% de glicerol. A lise celular foi realizada por sonicação por 4 pulsos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o produto da sonicação foi centrifugado a 11000 x g por 60 minutos, a 4°C, a fim de separar a fração solúvel (extrato

bruto, contendo as proteínas solúveis) da fração insolúvel (composta por restos celulares e proteínas insolúveis).

O extrato bruto foi aplicado numa coluna de afinidade (HisTrap HP de 5 mL, GE *Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com 5 volumes do tampão A. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 5mL/min, monitorado pela absorbância em 280nm. A lavagem foi realizada utilizando 5 volumes do mesmo tampão contendo 35 mM de imidazol. A eluição das proteínas que se ligaram à coluna foi feita utilizando um gradiente de concentração crescente com o tampão A contendo 500 mM de imidazol.

As proteínas expressas fusionadas à proteína SUMO, após serem eluídas, foram incubadas com a enzima sumo protease (0,2 mg de protease para 10 mg de proteína de fusão) e incubadas por 2 horas a 4 ºC.

Seguindo a purificação, amostras das proteínas recém eluídas da afinidade foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular na coluna *Superdex* 200 10/300 GL (GE *Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com tampão 25 mM HEPES pH 8, contendo 300 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$, 5% de glicerol. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 0,5mL/min., monitorado pela absorbância em 280nm. Frações de 1 mL foram coletadas e as alíquotas analisadas em SDS-PAGE 12%. As amostras contendo a proteína purificada foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até sua utilização.

3.4 Estimativa da massa molecular das septinas de *Ciona intestinalis* (SEC-MALS)

Amostras das subunidades isoladas *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 e dos heterocomplexos *Ci*SEPT2/6, *Ci*SEPT7/9, *Ci*SEPT2/6/7, *Ci*SEPT6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7/9, obtidas após a cromatografia de exclusão molecular, foram submetidas à análise de estimativa de massa molecular. O estado oligomérico pode ser estimado por meio da técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS). Uma vez que a proteína *Ci*SEPT9 se mostrou bastante instável quando isolada, ou seja, sem o seu parceiro de interação, não foi submetida a este tipo de análise.

No experimento, alíquotas de 20µL de cada amostra recém-eluída da Superdex 200 10/300 foram utilizadas. Essas alíquotas foram submetidas a um novo passo de cromatografia

de exclusão molecular, dessa vez utilizando a coluna, Superdex 200 5/150, e analisadas no cromatógrafo *Waters* 600 *Controler*. A cromatografia foi realizada sob fluxo constante de 0,3mL/min em tampão padrão contendo 50mM HEPES, pH 8 e 300mM NaCl. Acoplado ao cromatógrafo, o sistema *mini DAWN TREOS* (*Wyatt Technology*) realizou a leitura do espalhamento de luz a três ângulos diferentes, determinando a distribuição de massa sem a necessidade de calibração da coluna por padrões referenciais. A saída desse equipamento é conectada ao sistema *OptiLab T-rEX* (*Wyatt Technology*), que determina o índice de refração diferencial (dRI). Desse modo, a partir do processamento dos dados utilizando o *software* ASTRA7 (*Wyatt Technology*) que, realiza a leitura de todos os detectores e obtém a determinação direta da massa das amostras analisadas, foi possível determinar o estado oligomérico das proteínas em questão.

3.5 Análise da estrutura secundária por Dicroísmo Circular

No intuito de investigar a estrutura secundária tanto das proteínas individualmente como destas com seus parceiros de interação, análises de CD convencional foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco modelo J – 815 CD Spectrometer (Tóquio, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura (Peltier), em uma cubeta de quartzo retangular de 0,1 cm de caminho óptico. Para as medidas foram utilizadas alíquotas de 200 µL contendo 3µM de cada construção em tampão 20mM de fosfato de sódio pH 8, contendo 300mM de NaCl, 5mM de $MgCl_2$ e 5% de glicerol.

Os espectros foram coletados na faixa de 190 a 260nm, em intervalos de 1 nm, num total de 6 acumulações. Espectros de CD do tampão foram subtraídos dos espectros originais das proteínas. A média das acumulações, subtração da linha de base e alisamento com o filtro de Savitzky-Golay foram realizados com o *sofwtare CDTool.*[105]

3.6 Análise do conteúdo de nucleotídeo e atividade GTPásica

Para verificar a presença e a natureza de nucleotídeos ligados ao domínio GTPásico seguiu-se método descrito por Seckler.[106] Para tanto, uma alíquota de 500 µL contendo 10 µM de proteína recém eluída da coluna de afinidade foi incubada com 250µL de $HClO_4$ 1,5M gelado por 10 minutos no gelo para desnaturação da proteína e consequente liberação de nucleotídeos. Passado o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 13000 x g por 10

minutos a 4°C, para separar as proteínas desnaturadas da fração solúvel contendo os possíveis nucleotídeos. Em seguida foram coletados 600 µL da fração solúvel e transferidos para outro microtubo onde foram adicionados 100 µL de K_2HPO_4 1M, 100 µL de KOH 3M e 80 µL de ácido acético 5M para precipitação do sal $KClO_4$ e neutralização do pH. Uma vez tamponada, a amostra foi mantida a -20°C por 1 hora e então descongelada e centrifugada por 10 minutos à velocidade de 13000 x g a 4°C. De cada amostra, uma alíquota de 200µL foi retirada e aplicada à coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 7,5 x 7,5mm (*Waters*) acoplada a um cromatógrafo *Alliance* 2695, sob o monitoramento do comprimento de onda de 253 nm. Foram utilizados como padrão 10 µM de GTP e GDP diluídos no mesmo tampão da proteína e submetidos ao mesmo tratamento de desnaturação com ácido perclórico. Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão A (Tris-HCl 25mM, pH 8) e tampão B (Tris-HCl 25mM, pH 8, acrescido de 1M de NaCl).

Para o teste de atividade GTPásica, uma amostra de proteína foi incubada, a 20 ºC, com GTP em excesso seguindo a razão molar de 3:1 (GTP : proteína). Alíquotas de 500µL foram retiradas nos tempos 0, 40, 80, 120 minutos após o início da incubação e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para parar a possível reação de hidrólise do GTP. De cada amostra, uma alíquota de 100µL foi retirada e aplicada à coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 7,5 x 7,5mm (*Waters*) acoplada a um cromatógrafo *Alliance* 2695, sob o monitoramento do comprimento de onda de 253nm. Foram utilizados como padrão 20µM de GTP e GDP diluídos no mesmo tampão da proteína e submetidos ao mesmo tratamento de desnaturação com ácido perclórico. Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão A (Tris-HCl 25mM, pH 8) e tampão B (Tris-HCl 25mM, pH 8, acrescido de 1M de NaCl). As condições do gradiente de NaCl estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - 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**.**

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A dificuldade na cristalização de heterocomplexos de septinas, evidenciado pelo fato de existir apenas um complexo com resolução a 4 Å relatado na literatura até o momento, torna o uso de microscopia eletrônica uma abordagem importante para os estudos estruturais. Assim, juntamente com o uso de espalhamento estático de luz a múltiplos ângulos, a microscopia foi usada neste trabalho como um método para avaliação dos heterocomplexos para verificar o tamanho, forma e homogeneidade das partículas.

Assim, foram realizados ensaios tanto para analisar o estado oligomérico dos complexos *Ci*SEPT2/6, *Ci*SEPT7/9, *Ci*SEPT6/7/9, *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9, quanto para analisar a polimerização dos complexos *Ci*SEPT2/6/7, *Ci*SEPT6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7/9 frente a diminuição de conteúdo de sal no tampão.

O preparo das amostras para a análise do estado oligomérico se deu incubando 3µL de cada amostra a uma concentração de 40µg/mL durante 1 minuto em grades recobertas por filme de carbono. Em seguida, as grades passaram por três etapas de lavagem com água e duas etapas de incubação com 3µL de uma solução de acetato de uranila a 2% durante 30 segundos.

Para os ensaios de polimerização realizados com *Ci*SEPT2/6/7/9, uma alíquota foi submetida a diálise contra tampão HEPES 50mM pH 8, contendo 40 mM NaCl e 5 mM $MgCl_2$. Alíquotas foram retiradas para análise em intervalos até 3 horas de diálise. O preparo da grade foi realizado como descrito no parágrafo anterior e analisadas por contrastação

negativa nos microscópios FEI-Talos F200C TEM operado a 200kV e JEOL-1400 *Plus Tungsten* operado a 120 kV. As imagens foram recuperadas com 5µm de foco e 40000 a 60000x de magnificação.

Os experimentos foram realizados no LNNano – CNPEM em Campinas em colaboração da Ms. Deborah C. Mendonça e do Dr. Rodrigo Villares Portugal.

3.8 Avaliação das interações entre as septinas de *C. intestinalis* utilizando termoforese em micro escala (MST)

Termoforese, também conhecida por efeito Soret ou termodifusão, é o fenômeno físico em que se induz a migração de moléculas por meio de um gradiente de temperatura.[107] Além da rapidez na coleta de dados, aproximadamente 15 minutos, outra grande vantagem dessa técnica frente às técnicas convencionais, tais como ressonância plasmônica de superfície (SPR) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é, a possibilidade de emprego de amostras em solução, não sendo necessário imobilizá-la e ainda, o emprego de volumes na ordem de microlitros.[108] No equipamento utilizado para a realização do experimento de MST, o gradiente é induzido pela incidência de um *laser* infravermelho levando a variação de 1 a 5 °C, permitindo o estudo de interações moleculares em solução pelo monitoramento do movimento de moléculas marcadas com sonda fluorescente.[107-108]

Neste trabalho, medidas de termoforese foram realizadas para avaliar a força de interação em duas interfaces do complexo, sendo uma G e outra NC. A avaliação da interface G se deu por meio da análise da interação entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6, variando a presença de nucleotídeos e ainda, frente a adição de um ou mais parceiros de interação. Do mesmo modo, a avaliação da interface NC foi realizada analisando a interação entre *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT6.

Para o experimento, seguindo as instruções do fabricante, a marcação das moléculas desejadas foi realizada utilizando o fluoróforo NT-647-His (NanoTemper). Este fluoróforo liga-se ao *His-tag* e apresenta comprimentos de onda de excitação e emissão em 650nm e 670nm, respectivamente. Para a realização do experimento, seguiu-se uma diluição seriada da molécula parceira, não marcada e, só então, a adição da proteína previamente acoplada à sonda fluorescente. As amostras foram inseridas em capilar padrão, usando-se 40% de potência do LED e 40% do *MST Power*. O tampão utilizado em todo o processo foi 50mM

HEPES pH 8, acrescido de 300mM de NaCl e 5mM de $MgCl_2$. Os experimentos foram realizados a 24 °C, em triplicata experimental, no equipamento NanoTemper Monolith NT.115 *Blue/Red excitation* (NanoTemper *Technologies*).

Para a marcação com o fluoróforo, era necessário que a construção estivesse fusionada ao *tag* de histidinas. Assim, as construções utilizadas para marcação foram: *Ci*SEPT7-His-pETDuet, *Ci*SEPT7-His/9-pETDuet, *Ci*SEPT2-His-pET28a(+) e o produto da co-expressão das construções C*i*SEPT2-His-pET28a(+) e *Ci*SEPT6-pETDuet.

As construções utilizadas para as proteínas ligantes foram: *Ci*SEPT6-SUMO-His-pETSUMO, *Ci*SEPT7-SUMO-His-pETSUMO, *Ci*SEPT7-His/9-pETDuet, o produto da co-expressão das construções C*i*SEPT2-SUMO-His-pETSUMO e *Ci*SEPT6-pETDuet e, por fim, o produto da co-purificação das construções *Ci*SEPT7-His/9-pETDuet e *Ci*SEPT6-pETDuet.

Nos experimentos de análise da força de interação na presença de nucleotídeo, o mesmo foi adicionado após a titulação da proteína não marcada seguindo a proporção de 1:10 (proteína : nucleotídeo), de modo a garantir a saturação dos sítios de ligação. Após a adição dos nucleotídeos, as reações foram incubadas a 24°C por 15 minutos para que entrassem em equilíbrio, para só então começar a realizar as medidas de afinidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Septinas de *Ciona intestinalis* – análises de bioinformática

Primeiramente, como as CDSs eram provenientes de experimentos *in silico* (dedução genômica), fez-se necessária uma análise de eventuais discrepâncias entre as proteínas preditas e os dados disponíveis dos transcritos de *C. intestinalis*. Para isso, as sequências das septinas de *C. intestinalis* preditas foram utilizadas para interrogar o banco de dados *Expressed Sequence Tags* (EST) deste organismo.

Uma vez que as sequências preditas concordaram com os dados dos transcritos, foi realizado o alinhamento usando as septinas humanas, afim de buscar o representante com maior *hit* para cada uma. Assim, as quatro septinas de *C. intestinalis* foram nomeadas *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9, de acordo com as similaridades observadas nas sequências de aminoácidos com as septinas humanas SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, respectivamente. Utilizando o programa *ClustalOmega*, pôde-se observar que *Ci*SEPT2 apresenta 73% de identidade com SEPT2 humana, *Ci*SEPT6 apresenta 71% de identidade com SEPT6 humana e, *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT9 mostraram respectivamente 71% e 48% de identidade com SEPT7 e SEPT9 humanas.

Utilizando o mesmo programa, foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências de septinas de *C. intestinalis* com as sequências das septinas humanas homólogas. Este alinhamento evidenciou a presença e conservação dos motivos G1, G3 e G4 preditos para septinas, além da sequência correspondente ao elemento único de septinas (SUE, na sigla em inglês) (Figura 16).

Os dados estruturais de SEPT2 (PDB ID: 3FTQ) permitiram observar com detalhes como se dão as interações em torno do nucleotídeo guanina evidenciando a participação de resíduos conservados presentes nos domínios G1, G3 e G4, em importantes funções para a hidrólise e reconhecimento do nucleotídeo.[62] Tais aminoácidos conservados também foram identificados nas quatro septinas de *C. intestinalis* (Figura 16).

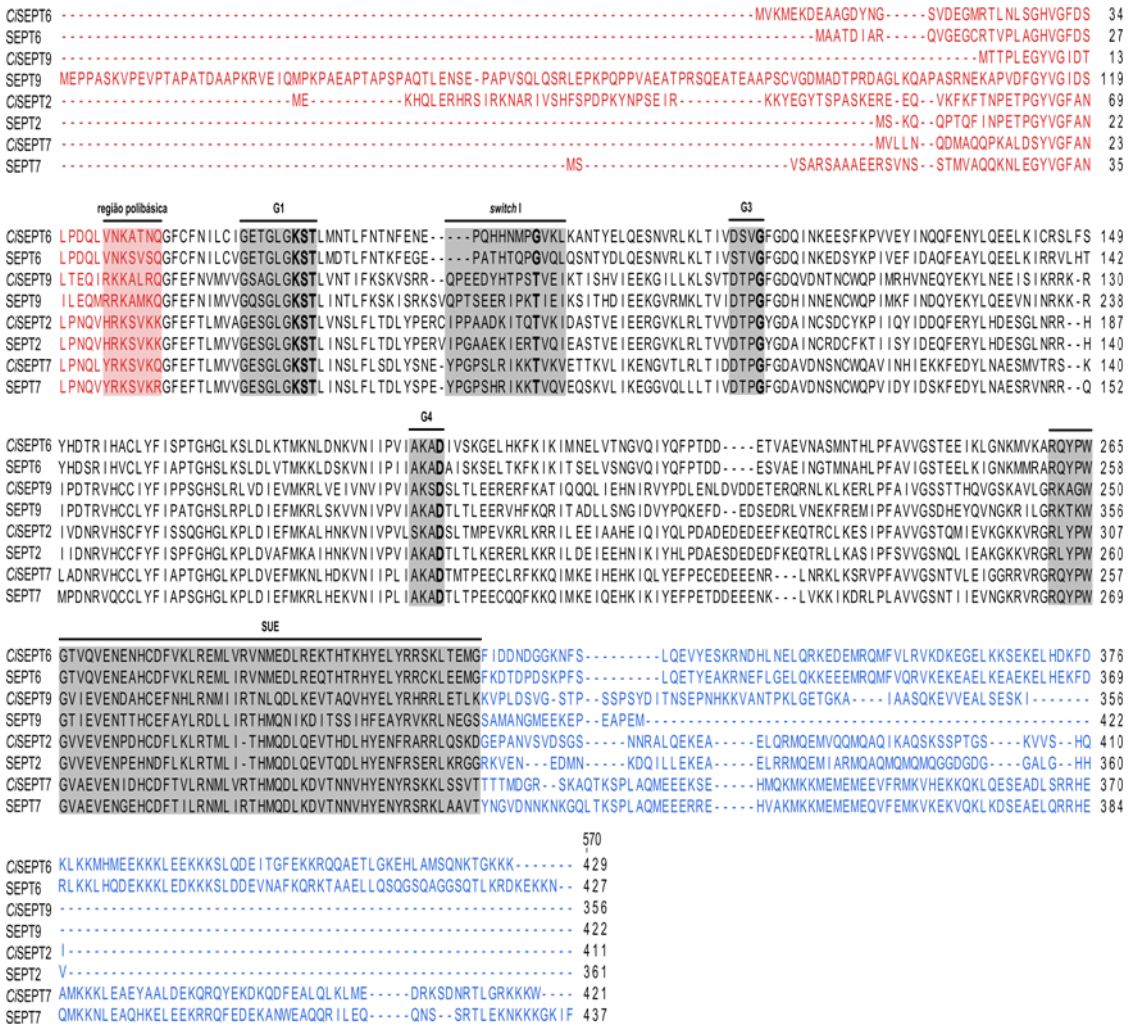


Figura 16 - Alinhamento múltiplo das sequências das septinas de *C. intestinalis* e as homólogas correspondentes humanas. Em vermelho, aminoácidos correspondentes ao domínio N-terminal; em preto, aminoácidos correspondentes ao domínio G; em azul, aminoácidos referentes ao domínio C-terminal. Os motivos correspondentes a região polibásica, *switch* I, G1, G3, G4 e SUE estão evidenciados por caixas sombreadas, enquanto os resíduos conservados relacionados a ligação e hidrólise do nucleotídeo estão identificados em negrito.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentro do motivo G1, o mais conservado no domínio G, foi observada a presença de 3 resíduos conservados, sendo eles, lisina, serina e treonina (correspondentes aos K-50, S-51 e T-52 de SEPT2). Já foi descrito que este motivo forma um *loop* flexível de modo que: o resíduo de lisina interage com os fosfatos β e γ do nucleotídeo; a serina interage com o íon Mg^{2+} e; o resíduo invariante de treonina forma ponte de hidrogênio com o fosfato-α promovendo assim, a estabilização desse nucleotídeo.[62]

No motivo G3, que interage com o fosfato-γ do GTP, é caracterizado pelo consenso (DxxG). Nas septinas de *C. intestinalis*, notou-se a presença do resíduo conservado de glicina (G-104). Além disso, no *switch I*, foi identificado outro resíduo conservado, uma treonina (T-

78), o qual participa coordenando o íon magnésio formando assim a principal ligação de hidrogênio com o fosfato-γ. Essa treonina, juntamente com a glicina invariante, medeia o mecanismo de *switch* universal, de modo que a cadeia principal da amida de cada um desses aminoácidos forma ligações de hidrogênio com o fosfato-γ, o qual é liberado após a hidrólise do GTP.[62]

Nas septinas classificadas no grupo II, como é o caso da septina 6, tanto de humanos quanto de *C. intestinalis*, este resíduo de treonina não está presente sendo substituído por uma glicina (Figura 16). Sirajuddin et al sugerem que a ausência desse resíduo esteja associada à incapacidade de hidrolisar o GTP.[62] Esse resíduo também está ausente em outras septinas que de igual modo foram relatadas como incapazes de hidrolisar o nucleotídeo GTP, tanto em humanos (SEPT6, SEPT8 e SEPT11), como em leveduras (Cdc10 e Cdc11) e também em *Schistosoma mansoni* (*Sm*SEPT10).[49, 91]

Já no motivo G4, foi identificada a presença do resíduo conservado de ácido aspártico (D-185). Este resíduo forma ligações de hidrogênio com a base guanina conferindo especificidade à ligação do GTP.[51, 53]

A presença desses resíduos envolvidos com a ligação e hidrólise do nucleotídeo tem sido consistentemente observada desde *S. cerevisiae* até humanos, indicando que essas interações são cruciais, desempenhando papéis importantes para a função das septinas.

A partir do alinhamento e identificação dos domínios e motivos estruturais das septinas de *C. intestinalis*, foi possível construir uma representação da estrutura primária dessas proteínas (Figura 17).

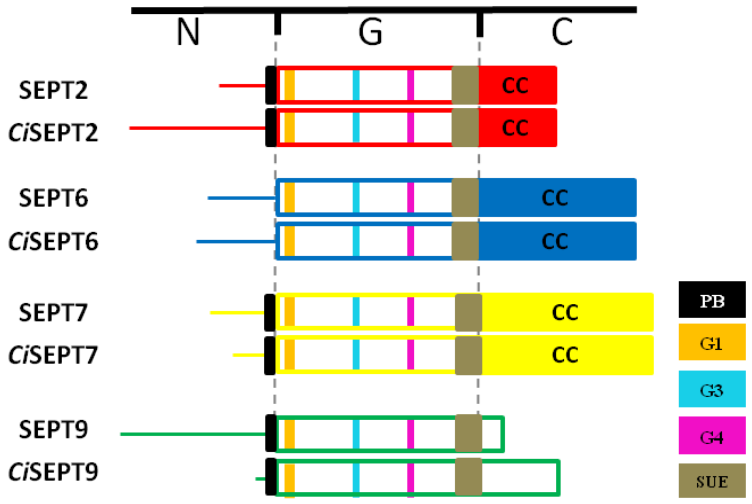


Figura 17 - Representação dos motivos e domínios presentes nas septinas de *C. intestinalis*. Domínio N-terminal à extrema esquerda; região polibásica em preto; domínio G apresentando os motivos G1, G3 e G5 em, laranja, ciano e rosa, respetivamente; elemento único de septinas em cinza; *coiled-coil* representado pelos retângulos preenchidos na domínio C terminal.

Fonte: Elaborada pela autora.

O esquema acima evidencia que os domínios N- e C-terminais são os mais variáveis tanto em tamanho quanto em motivos estruturais. Comparativamente, as diferenças mais expressivas foram observadas em *Ci*SEPT2 e 9, sendo esta última a septina que apresenta a maior divergência em relação a sua ortóloga em humanos. *Ci*SEPT9 apresenta a região N-terminal mais curta, compreendendo 106 resíduos a menos e a porção C-terminal maior, com 40 resíduos a mais. Adicionalmente, como predito para septinas classificadas no grupo I, segundo análise realizada com o programa *Coils2*, apenas *Ci*SEPT9, assim como SEPT9, não apresenta predição para estruturas do tipo *coiled-coil* no seu domínio C-terminal.[48, 54, 67-68]

O alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio G revelou ainda que *Ci*SEPT9 é a que mais diverge de sua representante em humanos apresentando aproximadamente 60% de identidade, enquanto as outras septinas de *C. intestinalis* apresentaram 80% de identidade nesse domínio com suas respectivas ortólogas.

Com os dados de predição de estruturas secundárias, obtidos pelo programa *Psipred*, foi possível planejar as demais versões das proteínas para expressão heteróloga. Assim, utilizando as CDSs sintéticas como molde, foi possível amplificar as as regiões de interesse para as versões truncadas de cada septina de *C. intestinalis*.

Para facilitar a compreensão, os domínios e regiões compreendidos em cada construção estão ilustrados a seguir (Figura 18).

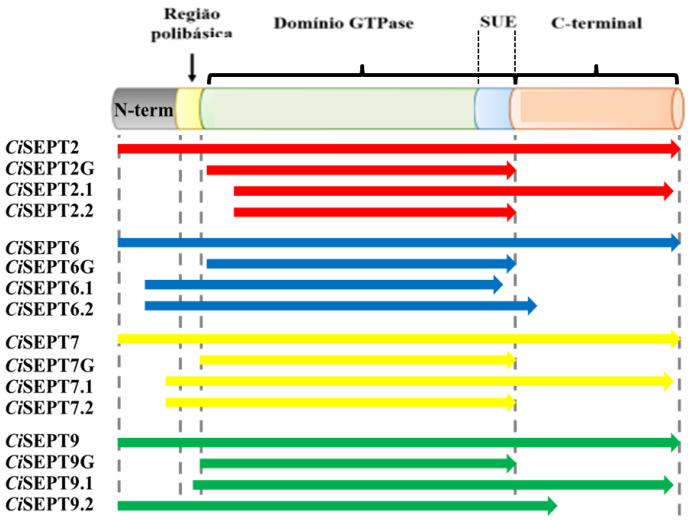


Figura 18 - Representação das construções idealizadas para expressão das septinas de *C. intestinalis*. O esquema em destaque acima corresponde a estrutura primária genérica de uma septina contendo todos os domínios estruturais e, as setas horizontais coloridas indicam os limites das construções, bem como os domínios compreendidos em relação a estrutura genérica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os limites das construções foram determinados em regiões sem predição de estrutura secundária, pois truncar um elemento estrutural poderia levar à instabilidade/insolubilidade do produto final. Mais detalhes de cada uma das construções se encontram na seção 3.2.1.

4.2 Produção heteróloga das proteínas de *C. intestinalis*

Uma vez clonadas nos vetores de expressão apropriados, a síntese das proteínas foi realizada em células de *E. coli* Rosetta (DE3) durante 18 horas de indução a 18°C sob agitação constante. Em seguida, foram realizados testes de solubilidade, os quais consistiram em: coletar as células após a expressão por centrifugação, ressuspendê-las em tampão, lisá-las, separar o extrato solúvel do precipitado por centrifugação e, por fim, analisar o conteúdo desses extratos por SDS-PAGE.

Como mostrado na Figura 19, com exceção de *Ci*SEPT6G, as outras construções compreendendo apenas o domínio G foram expressas majoritariamente na fração insolúvel, inviabilizando seu emprego nos estudos estruturais. Como essas construções foram expressas fusionadas a proteína SUMO, *Ci*SEPT6G, ainda que tenha sido obtida solúvel, precisaria de um passo de clivagem para a retirada da SUMO e este não foi eficiente. Isso porque após a

clivagem, essas duas proteínas apresentam massa molecular muito próximas, impedindo separá-las por cromatografia de exclusão molecular.

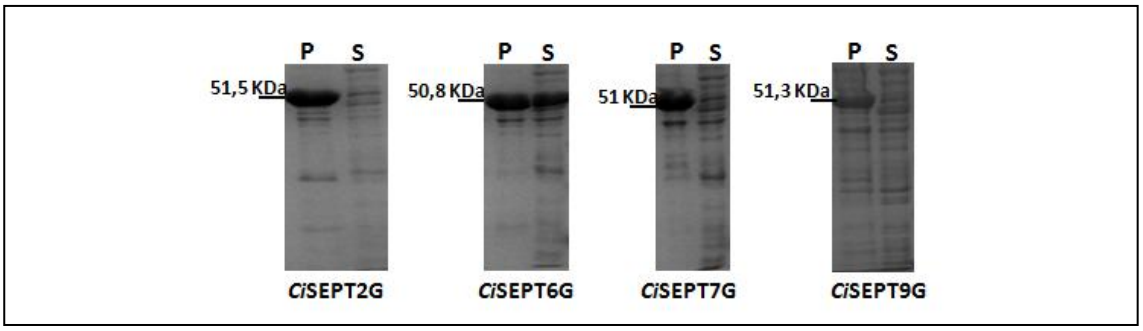


Figura 19 - Teste de solubilidade das construções contendo apenas o domínio G analisado por SDS-PAGE 12%: Na figura, P significa precipitado total após lise e centrifugação, fração que corresponde às proteínas insolúveis e; S corresponde a fração das proteínas solúveis, também após lise e centrifugação. A banda de expressão está indicada pela barra lateral, que traz também sua massa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora para septinas de outros organismos as versões truncadas compreendendo apenas o domínio de ligação ao nucleotídeo (domínio G) tenham se mostrado mais estáveis, para as septinas de *C. intestinalis* isso não foi observado. As identidades entre as septinas de *C. intestinalis* e seus pares ortólogos são altas, sendo maior entre os domínios G (60–80%). Porém as diferenças ainda acarretaram mudanças no comportamento, em termos de solubilidade dos domínios isolados. Uma vez que a intenção era realizar estudos envolvendo complexos, não faria sentido seguir as análises com apenas uma das proteínas truncadas. Assim, os estudos utilizando as construções contendo apenas o domínio G não foram continuados.

O mesmo teste de solubilidade foi realizado com as construções idealizadas para os ensaios cristalográficos. Do mesmo modo, embora algumas construções tenham sido obtidas na fração solúvel, a maior parte das proteínas de interesse foi obtida na fração insolúvel (Figura 20). Além disso, as construções obtidas de forma solúvel não apresentaram expressão notável e, uma vez que os ensaios de cristalização demandam uma grande quantidade de proteína, tais construções se mostraram inviáveis para esse propósito.

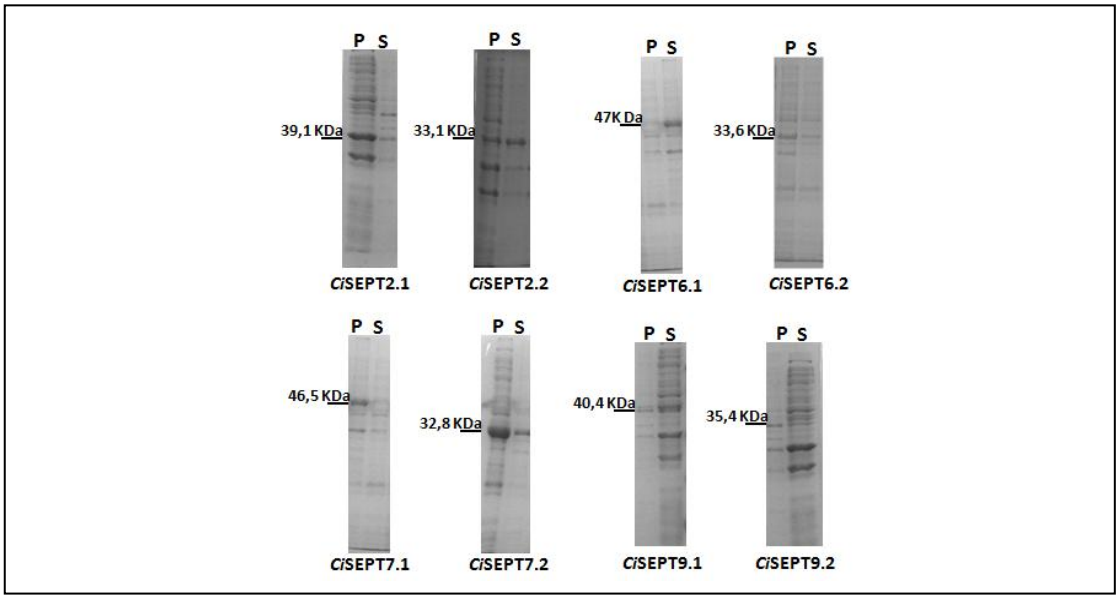


Figura 20 - Teste de solubilidade das construções truncadas para ensaios de cristalização. SDS-PAGE 12% mostrando: (P) fração precipitada após lise e centrifugação, correspondente às proteínas insolúveis e; (S) corresponde a fração das proteínas solúveis após lise e centrifugação. A massa molecular esperada para a proteína recombinante está destacada pela barra ao lado de cada gel, mostrada em kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que para todas essas construções, buscando melhorar a solubilidade, foram realizados testes com tampões contendo maior concentração de NaCl, maior porcentagem de glicerol e ainda, outros aditivos como L-arginina e ácido glutâmico que são aminoácidos carregados empregados por impedir agregação não específica.[109] Infelizmente, estes esforços não se mostraram eficazes, não revertendo a condição de insolubilidade/instabilidade dessas proteínas.

Por outro lado, surpreendentemente, quando analisadas as construções correspondentes às proteínas completas, estas, com exceção da *Ci*SEPT9, apresentaram um comportamento solúvel e bastante estável. Assim, devido ao bom progresso com as construções para expressão das proteínas integrais, estas foram empregadas nos experimentos seguintes. Assim, após a cromatografia de afinidade, as proteínas *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular tanto para obtenção de um produto final mais puro, quanto para análise de sua homogeneidade conformacional (Figura 21).

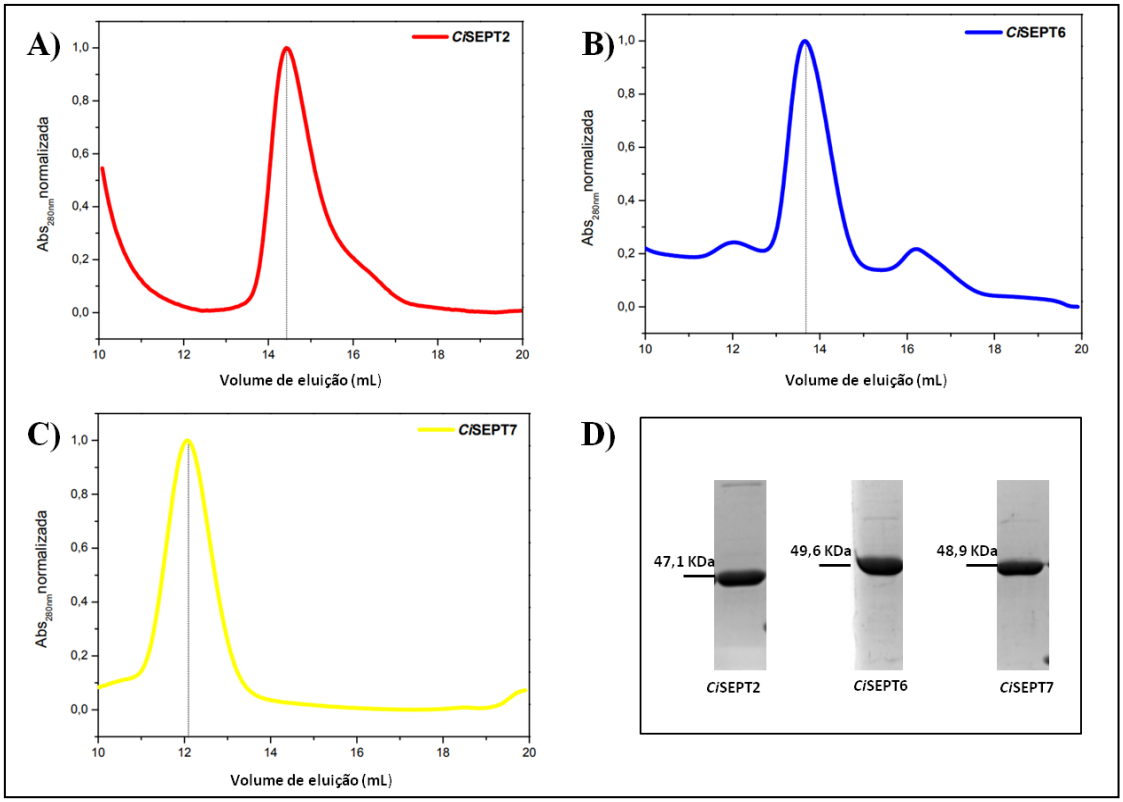


Figura 21 - Perfil cromatográfico das proteínas recombinantes na coluna Superdex 200. A), B) e C) correspondem ao cromatograma de *Ci*SEPT2, 6 e 7, respectivamente e; D) Análise das frações correspondentes ao pico da eluição em SDS-PAGE 12%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante os experimentos de expressão em sistema heterólogo, *Ci*SEPT9 sozinha apresentou-se pouco solúvel e bastante instável, precipitando mesmo quando mantida em condições de alta concentração de sal e na presença dos aditivos L-arginina e ácido glutâmico. Esse comportamento pode dever-se ao fato de estas proteínas tenderem a formar hetero-oligômeros e precisarem de seus parceiros para se estabilizarem.[72, 89 e 110] *Ci*SEPT9 exibe um C-terminal longo (59 resíduos), em relação a ortóloga humana, e que contém majoritariamente estrutura não regular predita (~56% *randon coil*), de modo que esse domínio pode contribuir para o comportamento observado pela *Ci*SEPT9 na ausência de outras septinas.

Além das proteínas isoladas, adicionalmente, foram avaliados diferentes arranjos para a formação de complexos com as septinas de *C. intestinalis*. Assim, as construções co-expressas e/ou co-purificadas contendo *Ci*SEPT2/6, *Ci*SEPT7/9, *Ci*SEPT2/6/7, *Ci*SEPT6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7/9 também foram analisadas.

Após a cromatografia de afinidade, em que se observou a co-purificação das proteínas evidenciando a interação entre elas, os produtos foram submetidos a cromatografia de exclusão molecular para que fosse possível avaliar a homogeneidade da amostra. No caso dos heterocomplexos, esse segundo passo cromatográfico foi importante também para separar possíveis excessos das subunidades fusionadas ao His-*tag* e agregados.

Os perfis cromatográficos dos complexos, em geral, apresentaram mais de um pico de eluição, indicando haver mais de um estado oligomérico nas amostras (Figura 22). Perfis com as mesmas características já foram observados em outros complexos tanto de septinas humanas, como SEPT5/6/7 e SEPT2/6/7/9α0 (dados não publicados), como em complexos de septinas de outros organismos, como *Sm*5/10/7.2 de *S. mansoni*.[88] Em todos os casos, observou-se a predominância de um estado oligomérico o que pode sugerir a existência de uma organização preferencial ou mais estável para a montagem do complexo.

A análise em SDS-PAGE de uma fração do eluato obtido pós-cromatografia de exclusão molecular revelou a obtenção de um produto composto por uma mistura equimolar das septinas de *C.* i*ntestinalis* em cada um dos complexos (Figura 22F).

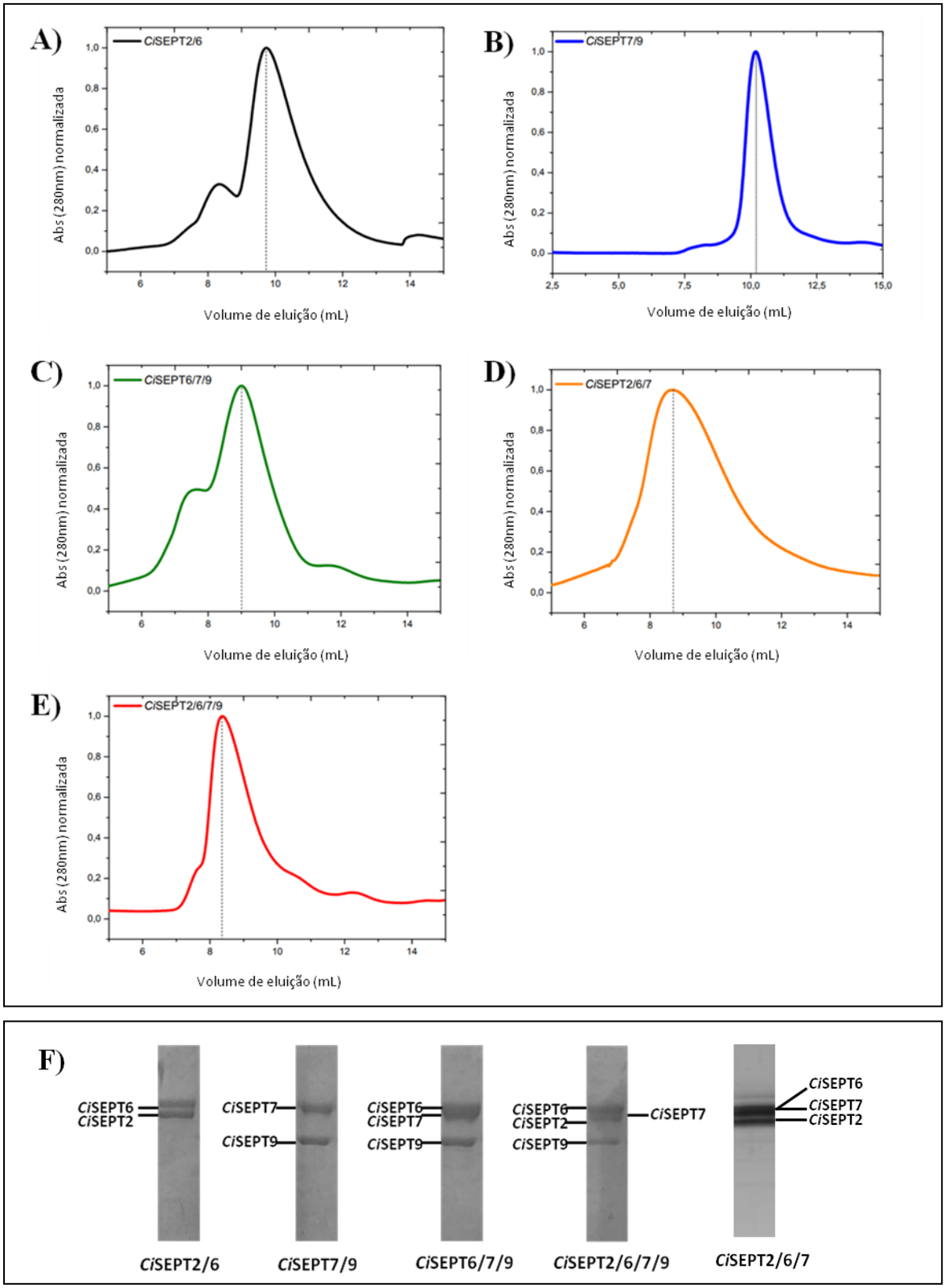


Figura 22 - Análise da purificação dos heterocomplexos formados pelas septinas de *C. intestinalis*. A-E) Perfil cromatográfico das construções correspondentes aos complexos. F) Análise em SDS-PAGE 12% das frações correspondentes ao pico da eluição do complexo de interesse.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Dicroísmo Circular (CD)

De forma a avaliar se as proteínas recombinantes se encontravam enoveladas, a técnica de dicroísmo circular foi empregada. Os espectros de CD das proteínas isoladas, bem como dos complexos, exibiram um perfil típico de proteína contendo estrutura regular (Figura 23), apresentando mínimos negativos em 208nm e 222nm, típicos de elementos de estrutura secundária do tipo α-hélice.[111] Além disso, os espectros obtidos experimentalmente para as septinas de *C. intestinalis* estão de acordo com resultados já relatados para outras septinas, os quais apontam perfil de estrutura secundária com predominância de estruturas do tipo α-hélice.[84, 103, 112]

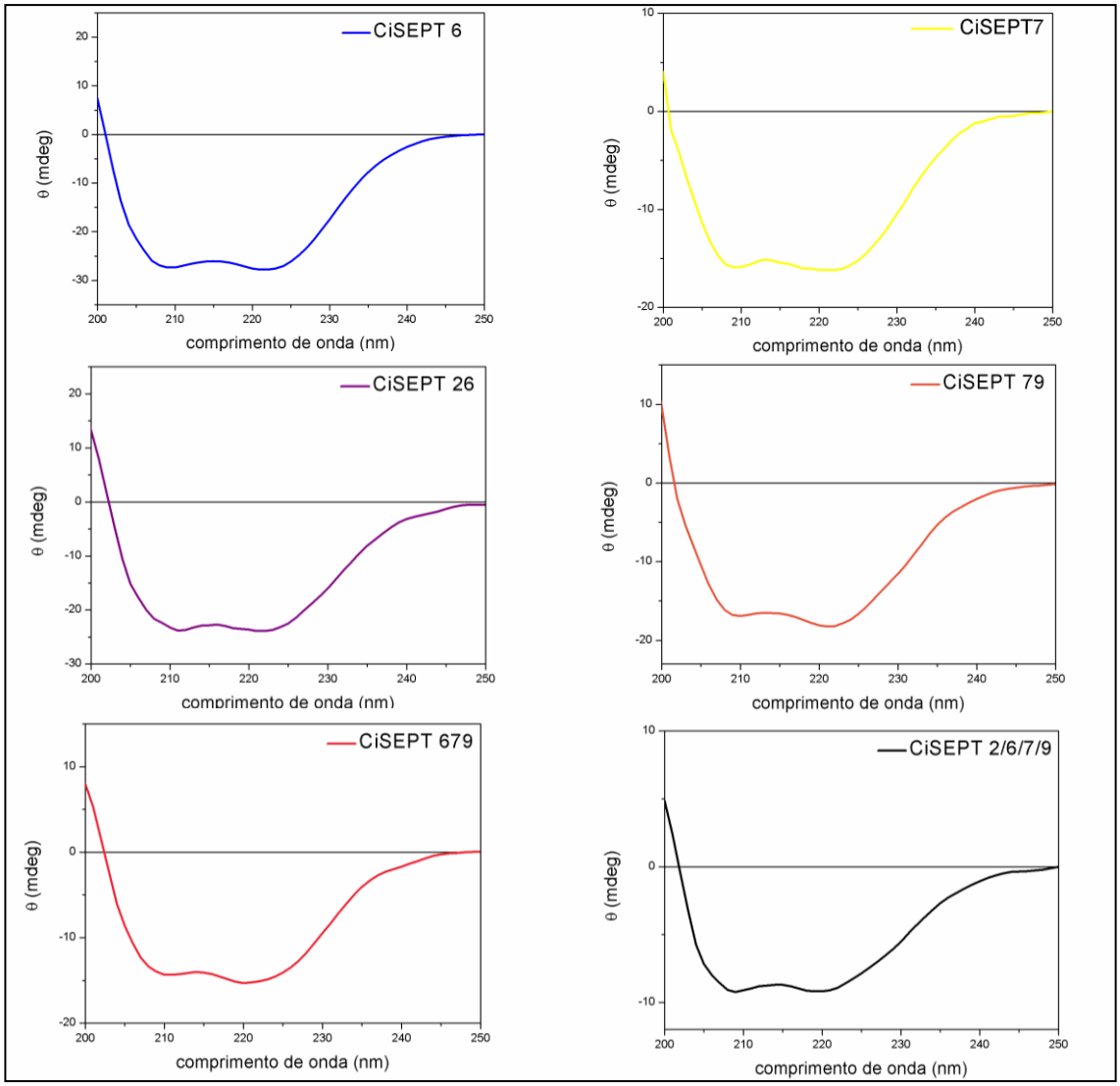


Figura 23 - Espectros de CD das construções de septinas de *C. intestinalis*. Os espectros foram obtidos a 10ºC, com amostras contendo 3µM das diferentes proteínas em tampão 20mM de fosfato de sódio pH 8, contendo 300mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$ e 5% de glicerol.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Determinação da massa molecular e oligomerização das proteínas de *C. intestinalis*

Partindo da análise dos perfis de eluição das proteínas isoladas, *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7, nota-se que conforme são adicionadas subunidades às construções, o perfil de eluição muda deslocando-se para a esquerda, indicando que o produto obtido apresenta um estado oligomérico maior. No entanto, embora seja notável esse incremento na massa por meio da interação de uma nova subunidade, não é possível determinar o estado oligomérico desses heterocomplexos.

Nesse sentido, inicialmente buscou-se estimar a massa molecular, tanto dos heterocomplexos quanto das proteínas individuais, a partir da calibração da coluna Superdex 200 com proteínas padrão, disponibilizadas no *Gel Filtration Calibration Kit*, produzido por GE *Healthcare Life Sciences*. No entanto, para todas as amostras analisadas a massa aparente calculada foi superestimada frente a massa teórica predita a partir da sequência (dados não mostrados). Esse resultado já era esperado uma vez que as septinas, mesmo quando não complexadas, apresentam domínios não globulares (N e C-terminais). Tal fato somado a outras limitações como alta concentração de sal e a o erro intrínseco da técnica, levam a uma estimativa com baixa acurácia, o que pode ter resultado nos valores de massa superestimados.

Desta forma, empregou-se a técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de múltiplos ângulos (SEC-MALS). Nessa técnica, a massa é aferida sem a necessidade de uma curva de calibração e, além disso, independe do formato da molécula em solução e/ou do seu tempo de eluição. Assim, a partir dos dados computados, foi possível aferir as massas das diferentes construções. Um resumo dos espectros obtidos está apresentado nos gráficos a seguir (Figura 24).

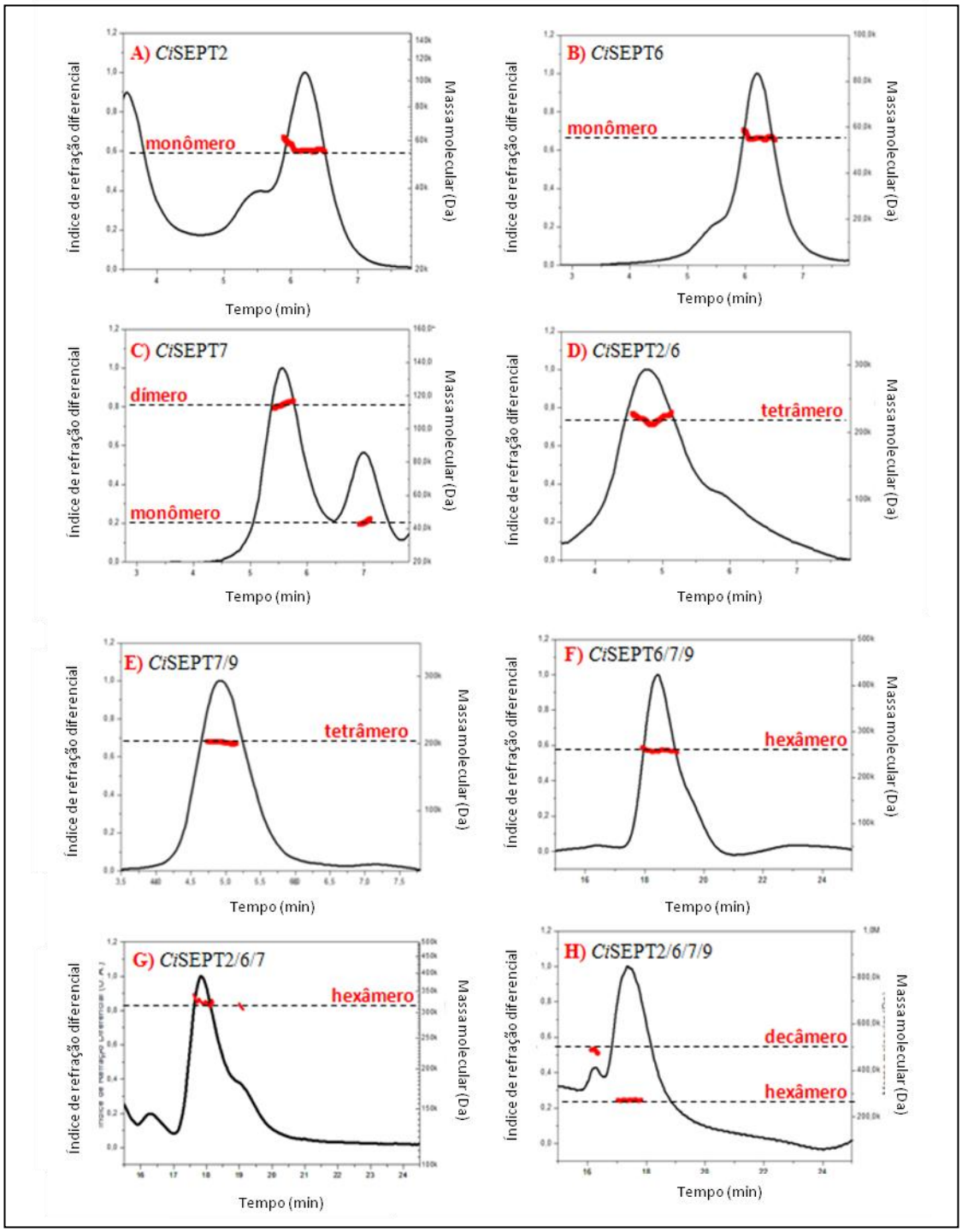


Figura 24 - Determinação da massa molecular por SEC-MALS para as septinas de *C. intestinalis*. Nos gráficos, a curva em preto corresponde ao índice de refração diferencial e ilustra a concentração de cada pico observado. A linha em vermelho corresponde a massa molecular calculada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados referentes à massa de cada amostra estão sumarizados na tabela a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados obtidos para as análises por SEC-MALS das diferentes construções analisadas individualmente.

Construção	Massa molecular calculada (kDa)	Fração de massa (%)	Estado oligomérico calculado	Estado oligomérico teórico	Massa molecular teórica (kDa)
***Ci*SEPT 2**	52,4 (+/- 0,7%)	100	monômero	monômero	47,1
***Ci*SEPT 6**	55,6 (+/- 0,5%)	100	monômero	monômero	49,6
***Ci*SEPT 7**	44,1 (+/- 5,1%) 115 (+/- 0,9%)	25,5 74,5	monômero dímero	monômero dímero	48,9 97,8
***Ci*SEPT 2/6**	220(+/- 10,3%)	100	tetrâmero	tetrâmero	193,4
***Ci*SEPT 7/9**	202,1(+/-2,0%)	100	tetrâmero	tetrâmero	178,6
***Ci*SEPT 6/7/9**	259,2(+/-0,3%)	100	hexâmero	hexâmero	277,8
***Ci*SEPT 2/6/7**	325 (+/-1,4%) 316,6(+/-6,3%)	85,9 14,1	hexâmero	hexâmero	291,2
***Ci*SEPT 2/6/7/9**	485,5 (+/0,4%) 264,7 (+/0,2%)	13,1 86,9	decâmero (?) hexâmero	octâmero	372

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras analisadas apresentam a linha correspondente à massa molecular linear (linha vermelha), indicando uma amostra homogênea, ou seja com predominância de uma população em termos de oligômeros.

A discussão desses resultados será feita em conjunto com os dados de análise do teor de nucleotídeos, apresentados a seguir.

4.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e da atividade GTPásica

Para verificar a presença e a natureza de nucleotídeos ligados ao domínio G, seguiu-se o método de desnaturação química das proteínas por ácido perclórico para liberação do nucleotídeo, como descrito em métodos.

Como se pode observar, as proteínas recombinantes *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6, quando isoladas, foram obtidas na forma apo (Figura 25B), o que concorda com o fato dessas proteínas terem sido produzidas na forma monomérica. A interface esperada para a homodimerização seria a interface G, cuja interação é sabida ser dependente da presença do nucleotídeo ligado a ambas subunidades envolvidas.[79]

A ausência de nucleotídeo ligado em *Ci*SEPT6 concorda com o observado para SEPT6 humana quando expressa em *E. coli*. Já foi relatado para septinas humanas pertencentes do grupo II (grupo da SEPT6) que, na ausência de seu parceiro fisiológico, cuja interação se dá via interface G, estas não são capazes de ligar o nucleotídeo, indicando que além de não apresentarem a habilidade de hidrólise também perderam a capacidade de mantê-lo ligado.[81, 90]

Com relação a *Ci*SEPT2 apresentar-se como monômero, este foi um fato não esperado, já que SEPT2 humana foi purificada sempre como um homodímero quando expressa em *E. coli*, sendo formado via interface G e ligado ao GDP.[79, 98] Entretanto, o estado monomérico observado no SEC-MALS para *Ci*SEPT2 é condizente com seu estado na forma apo.

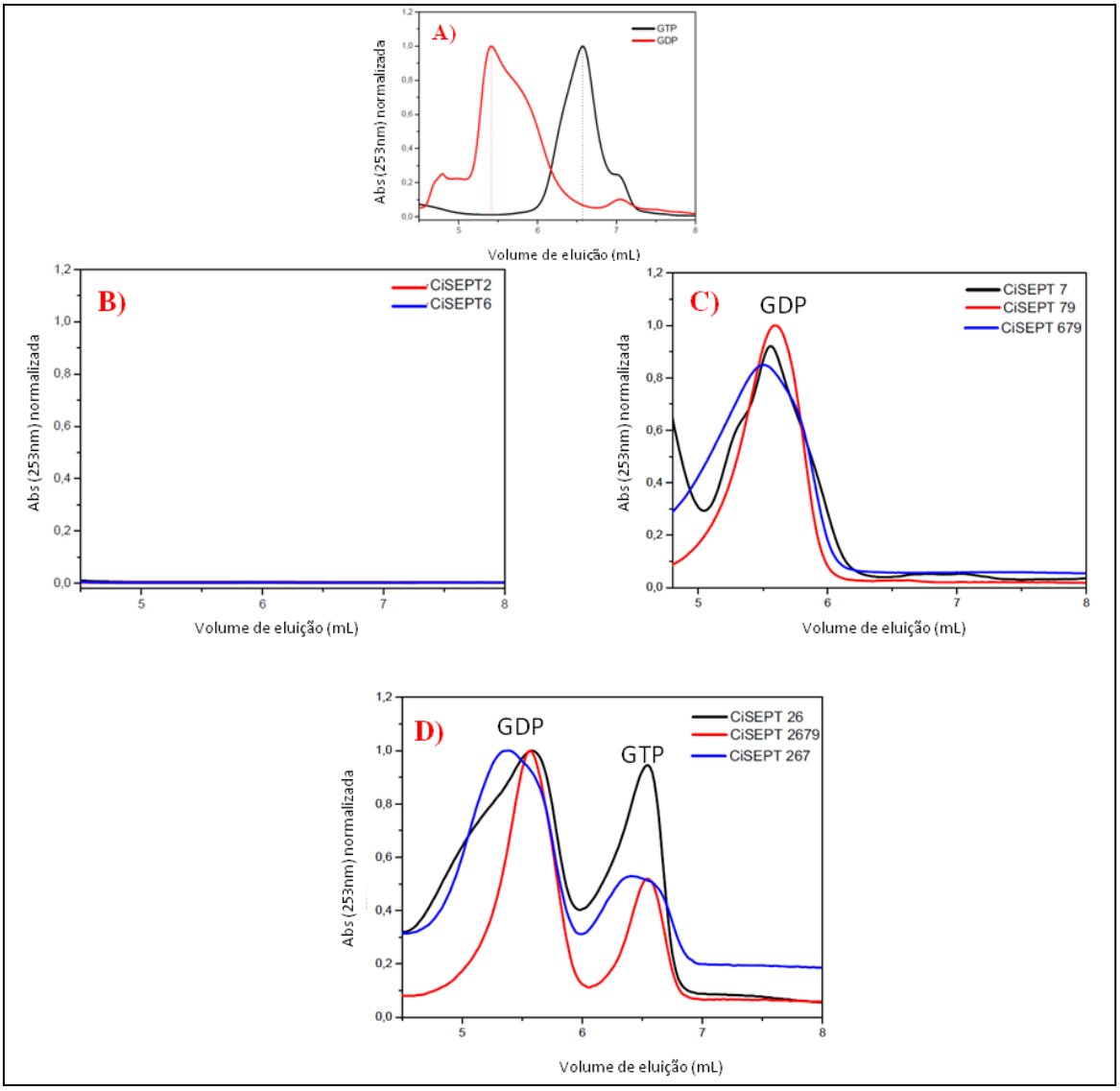


Figura 25 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo por cromatografia de troca iônica. Em A, perfil de separação dos nucleotídeos GDP e GTP, utilizados como padrão, com seus respectivos picos de eluição destacados junto ao eixo da abcissa. Em B, perfil de eluição das proteínas apo, ou seja, sem nucleotídeo ligado. Em C, perfil de eluição das proteínas ou complexos ligados ao GDP somente. Em D, perfil de eluição das proteínas ou complexos que se apresentaram ligados a ambos nucleotídeos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 25C, o cromatograma mostra que *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT7/9, apresentam-se ligadas ao nucleotídeo GDP. Embora não esteja ainda muito bem esclarecido, a ligação e a hidrólise desse nucleotídeo estão relacionadas com a interação entre as diferentes septinas e consequente formação de filamentos.[56, 62, 96] Assim, uma vez que *Ci*SEPT7 e *Ci*SEPT7/9 são obtidas respectivamente nas formas dimérica e tetramérica, era esperado que essas construções apresentassem nucleotídeos ligados, mais especificamente GDP, em virtude da capacidade catalítica esperada para septinas desses grupos.

O heterocomplexo *Ci*SEPT2/6 apresentou liberação de GTP e GDP na proporção de 1:1. Tendo em vista que as septinas de *C. intestinalis* são ortólogas às de humanos, esperava-se um comportamento semelhante entre elas. Dito isso, esse resultado concorda com dados da literatura, que mostram que as septinas humanas SEPT2 e SEPT6, quando no heterocomplexo SEPT2/6/7, se apresentam ligadas a GDP e GTP, respectivamente.[79] Além disso, um estudo mostrou que o complexo dimérico formado pelos domínios G dessas proteínas (SEPT2G/6G) também apresenta GTP e GDP ligados.[90] Assim, pode-se afirmar que *Ci*SEPT2 quando complexada com sua parceira se apresenta ligada a GDP e, da mesma forma, *Ci*SEPT6 ao GTP. O fato de *Ci*SEPT6, quando no complexo com *Ci*SEPT2, estar ligada a GTP é sustentado pela sua incapacidade de hidrolisar o nucleotídeo GTP, característica comum às septinas de seu grupo.[79]

Para o heterocomplexo *Ci*SEPT6/7/9 foi observada a liberação apenas de GDP, indicando que, nesse arranjo, *Ci*SEPT6 encontra-se provavelmente na forma apo pelo motivos citados acima, ou seja, pela falta da septina parceira de interação pela interface G (*Ci*SEPT2, no caso).

Finalmente, como já era previsto tendo como base resultados já publicados para outras septinas, *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9 também apresentaram a liberação tanto de GTP quanto de GDP.[79] Esses resultados em conjunto demonstram que os complexos estão se formando de maneira similar ao complexo 2-6-7-9 humano com relação as interfaces G. Porém, o fato de observarmos tetrâmeros na coexpressão dos complexos *Ci*SEPT2/6 ou *Ci*SEPT7/9 é curioso e mostra um arranjo diferente daquele observado para os respectivos complexos de septinas homólogas humanas, os quais se comportam como dímeros em ambos os casos (dados de nosso grupo ainda não publicados).

Os resultados de teor de nucleotídeo revelaram indiretamente a natureza catalítica das septinas em estudo. Experimentos visando avaliar diretamente a capacidade hidrolítica das septinas de *C. intestinalis* sobre o GTP foram também realizados e os resultados são mostrados na Figura 26.

Após as proteínas terem sido incubadas com excesso de GTP (proporção de 1:3), seguiu-se o mesmo protocolo de desnaturação proteica usado para avaliar o teor de nucleotídeos. Assim, a atividade catalítica pôde ser avaliada por cromatografia de troca iônica, monitorando os nucleotídeos liberados após a desnaturação proteica (Figura 26). Não foi possível realizar esse experimento com *Ci*SEPT9 isolada, devido ao baixo rendimento e sua alta instabilidade.

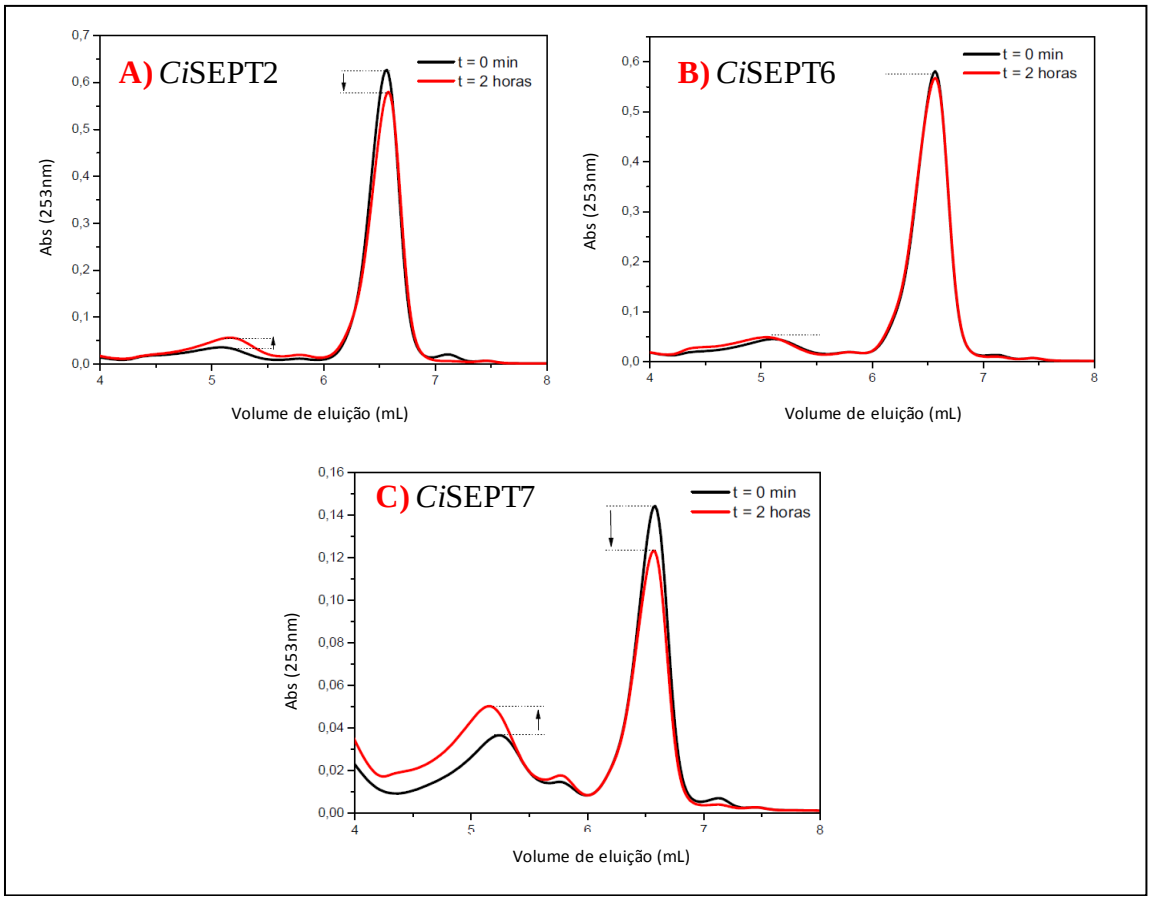


Figura 26 - Avaliação da atividade hidrolítica de *Ci*SEPT2, *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 sobre o GTP ao longo do tempo. Os gráficos mostram os perfis de eluição dos nucleotídeos liberados para cada uma das proteínas após incubação de 2 horas a 20°C com excesso de GTP, precipitação das proteínas e separação dos nucleotídeos por cromatografia de troca aniônica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode-se observar na Figura 26, tanto *Ci*SEPT2 quanto *Ci*SEPT7, embora em taxas diferentes, foram capazes de hidrolisar o GTP gerando como produto o GDP. Em contrapartida, como esperado, não foi observada atividade GTPásica para *Ci*SEPT6. Nesse experimento, observou-se que em duas horas, *Ci*SEPT2 hidrolisou 10% de GTP, enquanto *Ci*SEPT7 foi capaz de converter ~15% desse nucleotídeo em GDP. Embora o experimento tenha um caráter mais qualitativo, o fato de *Ci*SEPT7 ter os sítios majoritariamente ocupados com GDP (fato verificado no experimento de teor de nucleotídeo), associado a uma taxa de conversão de GTP-GDP relativamente maior que *Ci*SEPT2 (que é apo), sugerem que a taxa de hidrólise por *Ci*SEPT7 seja, de fato, mais elevada. Isto, porém, precisa ser confirmado com dados experimentais adicionais.

Com relação a *Ci*SEPT6 não apresentar atividade hidrolítica, isso está relacionado ao fato desta proteína, ortóloga à septina humana 6, não apresentar a treonina (correspondente à

Thr78, tendo como base a sequência de SEPT2), responsável pela coordenação do fosfato γ para a hidrólise, como já discutido anteriormente.[49, 62]

4.6 Análise da morfologia dos oligômeros por microscopia eletrônica de transmissão

Tendo observado a co-purificação das septinas de *C. intestinalis* indicando a interação para formação de heterocomplexos, era importante verificar se os mesmos se organizavam em estruturas oligoméricas como as já reportadas para septinas de outros organismos. Para isso, complexos recombinantes de septinas de *C. intestinalis*, purificados, inicialmente em tampão contendo 300 mM de sal, foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Quando analisados por MET, os complexos *Ci*SEPT2/6 e *Ci*SEPT7/9 apresentaram-se como oligômeros de aproximadamente 20 nm de comprimento (Figura 27). Este comprimento é compatível com o tamanho observado para o complexo tetramérico de *C. elegans* e, assim, concorda com os resultados obtidos por SEC-MALS.[64]

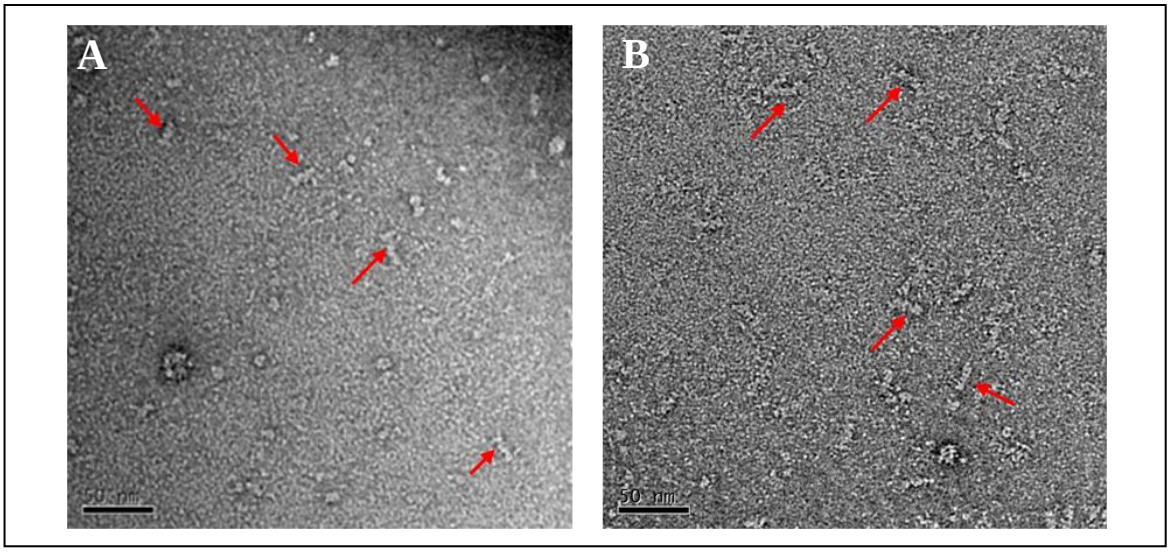


Figura 27 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das septinas de *C. instestinalis* a 300mM de NaCl. Subunidades tetraméricas dos complexos *Ci*SEPT2/6 (A) e *Ci*SEPT7/9 (B), ambos na forma de bastão.

Fonte: Elaborada pela autora.

As subunidades formadas por *Ci*SEPT2/6 e *Ci*SEPT7/9 exibiram massas aproximadas de 200 kDa, compreendendo tetrâmeros em forma de bastão. Resultados de nosso grupo

(ainda não publicados), mostram que a co-expressão das septinas humanas SEPT2 e SEPT6 sempre apresenta dímeros em solução, formados via interface G, mas nunca tetrâmeros. Quando as estruturas primárias de septinas ortólogas humanas são comparadas com as de *C. intestinalis*, as regiões N e C-terminais são as mais distintas entre elas (Figuras 16 e 17). Assim, essas diferenças poderiam contribuir para o comportamento observado em termos de oligomerização, ou seja, em *C. intestinalis* os domínios N e C-terminais de alguma forma permitiriam a união estável entre duas subunidades dos complexos *Ci*SEPT2-*Ci*SEPT6, e também de *Ci*SEPT9-*Ci*SEPT7, formando o tetrâmeros.

Para o complexo formado pelas quatro septinas, *Ci*SEPT2/6/7/9, a análise por SEC-MALS mostrou uma amostra heterogênea, sendo que os resultados de MET confirmaram este fato, mostrando oligômeros de tamanhos diversos e incluindo longos filamentos (Figura 28). Oligômeros com comprimento entre 30 e 35 nm observados corresponderiam a octâmeros, com base em dados reportados para complexos de septinas de levedura e humanos.[36, 79]

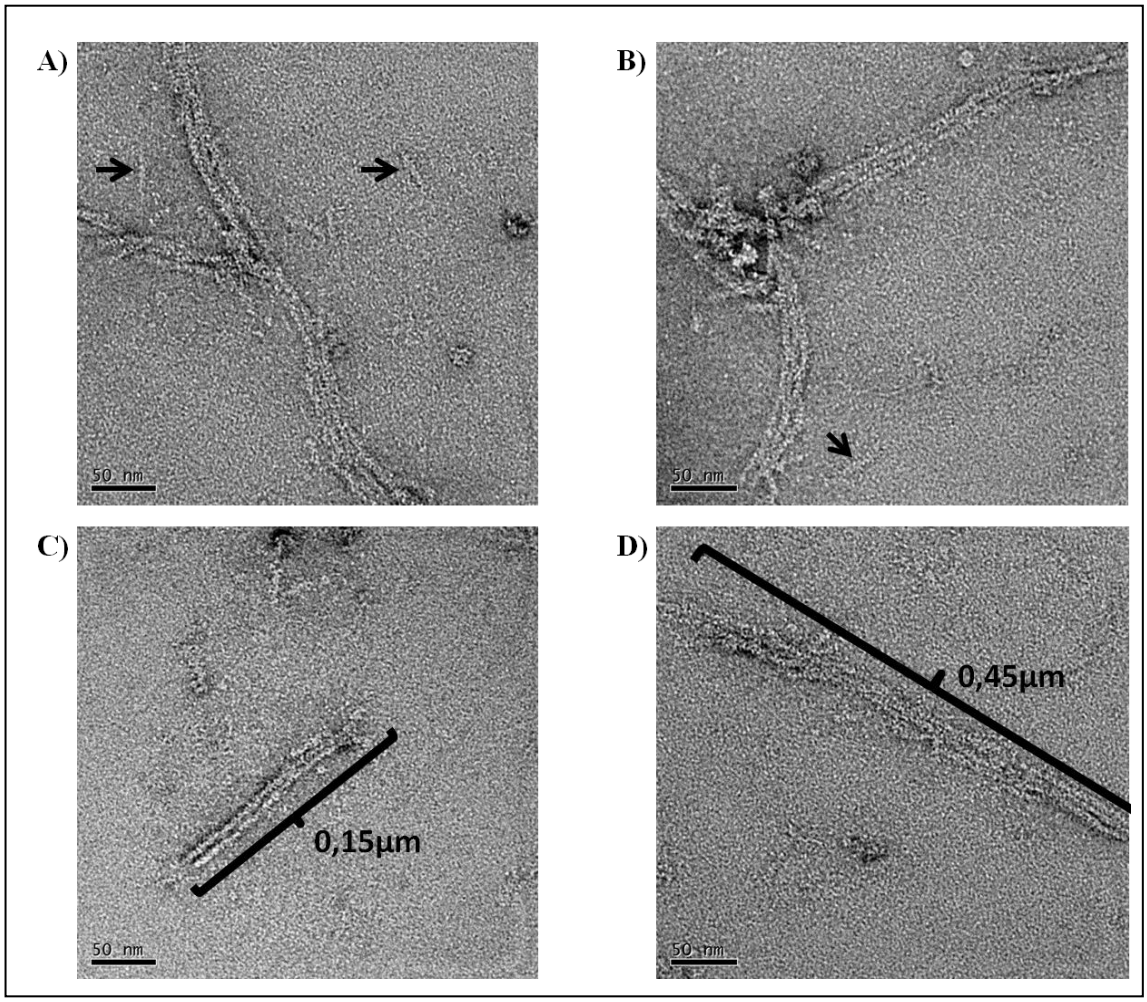


Figura 28 - Micrografia do complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 300mM de NaCl. Nas imagens, as setas pretas apontam octâmeros com aproximadamente 30-35 nm de comprimento. Em C e D, imagens dos filamentos evidenciando seus comprimentos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma característica das septinas é a polimerização sob baixas concentrações de sal, isto é, menor do que 40mM de NaCl.[36, 50, 79] Porém, foi observado para o complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 que mesmo estando numa condição de tampão contendo 300 mM de NaCl, a polimerização não foi completamente impedida. Na figura 28 observa-se que os oligômeros foram capazes de interagir longitudinalmente formando filamentos os quais, por sua vez, foram ainda capazes de interações laterais, formando feixes. Com esse resultado inesperado algumas questões surgiram, como a possibilidade desses filamentos corresponderem a "contaminação" de uma fração da amostra não incluída na cromatografia de exclusão molecular, uma vez que a eluição do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 se deu muito próxima ao volume morto (*void*) da coluna (Figura 22E).

Por isso, afim de separar ainda mais a eluição do complexo do *void*, a coluna Superdex 200 *HiLoad* foi utilizada (Figura 29A). Adicionalmente, na tentativa de inibir a polimerização e assim, ser possível observar a unidade básica para polimerização, o mesmo heterocomplexo foi submetido a uma nova purificação, dessa vez, aumentando a concentração de NaCl para 800 mM no tampão. Uma fração do eluato foi submetida à análise por SEC-MALS indicando que o produto final tratava-se predominantemente de tetrâmeros (Figura 29C), porém, a linha vermelha que representa a homogeneidade da amostra não está linear, indicando ainda uma amostra heterogênea.

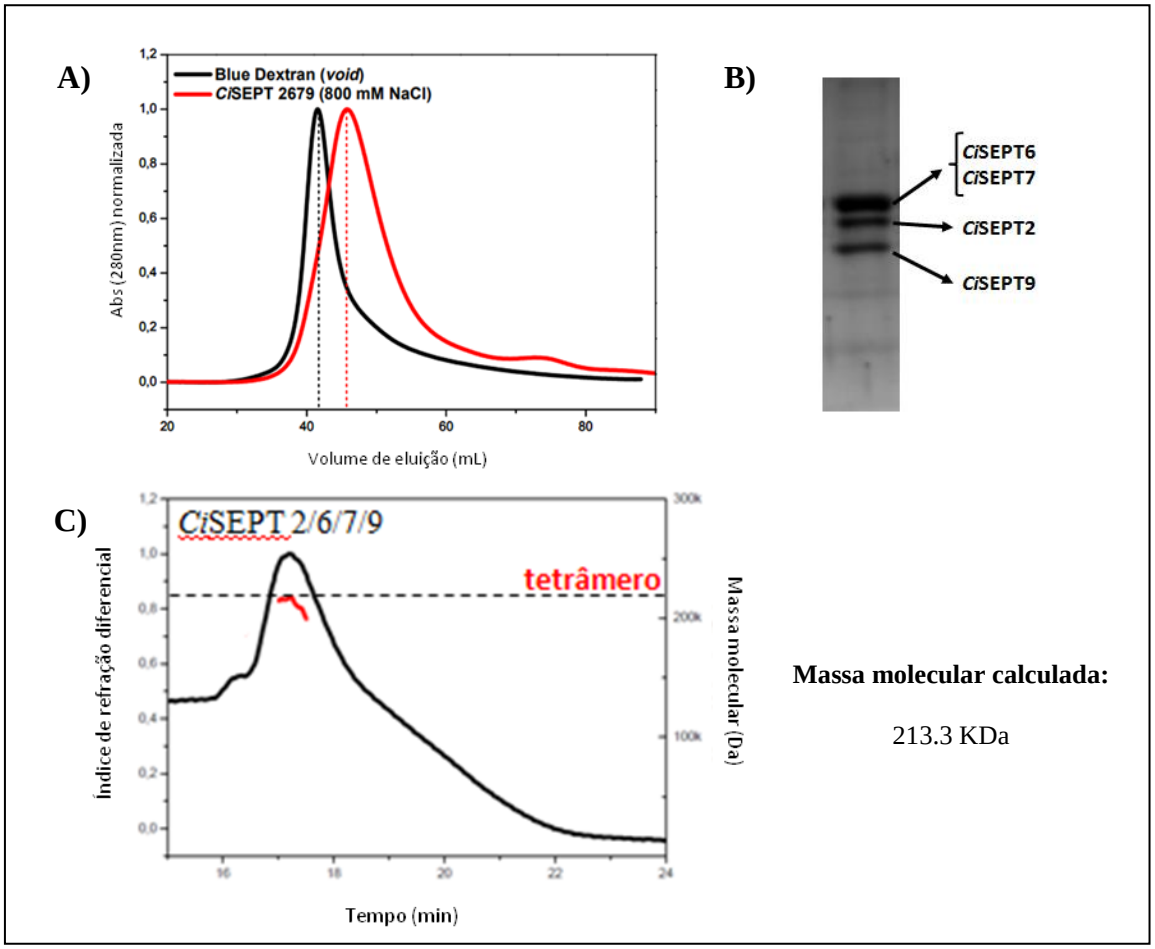


Figura 29 - Purificação e estimativa de massa do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800mM de NaCl. A) Perfil cromatográfico do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 em tampão contendo 800mM de NaCl e determinação de seu estado oligomérico por SEC-MALS. B) Análise do eluato em SDS-PAGE evidenciando a obtenção de um produto equimolar. C) Determinação da massa molecular por SEC-MALS.

Fonte: Elaborada pela autora.

De fato, essa mesma amostra quando analisada por MET, mostrou-se composta por tetrâmeros e octâmeros (oligômeros de 20 nm e 30-35 nm, respectivamente), além de ainda apresentar longos filamentos. No entanto, como pode ser observado na Figura 30, esses filamentos apresentam uma aparência diferente daqueles observados em 300 mM de NaCl (Figura 28). Enquanto no primeiro caso os filamentos se mostram muito bem formados, no segundo, a 800mM de NaCl, os filamentos apresentam um caráter descontínuo, mostrando "falhas" longitudinais. Esse caráter pode ser resultado da ação da alta força iônica que interfere nas interações estabilizadas por pontes salinas. Ainda assim, a formação de estruturas mais ordenadas sob essas condições é um comportamento bastante incomum para septinas.

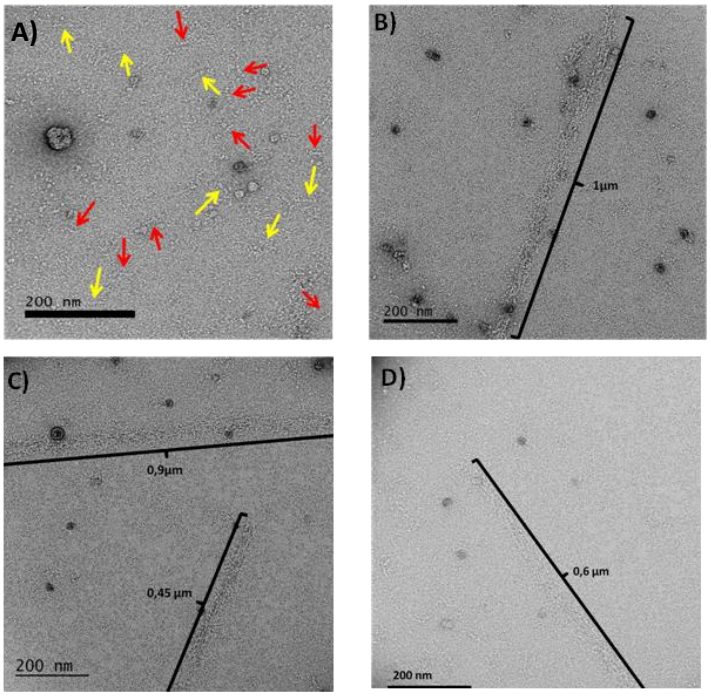


Figura 30 - Micrografia do complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800 mM de NaCl. A) As setas vermelhas indicam as subunidades tetraméricas com comprimento em torno de 20 nm e, as setas amarelas indicam as subunidades octaméricas com comprimentos de 30-35 nm; B-D) Imagens dos filamentos evidenciando o comprimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os heterocomplexos parciais, *Ci*SEPT6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7, também foram avaliados em termos de oligomerização por meio da microscopia. Nessa análise, apesar do resultado de SEC-MALS para ambas construções indicar uma amostra homogênea hexamérica, o que se

observou por MET foram oligômeros de tamanhos variados, apresentando comprimentos correspondentes a tetrâmeros e hexâmeros para *Ci*SEPT6/7/9 e hexâmeros e oligômeros maiores com mais de 50 nm para *Ci*SEPT2/6/7 (Figura 31).

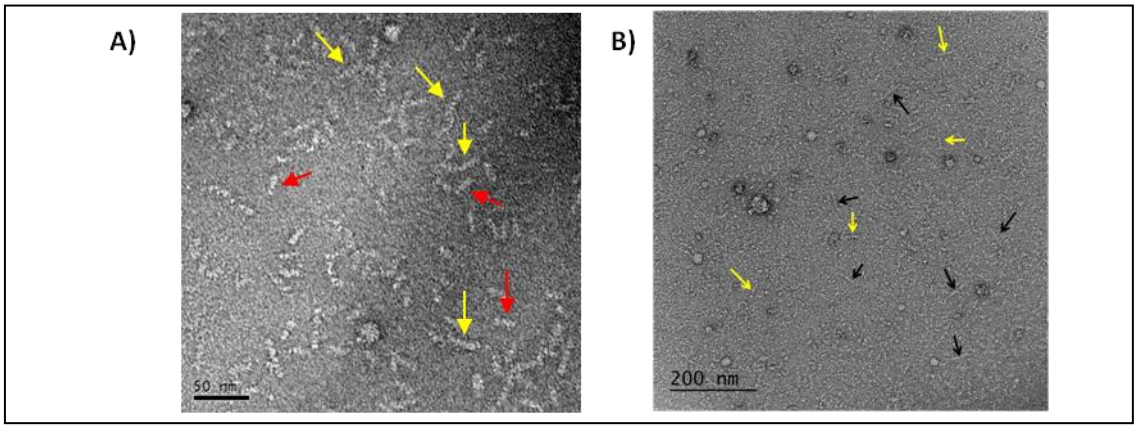


Figura 31 - Micrografias dos complexos *Ci*SEPT6/7/9 (A) e *Ci*SEPT2/6/7 (B) a 300 mM de NaCl. Nas figuras, as setas vermelhas indicam as subunidades tetraméricas com comprimento em torno de 20 nm, as setas amarelas indicam as subunidades hexaméricas com comprimento em torno de 25 nm e, as setas pretas indicam oligômeros com comprimentos ≥ 50 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Importante salientar que, enquanto para o complexo *Ci*SEPT6/7/9 foram observados apenas oligômeros, para *Ci*SEPT2/6/7, além dos oligômeros, foram observados também longos filamentos (Figura 32).

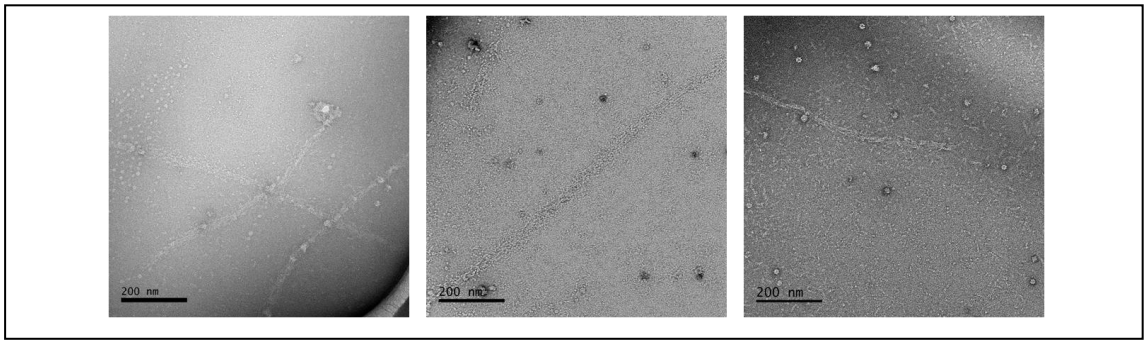


Figura 32 - Micrografia do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7 em tampão contendo 300Mm de NaCl. Imagens apresentando feixes lineares.

Fonte: Elaborada pela autora.

O complexo *Ci*SEPT2/6/7 quando analisado em relação a presença de nucleotídeos se mostrou ligado tanto a GDP quanto GTP. Desse modo, com base em estudos estruturais, assume-se que todas as subunidades de septinas desse heterocomplexo estejam ligadas a nucleotídeos, sendo as septinas 2 e 7 ligadas a GDP e a septina 6 ao GTP, conforme já discutido anteriormente (seção 4.4, Figura 25D).[79, 90] Com isso, tem-se que as interfaces que promovem interações via G se encontram favoráveis a polimerização, o que explica o fato de terem sido observados, além de oligômeros, a formação de filamentos. Este resultado isolado porém, não subsidia qualquer afirmação sobre qual é a interface responsável pelo alongamento do filamento, de modo que, a polimerização poderia ser o resultado de interações longitudinais via interface G entre duas subunidades de *Ci*SEPT7 ou ainda, por meio de interações via NC entre duas subunidades de *Ci*SEPT2 (Figura 33).

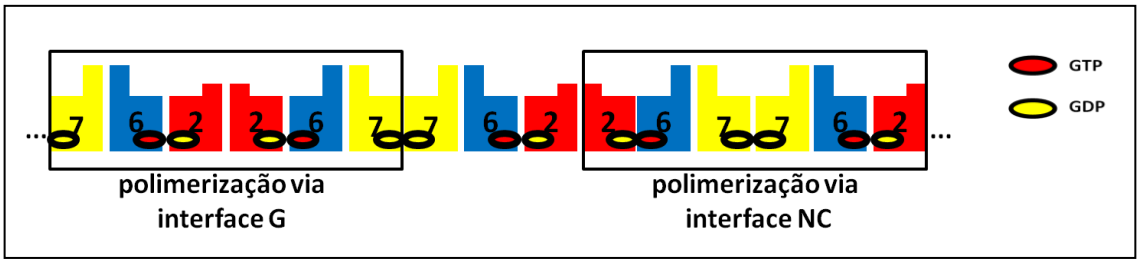


Figura 33 - Representação do filamento formado pelo heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7. As duas interfaces de polimerização possíveis estão evidenciadas pelas caixas pretas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos *in vivo* em *S. cerevisiae* reportaram que o heterocomplexo obtido na ausência da Cdc10, equivalente a *Ci*SEPT9, corresponde a um hexâmero com a septina correspondente a *Ci*SEPT2 na extremidade e, a septina Cdc3 (equivalente a *Ci*SEPT7), formando homodímeros via interface G no centro do oligômero (Figura 34A).[71] Assim, é possível que de forma similar, o heterocomplexo formado por *Ci*SEPT2/6/7 apresente em sua extremidade a interface NC de *Ci*SEPT2 exposta, sendo esta a subunidade responsável pela polimerização (Figura 34).

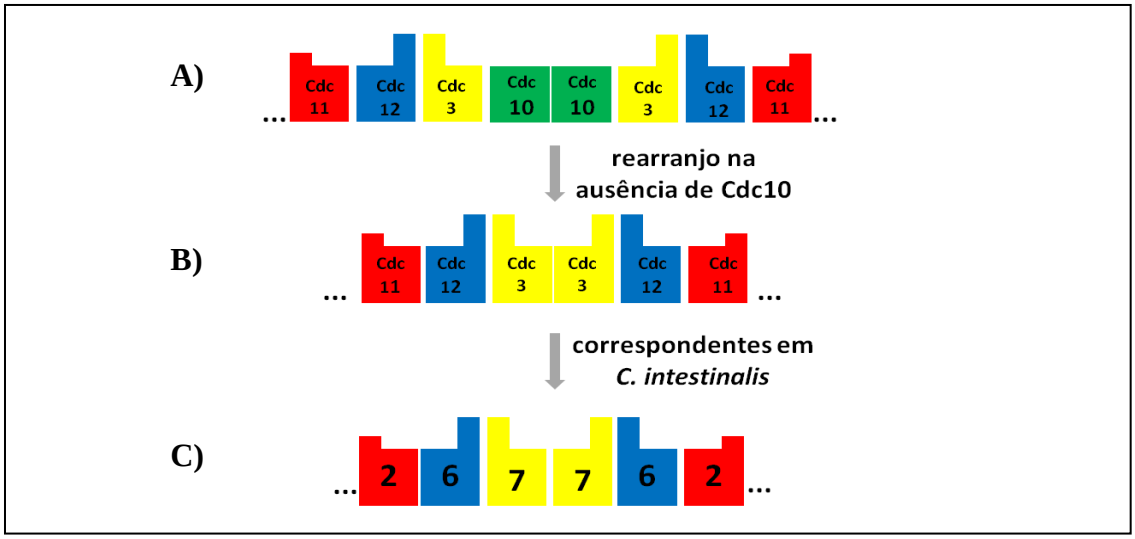


Figura 34 - Representação do hexâmero *Ci*SEPT2/6/7 apresentando *Ci*SEPT2 nas extremidades em comparação com leveduras. A) Complexo octamérico de *S. cerevisiae*. B) Complexo hexamérico de *S. cerevisiae* na ausência de Cdc10. C) Complexo hexamérico das septinas *Ci*SEPT2/6/7 de *C. intestinalis*

Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda, estudos envolvendo microscopia eletrônica de transmissão apontaram que o heterocomplexo hexamérico formado pelas septinas humanas SEPT2/6/7, as quais são ortólogas às septinas de *C. intetinalis*, se dispõem dentro do oligômero da mesma forma como foi observado em *S. cerevisiae*, ou seja, com a interface NC de SEPT2 exposta, sendo esta a responsável pela polimerização.[71, 80]

O fato de *Ci*SEPT6/7/9 não ser capaz de formar filamentos nas mesmas condições em que *Ci*SEPT2/6/7, reforça a hipótese de *Ci*SEPT2 na extremidade. Isso porque na ausência de *Ci*SEPT2, sabe-se que *Ci*SEPT6 não possui GTP ligado, como visto na seção 4.4 (Figura 25B). Desse modo, é possível que o arranjo desse heterocomplexo se dê de forma que a *Ci*SEPT6 esteja alocada nas extremidades do oligômero e, por estar na forma apo, não é capaz de interagir via interface G com outra septina, o que levaria a polimerização e consequente formação de filamentos (Figura 35). Reforçando esses dados, tem-se bem estabelecido que a ausência de nucleotídeo tem impacto na estabilidade das interações via interface G.[62, 90, 103]

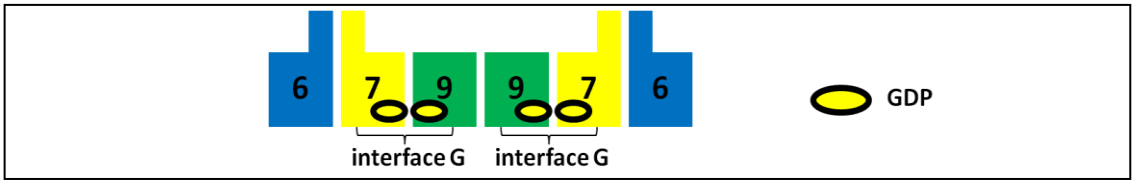


Figura 35 - Representação do heterocomplexo *Ci*SEPT6/7/9, identificando as prováveis posições das septinas e respectivos nucleotídeos ligados..

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando analisados em conjunto, esses resultados permitem uma discussão da relação entre a ausência de *Ci*SEPT2 na construção *Ci*SEPT6/7/9 e a ausência de filamentos. A observação de existir apenas hexâmeros e tetrâmeros quando a septina 2 não está presente sugere mais uma vez que esta ocupe a posição terminal do oligômero. Assim, as interações *Ci*SEPT2-*Ci*SEPT2 através de interações longitudinais com outro oligômero, via interface NC, seriam responsáveis pela formação de filamentos, como os observados em *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9. Além disso, como já discutido, o complexo octamérico relatado em leveduras apresenta em sua extremidade uma interface de ligação NC para o alongamento do filamento. Ainda em leveduras, a septina localizada no centro do complexo, Cdc10, está classificada no mesmo grupo que *Ci*SEPT9, compartilhando a característica de não possuir *coiled-coil*.[27, 36]

Resumindo, com base nesses resultados e nos dados disponíveis na literatura, assim como foi descrito recentemente para septinas humanas SEPT2/6/7,[80, 81] é possível que o arranjo das subunidades no heterocomplexo em *C. intestinalis* se dê de forma que *Ci*SEPT2 se posicione nas extremidades, enquanto *Ci*SEPT9 ocupe o centro do oligômero, como representado na Figura 36 a seguir:

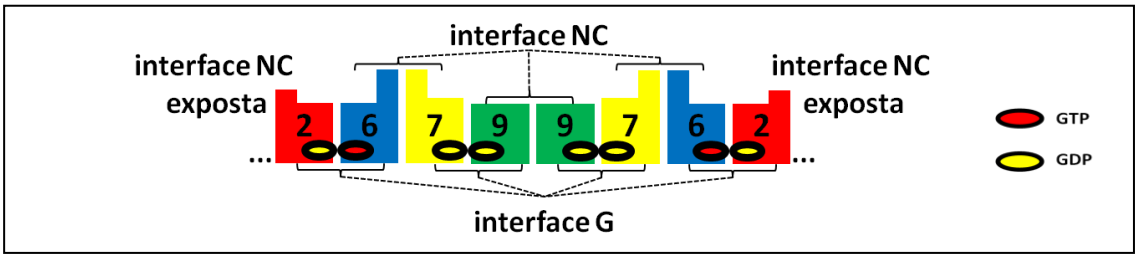


Figura 36 - Representação do heterocomplexo *Ci*SEPT2/6/7/9 com *Ci*SEPT2 nas extremidades e *Ci*SEPT9 no centro do oligômero.

Fonte: Elaborada pela autora.

Obviamente, para comprovar de forma definitiva as posições das septinas e a interface de polimerização, experimentos adicionais utilizando MET deverão ser realizados, por meio do emprego de anticorpos e/ou ainda utilizando proteínas de fusão, como proteína ligante de maltose (MBP), ligada à porção N-terminal de *Ci*SEPT2. Essa construção, em particular, já está disponível para os ensaios, tendo sido descrita no item 3.2.1.1. Para esse ensaio é necessário a obtenção de uma amostra composta por oligômeros, os quais deverão corresponder majoritariamente a hexâmeros para *Ci*SEPT2/6/7 e octâmeros para *Ci*SEPT2/6/7/9. Porém, já foi observado que mesmo quando sob altas concentrações de sal ambas construções são capazes de polimerizar e, assim, uma possibilidade para a determinação da posição das subunidades poderá ser aumentar ainda mais a concentração de sal visando a inibir a polimerização.

4.7 Ensaios de polimerização dos complexos *Ci*SEPT6/7/9, *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9 *in vitro*

Sabe-se que as septinas tendem a se polimerizar formando filamentos e estruturas de mais alta ordem sob baixas concentrações de sal.[50, 79, 113] No entanto, como descrito no item 4.6, observou-se que os complexos *Ci*SEPT2/6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7 de septinas de *C. intestinalis* são capazes, pelo menos em parte, de formar filamentos em 300mM de NaCl. Em virtude desse comportamento e buscando determinar as condições limite de sal para polimerização, amostras dos complexos *Ci*SEPT6/7/9, *Ci*SEPT2/6/7 e *Ci*SEPT2/6/7/9 foram preparadas em tampão com 800mM de NaCl e submetidas à diálise contra um tampão contendo 40 mM de NaCl.

Analisando inicialmente *Ci*SEPT6/7/9, observou-se que ao final da diálise, ao invés de filamentos, houve apenas a formação de agregados amorfos, os quais foram observados após 10 minutos do início da diálise (dados não mostrados). Esse resultado reforça a hipótese já discutida de que *Ci*SEPT6 apo é impedida de associar-se com outro oligômero via interface G, não permitindo que o complexo *Ci*SEPT6/7/9 se polimerize em filamentos.

O mesmo experimento foi realizado com *Ci*SEPT2/6/7, no qual se observou a formação de longos feixes de filamentos após 10 minutos de diálise. Esses se mantiveram estáveis, apresentando mesma morfologia e dimensões ao final de 30 minutos de diálise (Figura 37).

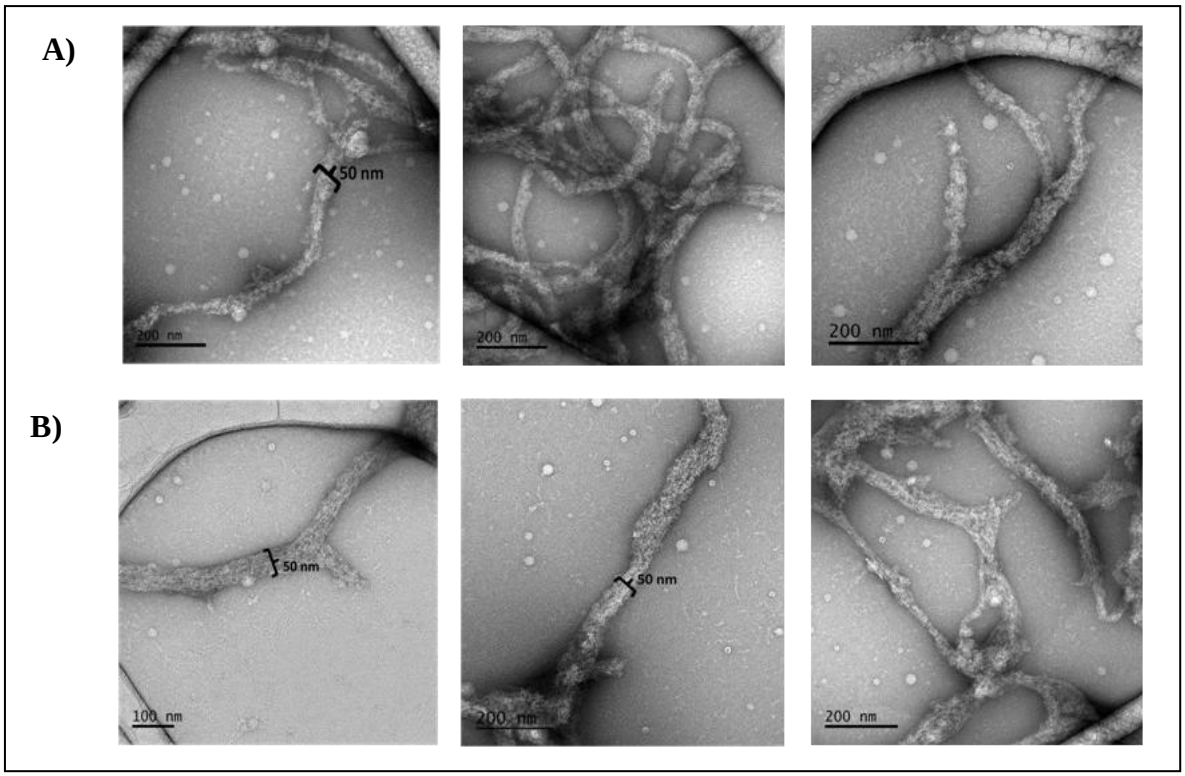


Figura 37 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7 a 800mM de NaCl. As imagens em A) e B) correspondem a micrografias da amostra após 10 e 30 minutos após a diálise, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os filamentos formados por *Ci*SEPT2/6/7 interagem entre si de modo a formar uma rede entrelaçada com diâmetro médio de 50 nm (Figura 37). Adicionalmente, observou-se a presença de inúmeros complexos correspondentes a hexâmeros e oligômeros maiores distribuídos pela grade.

Contrastando com essas estruturas, o complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 após os primeiros 10 minutos de diálise mostrou a formação de oligômeros de comprimentos variados, filamentos lineares e feixes muito organizados (Figura 38).

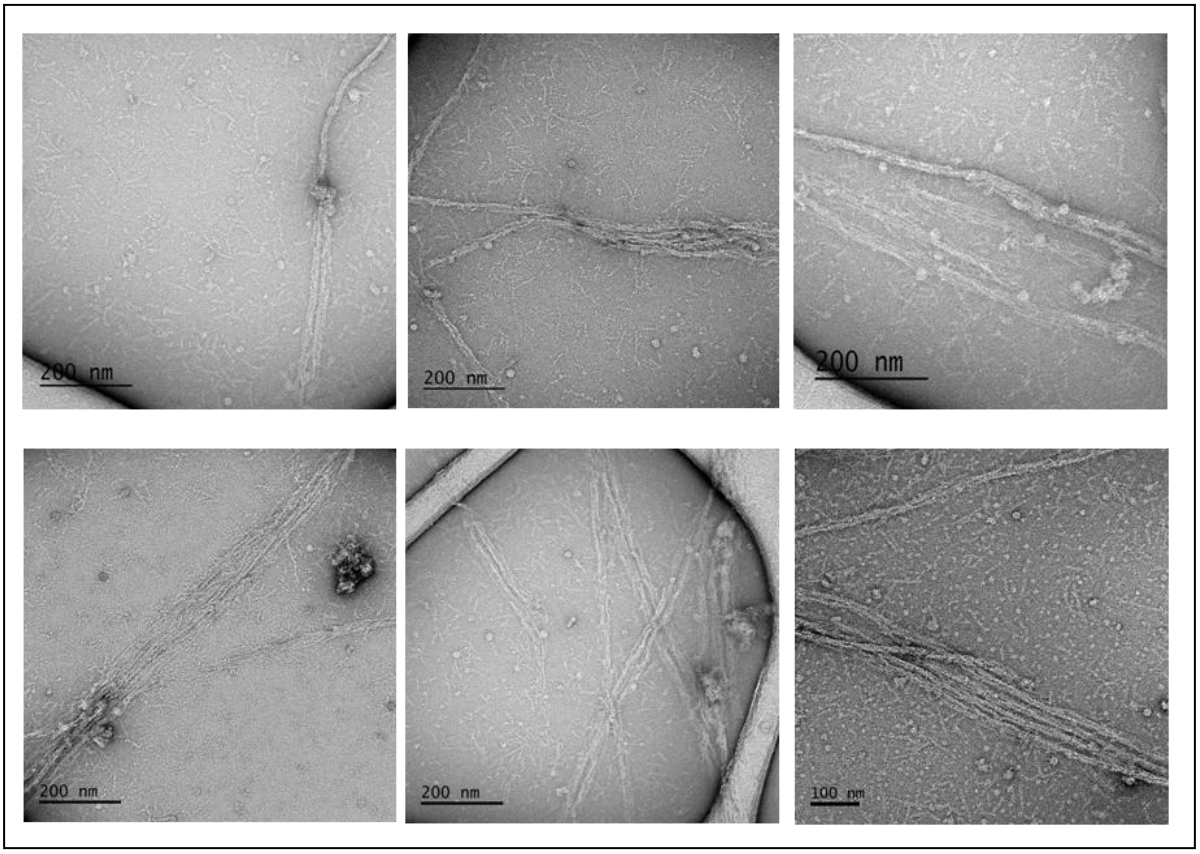


Figura 38 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7/9 a 800mM de NaCl após 10 minutos de diálise.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após 30 minutos de diálise, foram ainda observados filamentos longos, porém estes apresentavam-se pareados lateralmente unidos por pontes perpendiculares, a intervalos regulares de aproximadamente 20-25nm (Figura 39).

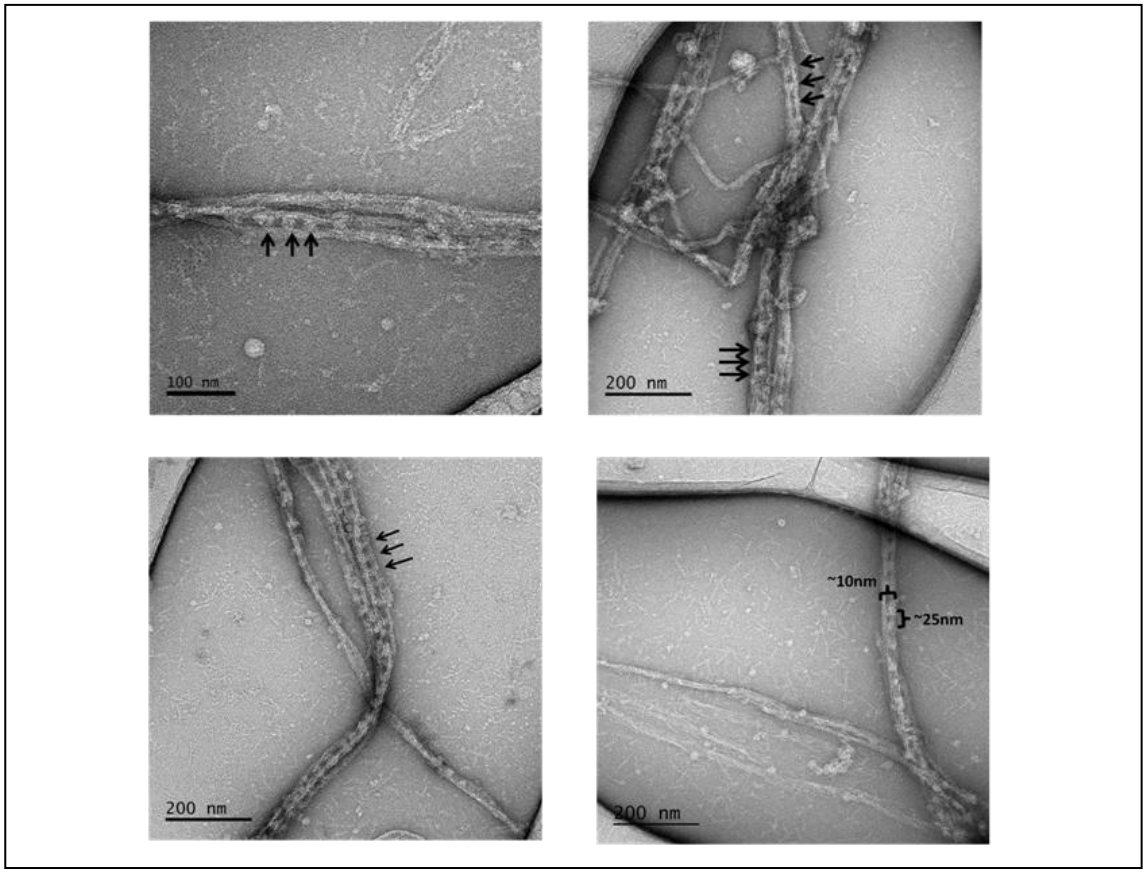


Figura 39 - Imagens das micrografias de *Ci*SEPT2/6/7/9 após 30 minutos de diálise.
Fonte: Elaborada pela autora.

Uma organização similar foi relatada para os filamentos formados pelos complexos octaméricos de *S. cerevisiae*, os quais foram nomeados "*railroad tracks"* ou, "trilhos de trem".[36] Nestes, segundo os autores, a associação lateral dos filamentos parece ser mediada pela interação entre os *coiled-coils* de Cdc3 e Cdc12 de cada filamento, os quais se projetam ortogonalmente de modo a interagir com os *coiled-coils* das mesmas subunidades do filamento adjacente (Figura 40A).

Traçando um paralelo ao que já foi descrito para o heterofilamentos de levedura, é possível que, de igual modo, em *C. intestinalis* a interação entre os *coiled-coils* de *Ci*SEPT6 e 7, intra e entre filamentos, seja responsável por mediar a formação dessa estrutura em forma de trilho de trem. Assim como foi observado para os filamentos de *S. cerevisiae*, em *C. intestinalis* os intervalos entre cada ponte apresentaram distâncias de aproximadamente 25nm, o que corresponderia ao comprimento de seis subunidades de septinas lado a lado.

A seguir, a Figura 40B ilustra um modelo de como se daria o arranjo do tipo trilho de trem nos filamentos proposto para as septinas de *C. intestinalis*.

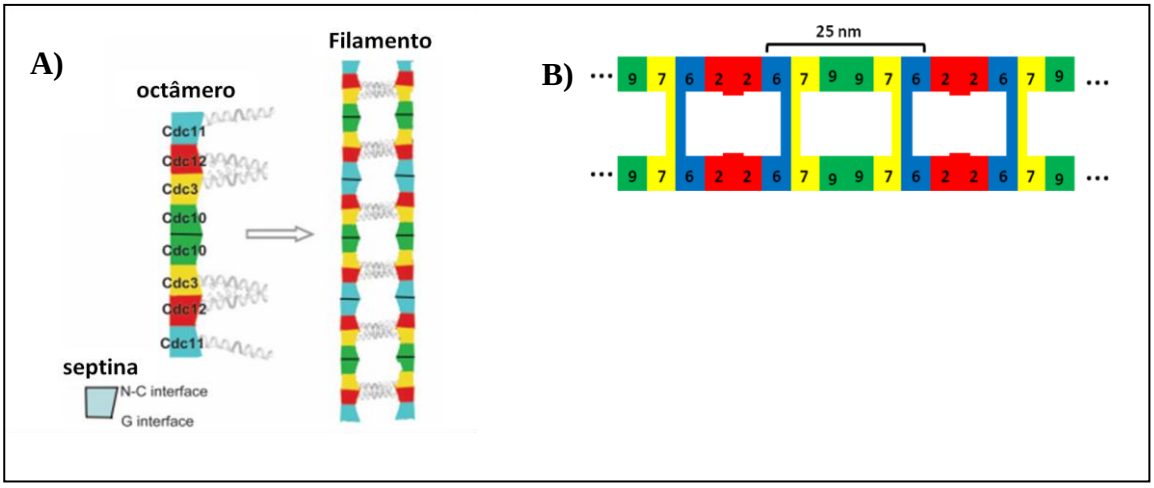


Figura 40 - Representação da estrutura do tipo trilho de trem. A) Estrutura proposta para o complexo de septinas de *S. cerevisiae* destacando a participação dos *coiled-coils*. B) Estrutura proposta para o complexo de septinas de *C. intestinalis.*

Fonte: a) Adaptada de BERTIN.[36] ; b) Elaborada pela autora.

Outro modelo possível para o arranjo das subunidades do heterocomplexo na formação de estruturas do tipo trilho de trem seria a partir da interação entre os *coiled-coils* de *Ci*SEPT2 de filamentos adjacentes. No modelo proposto por Bertin e colaboradores, apresentado na Figura 40A, os *coiled-coils* de Cdc3 e Cdc12 formariam tetrâmeros, mas em suas correspondentes em humanos, SEPT6 e SEPT7, resultados de ultracentrifugação analítica e *cross-linking* dos *coiled-coils* mostraram que esses domínios formam apenas dímeros.[114] Além disso, o mesmo trabalho obteve dados estruturais que mostram que os *coiled-coils* de SEPT4, representante humano membro do grupo III e ortólogo a *Ci*SEPT2, forma dímeros antiparalelos. Dessa forma, a associação lateral entre filamentos adjacentes se daria de tal modo que em ambos a região polibásica, responsável pela interação com membrana, estaria orientada no mesmo plano, possibilitando a interação direta com os fosfolipídeos (Figura 41).

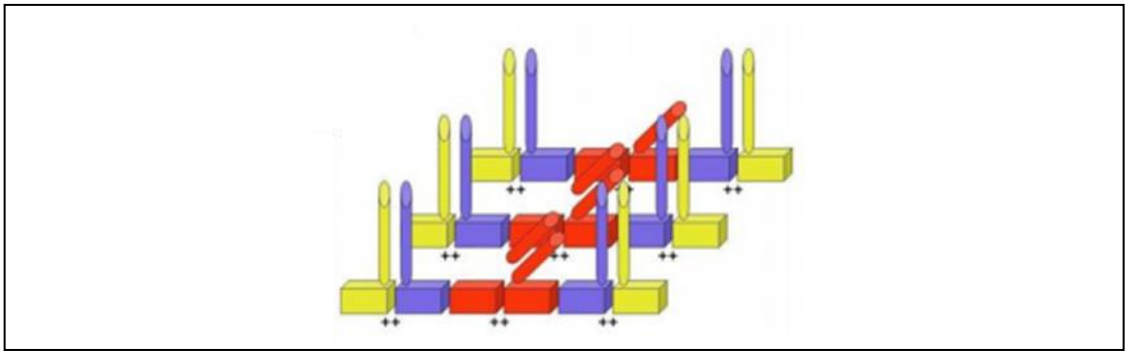


Figura 41 - Proposta para a estrutura formada pela interação dos *coiled-coils* das septinas do grupo III (em vermelho). Septinas 6 e 7 representadas em roxo e amarelo, respectivamente. No esquema, a região polibásica está representada pelo sinal +.

Fonte: Adaptada de MARQUES[114]

Novamente, experimentos para a determinação da posição dessas proteínas dentro do oligômero tal como descrito do item 4.6, bem como o emprego de versões truncadas para a avaliação da formação de filamentos, deverão auxiliar a desvendar quais subunidades e quais os domínios estão envolvidos na formação dessas "pontes" observadas. É importante pontuar que a formação de estruturas do tipo trilho de trem só foi observada para as septinas de *C. intestinalis* quando a *Ci*SEPT9 estava presente. No entanto, como se dá e qual a participação dessa subunidade na estabilização/formação dessas interações são questões que permanecem desconhecidas.

Já foi descrito que septinas interagem com lipídeos negativamente carregados, especialmente fosfoinositóis, através da região polibásica.[56] Além disso, essas proteínas são encontradas normalmente em regiões em que as membranas são altamente curvadas, como no septo no brotamento de leveduras e na base de dendritos e cílios, o que sugere que essas proteínas reconheçam ou influenciem mudanças na forma das membranas.[13, 115-117]

Assim, tendo obtido uma amostra estável do heterocomplexo formado pelas 4 septinas de *C. intestinalis*, foram realizadas análises envolvendo sistemas biomiméticos de membrana na intenção de avaliar a especificidade de interação desses complexos com fosfolipídeos. Esse estudo, realizado em colaboração com a mestranda Marina G. Fontes, evidenciou a interação preferencial com os fosfolipídeos negativamente carregados fosfatidilserina (PS) e fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) apresentando maior afinidade por membranas com diâmetro médio de 1µm (dados não mostrados), assim como já reportado para complexos de septinas de humanos e fungos.[117]

Trabalhos empregando vesículas gigantes unilamelares mostraram que complexos de septinas, tanto de humanos quanto de levedura, induziram a formação de túbulos, sendo esse um indício da habilidade dessas proteínas levarem a mudanças na curvatura na membrana.[58, 118] Assim, experimentos complementares usando sistemas biomiméticos poderão auxiliar na elucidação da participação de septinas no remodelamento da membrana plasmática fornecendo informações adicionais da função dessas proteínas.

4.8 Avaliação da afinidade entre as subunidades (MST)

Tendo observado por MET que essas proteínas interagem entre si na forma de um heterocomplexo octamérico, idealizou-se este ensaio visando analisar a força da interação entre septinas por duas interfaces diferentes, sendo uma mediada pela interação via interface G e outra via interface NC. Todas as análises foram realizadas considerando que o arranjo das septinas de *C. intestinalis* se daria igual ao observado para suas correspondentes ortólogas em humanos no complexo SEPT2/6/7/9 (Figura 42).[81]

Nesse estudo foram analisadas a interface G, formada pela interação entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6 e a interface NC formada pelas septinas *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7. Detalhes das amostras utilizadas, como presença de nucleotídeo endógeno, posição proposta dentro do heterocomplexo e qual a subunidade foi marcada com o fluoróforo, estão ilustrados na Figura 42.

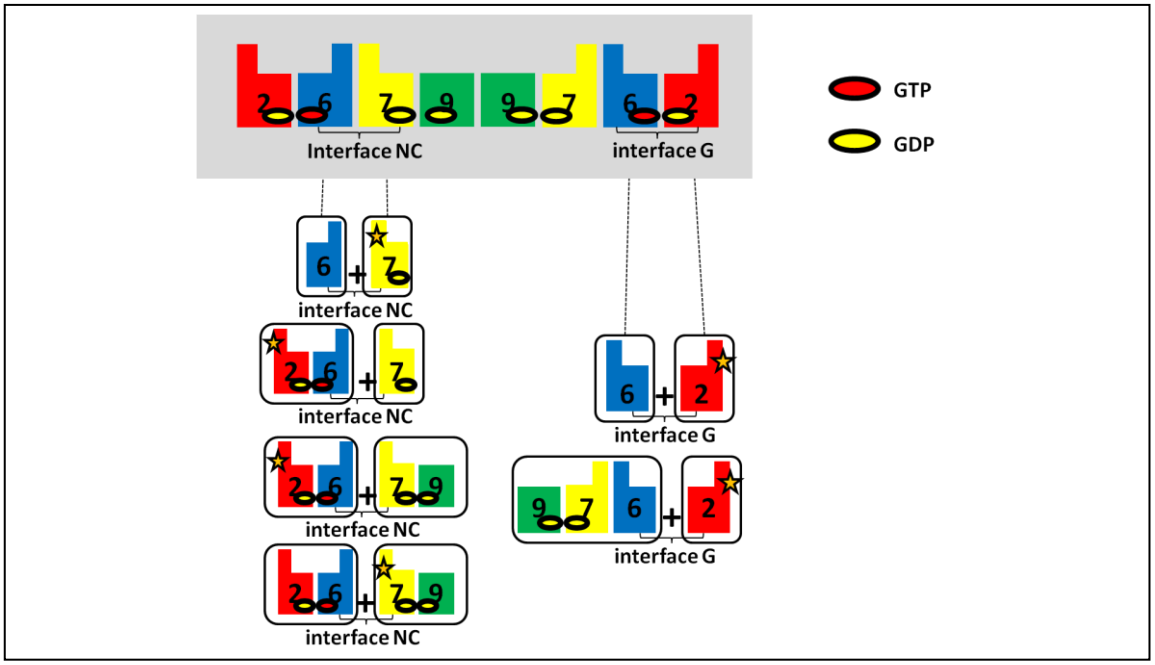


Figura 42 - Construções utilizadas na avaliação das interações entre as subunidades de septinas. A estrela indica quais são as septinas marcadas com o fluoróforo em cada experimento, enquanto as elipses vermelhas e amarelas indicam a presença de GTP e GDP, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Experimentos controles na presença de nucleotídeos foram realizados para certificação de que as constantes de dissociação observadas traduziam a interação entre as subunidades e não a dimerização da proteína marcada em função da adição do nucleotídeo. Nestes controles, a proteína marcada foi adicionada a diferentes concentrações dos nucleotídeos GTP e GDP, separadamente, incubadas por 15 minutos a 23 ºC e então submetidas a análise de MST nas mesmas condições descritas no item 3.8.

Com exceção de *Ci*SEPT7, que apresentou K_D na ordem de mM com GDP, todas as amostras analisadas não apresentaram alteração detectável pela adição do nucleotídeo. Assim, esses ensaios controle confirmam que as constantes de dissociação obtidas nas análises anteriores são decorrentes da interação entre as subunidades de septinas. Os resultados obtidos dessas análises estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados sumarizados dos experimentos que compreendem o controle negativo de dimerização. Na figura os tracejado em vermelho indicam a ausência de mudança na fluorescência.

Construções	K_D (mM)
2* + GDP	--
2* + GTP	--
6* + GDP	--
6* + GTP	--
7* + GDP	2,05 (+/- 0,56)
7* + GTP	--

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.1 Avaliação das interações via interface G formada entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6

*Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6 quando coexpressas mostraram interagir entre si e estar ligadas aos nucleotídeos, diferentemente de quando produzidas isoladamente, sendo um forte indicativo que a interface de interação envolvida é de fato a interface G, como ocorre com SEPT2 e SEPT6 humanas. Assim, sabendo que *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6 são obtidas na forma apo e, ainda, que o estado do nucleotídeo tem consequências nas interações mediadas pela interface G, foram realizados experimentos de termoforese em microescala (MST) comparativos, sendo eles: na ausência de nucleotídeo, adicionando apenas GTP ou GDP.

A análise dos resultados mostrou que, a afinidade entre essas duas septinas é aumentada na presença de ambos nucleotídeos, principalmente de GDP (Figura 43, Tabela 6), concordando com o envolvimento da interface G na interação. Além disso, a baixa afinidade observada na ausência de nucleotídeos, K_D da ordem de 2µM, deve-se provavelmente ao fato já discutido relacionado à dependência do ligante para a adoção de uma conformação que favoreça a dimerização. Corroborando esses dados, um estudo da análise da formação de heterodímeros já havia mostrado que apenas a ligação ao GDP era suficiente para estabilizar a interação entre SEPT2 e SEPT6, as correspondentes ortólogas em humanos.[119]

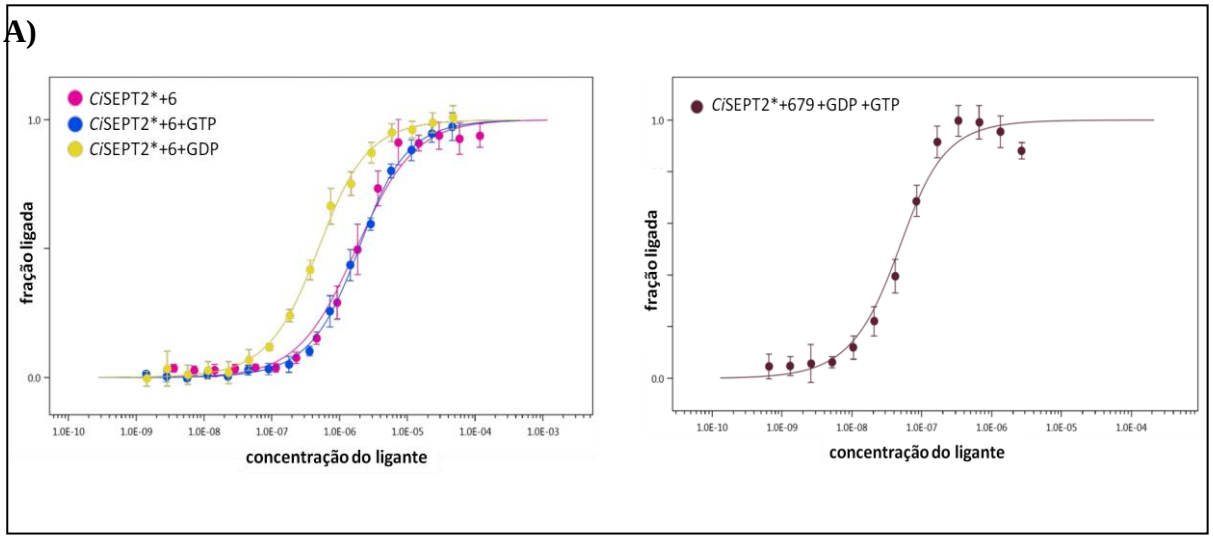
As septinas do grupo II são obtidas na forma apo, e já foi relatado que estas só são capazes de ligar o nucleotídeo na presença de seu parceiro fisiológico.[120] Adicionalmente, tendo visto que apenas a adição de GDP já se mostra suficiente para estabilizar a interação

entre *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT2, sugere-se que a mudança conformacional ocasionada pela ligação ao nucleotídeo pela *Ci*SEPT2 seja o gatilho para a interação entre essas duas septinas.[119, 120]

Ainda focando a interface G, analisou-se a interação de *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6, quando esta última já se encontrava complexada a outros parceiros de interação, no caso, no heterocomplexo *Ci*SEPT6/7/9.

Como visto, este heterocomplexo está arranjado predominantemente como um hexâmero, de modo que *Ci*SEPT6 se apresenta na forma apo. Tendo visto que a interação entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6 é potencializada quando na presença de nucleotídeos, os ensaios para análise dessa interação foram realizados nessa condição, na proporção de 10:1 (nucleotídeo : proteína não marcada). Assim, observou-se um aumento significativo na força de interação entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6, a qual apresentou uma constante de dissociação na ordem de 30nM nesse caso. Esse resultado, aponta que, quando complexada a outras subunidades, *Ci*SEPT6 mostra-se mais afim de interagir com *Ci*SEPT2.

Além dos gráficos contendo as curvas de interação, os gráficos da termoforese estão apresentados também na Figura 43. Nestes, a fluorescência de cada capilar é medida em tempo real permitindo o monitoramento da fluorescência relativa de modo que, quando há interação observa-se mudança na termoforese, evidenciada pelo retardo no decaimento dos valores de fluorescência relativa em função do aumento da concentração do ligante.



(Continua)

(Continuação)

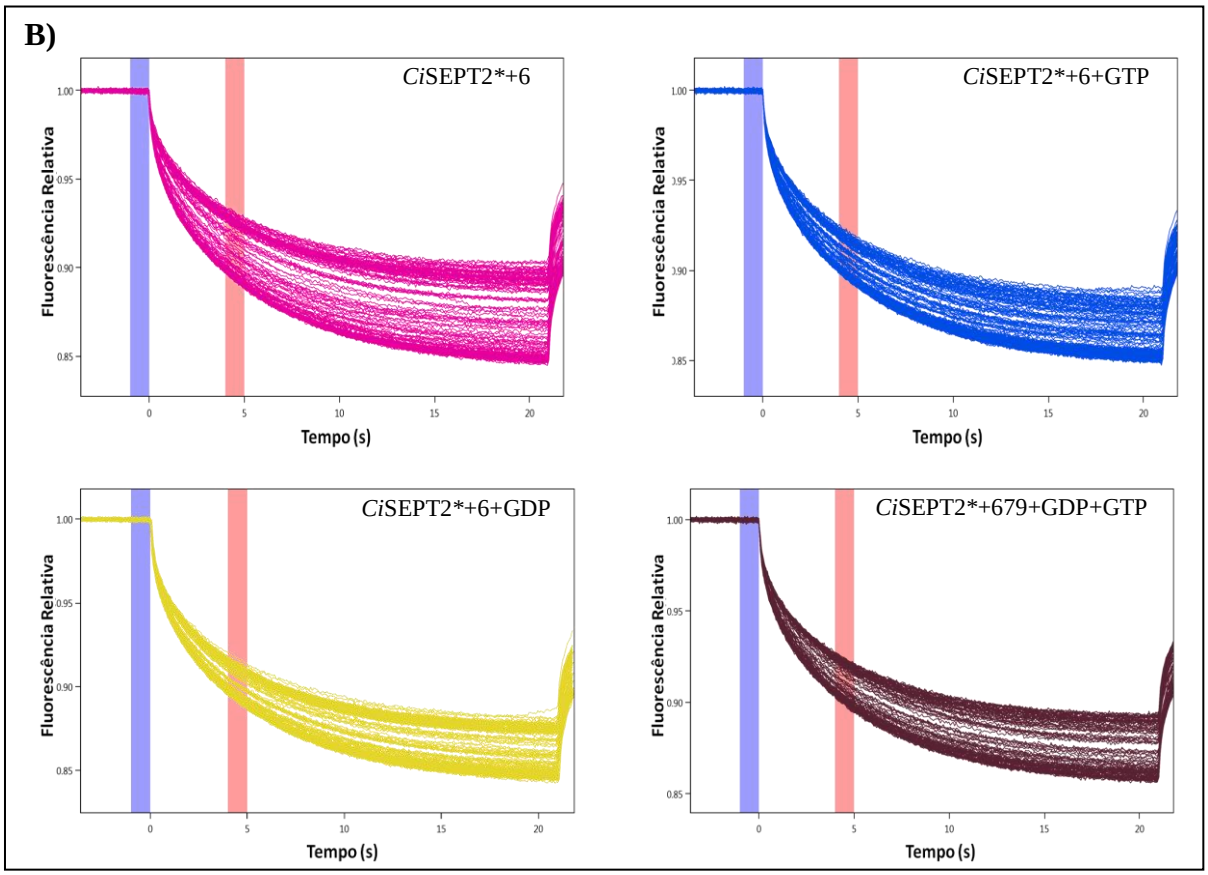


Figura 43 - Curvas de interação envolvendo a interface G mediada por *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6. A) Sobreposição das curvas da fração ligada por concentração do ligante. Cada ponto da curva representa os dados sobrepostos das medidas de um capilar analisado. B) Sobreposição das curvas de termoforese por tempo indicando variação da fluorescência relativa na formação do complexo. Nas legendas de cada gráfico, o asterisco indica a amostra acoplada à sonda fluorescente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface G entre *Ci*SEPT2 e *Ci*SEPT6.

Construções	K_D (µM)	Amplitude
***Ci*SEPT2* + 6**	1,741±0,251	36,5
***Ci*SEPT2* + 6 + GDP**	0,149 ±0,071	19,5
***Ci*SEPT2* + 6 + GTP**	1,279 ±0,213	23,5
***Ci*SEPT2* + 6/7/9 + GDP + GTP**	0,027 ±0,008	22,8

Fonte: Elaborada pela autora.

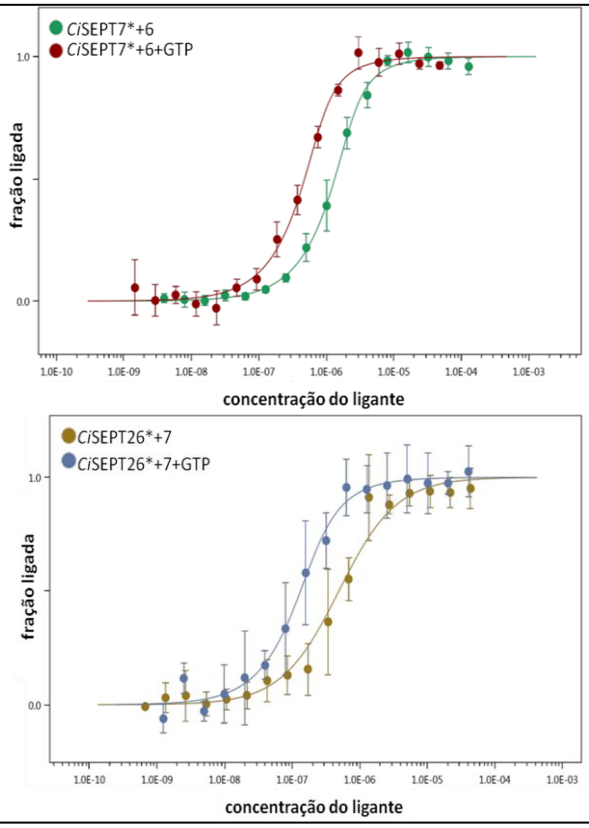
4.8.2 Avaliação das interações via interface NC formada por *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7

Novamente, a técnica de termoforese em microescala foi utilizada, desta vez no estudo da interface NC. Uma vez que *Ci*SEPT7 já se apresentava ligada ao GDP e *Ci*SEPT6 se encontra na forma apo, foram realizados ensaios em apenas duas condições: sem adição de nucleotídeo e adicionando GTP somente, já que *Ci*SEPT6 não é cataliticamente ativa.

A análise da interação entre *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 via interface NC, na ausência de GTP, apresentou um valor de K_D da ordem de 300nM, indicando alta afinidade. Resultados semelhantes foram reportados para suas correspondentes em humanos, as quais apresentaram constantes de dissociação também na ordem de nanomolar.[95]

Observou-se que na presença de GTP os valores observados para a constante de dissociação foram ainda menores, indicando que embora esteja oposta à NC, a ligação de nucleotídeos na interface G de alguma forma influencia na estabilização dos heteroligômeros, ainda que não participe diretamente da interação (Figura 44, Tabela 7).[62, 88] Além disso, o fato de se obter uma constante de dissociação que indica interação mais forte na presença de GTP pode ser resultado das subunidades de *Ci*SEPT7não estarem saturadas antes da adição do nucleotídeo, o que de fato foi observado nos experimentos de teor de nucleotídeo.

A)



(Continua)

(Continuação)

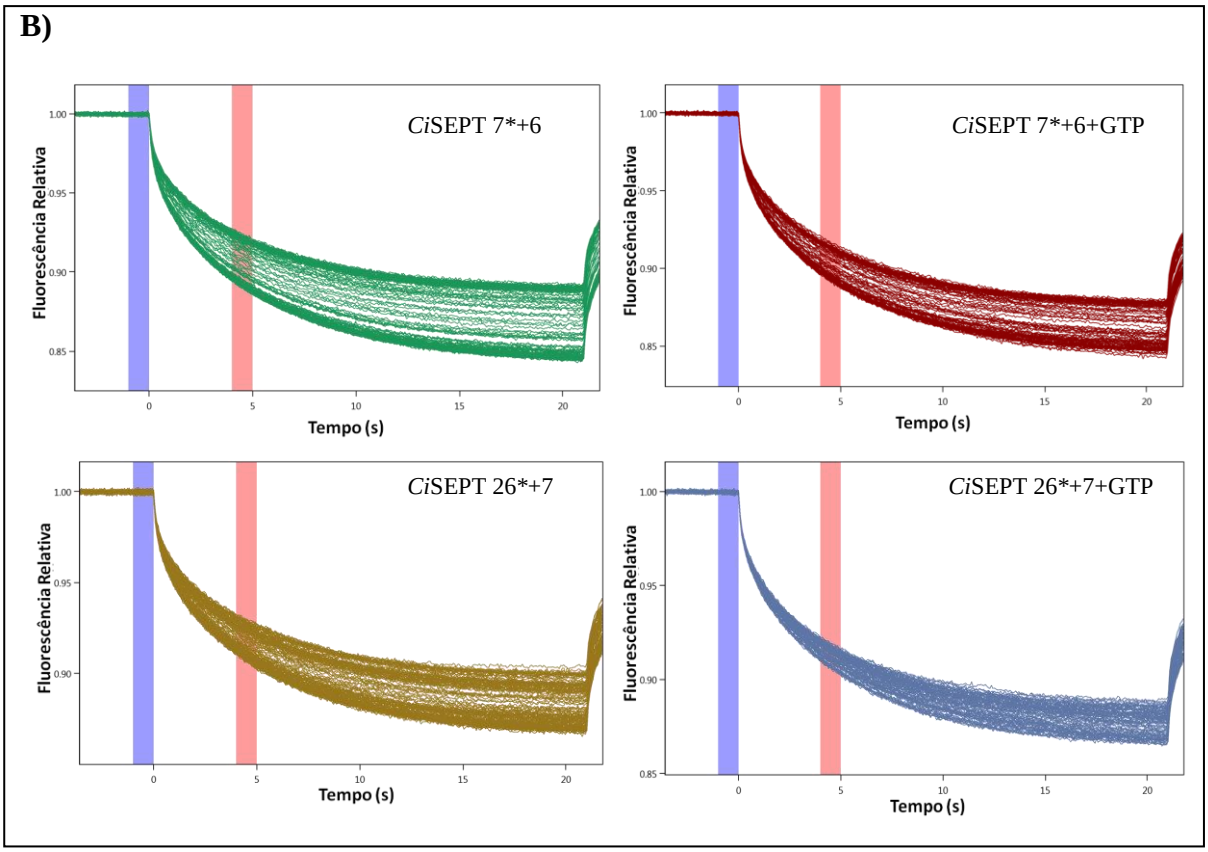


Figura 44 - Curvas de interação envolvendo a interface NC mediada por *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7. A) Sobreposição das curvas da fração ligada por concentração do ligante.Cada ponto da curva representa os dados sobrepostos das medidas de um capilar analisado. B) Sobreposição das curvas de termoforese por tempo indicando variação da fluorescência relativa na formação do complexo. Nas legendas de cada gráfico, o asterisco indica a amostra na qual foi acoplada a sonda fluorescente.

Fonte: Elaborada pela autora.

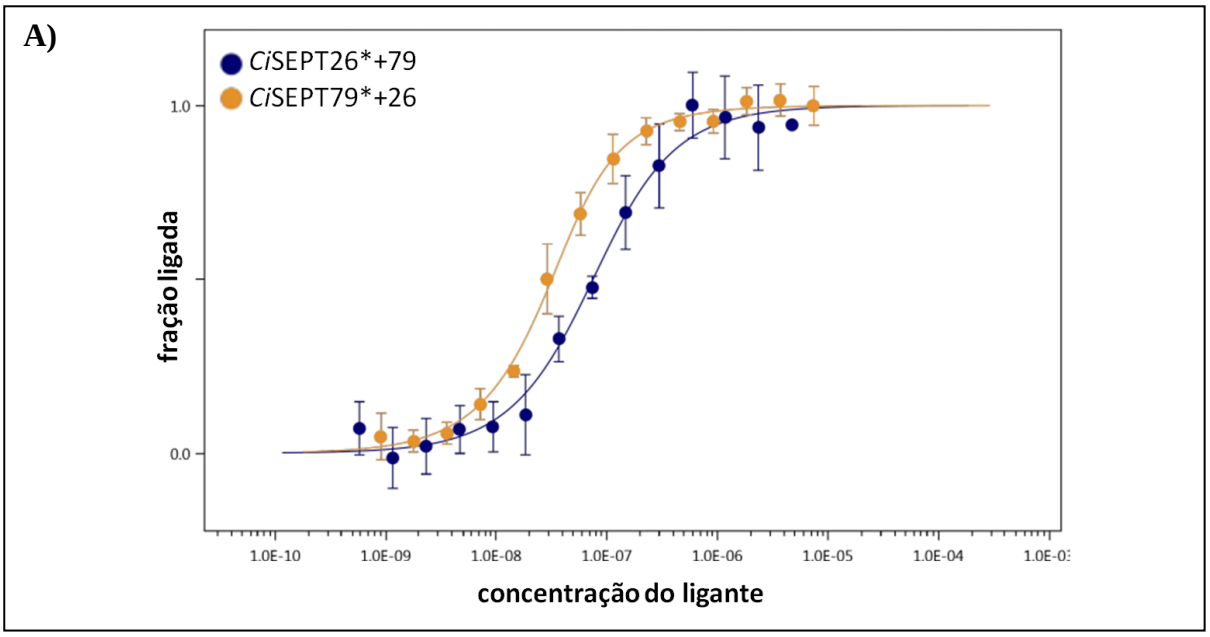
Tabela 7 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface NC entre *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7.

Construções	K_D (nM)	Amplitude
***Ci*SEPT7* + 6**	314,0 ±0,9	30,7
***Ci*SEPT7* + 6 + GTP**	115,0±0,5	20,4
***Ci*SEPT2/6* + 7**	477,0 ±0,8	17,7
***Ci*SEPT2/6* + 7 + GTP**	60,7 ±2,6	7,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando a interface NC de interação entre *Ci*SEPT6 e *Ci*SEPT7 foi analisada utilizando os dois complexos tetraméricos (*Ci*SEPT2/6 e *Ci*SEPT7/9), independente da subunidade marcada, as constantes de dissociação obtidas são baixas, na ordem de dezenas de nM. Uma vez que a sonda interage por interações fracas ao His-tag, na Tabela 8, no caso do primeiro experimento, cuja marcação foi feita no complexo *Ci*SEPT2/6 e titulado o *Ci*SEPT7/9, o valor de K_D obtido pode ter sido influenciado pela presença de His-tag em ambos complexos, justificando as diferenças observadas entre os dois resultados mostrados na tabela. De qualquer forma, os dados confirmam que quando já complexada com um parceiro de interação (no caso, *Ci*SEPT2 complexada via interface G com *Ci*SEPT6 e, *Ci*SEPT7 complexada via interface G com *Ci*SEPT9), esses complexos apresentam maior afinidade entre si para interagirem via interface NC.

Deve-se notar que em todas a situações analisadas de adição de um monômero a um oligômero, a força de interação obtida foi mais alta (menores K_Ds), na ordem de nM. Assim, esses resultados sugerem que os oligômeros possam atuar como fatores de nucleação para a montagem do heterocomplexo. Além disso, é certo que os nucleotídeos tenham um papel fundamental e direto na formação da interface G, mas sua atuação exata na montagem dos filamentos ainda carece de experimentos adicionais para que seja totalmente esclarecida.



(Continua)

(Continuação)

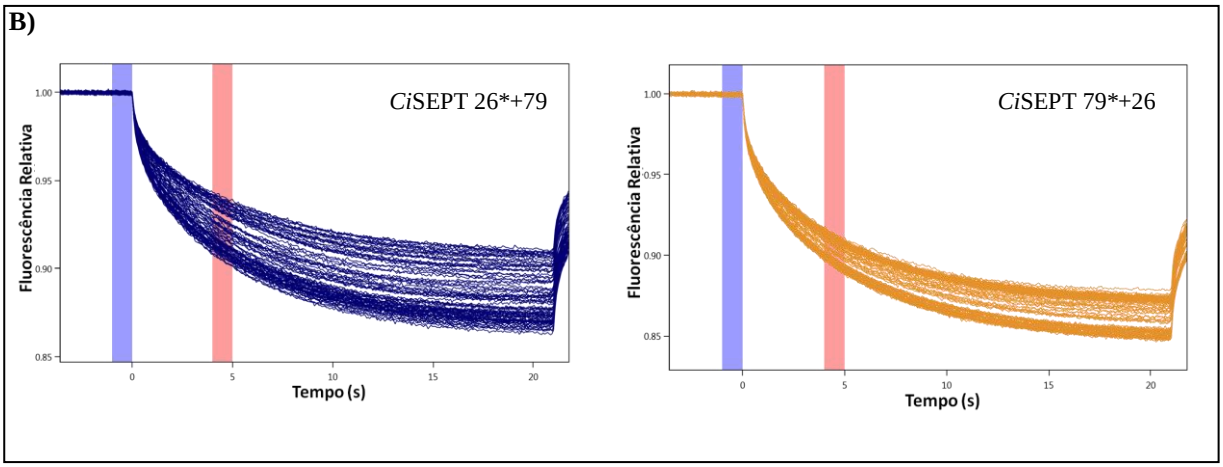


Figura 45 - Curvas de interação envolvendo a interface NC mediada pelos heterotetrâmeros formados por *Ci*SEPT2/6 e *Ci*SEPT7/9. A) Sobreposição das curvas da fração ligada por concentração do ligante.Cada ponto da curva representa os dados sobrepostos das medidas de um capilar analisado. . B) Sobreposição das curvas de termoforese por tempo indicando variação da fluorescência relativa na formação do complexo. Nas legendas de cada gráfico, o asterisco indica a amostra na qual foi acoplada a sonda fluorescente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Dados sumarizados dos experimentos de interação envolvendo a interface NC entre complexos tetraméricos.

Construções	K_D (nM)	Amplitude
***Ci*SEPT2/6* + 7/9**	15,0 ±1,0	28,5
***Ci*SEPT7/9* +2/6**	55,0 ±0,3	17,88

Fonte: Elaborada pela autora.

Dito isso, é possível que exista uma ordem sequencial de interação na montagem do heterocomplexo de forma que as interações via domínio G se dariam primeiro, levando a formação dos pares. Esses, por sua vez, desencadeados por alterações conformacionais nas interfaces G e NC, promoveriam a interação desses pares, resultando assim na formação do heterocomplexo octamérico. No entanto essa hipótese precisa ser melhor avaliada.

5 CONCLUSÕES

Análises de bioinformática da estrutura primária das septinas de *C. intestinalis* levaram a identificação dos elementos típicos de uma septina, incluindo resíduos conservados importantes para ligação e hidrólise do nucleotídeo. Ainda, mostraram que a maior conservação em relação as proteínas ortólogas está no domínio G.

As CDSs foram expressas de forma heteróloga e purificadas, permitindo que fossem empregadas em análises bioquímicas e biofísicas. Tais análises revelaram que tanto *Ci*SEPT2 quanto *Ci*SEPT7 apresentavam atividade catalítica, enquanto *Ci*SEPT6, como já era esperado, mostrou-se incapaz de hidrolisar GTP. *Ci*SEPT9 que apresentou-se pouco solúvel e bastante instável quando expressa isoladamente, foi obtida na forma solúvel apenas quando co-expressa e co-purificada com sua parceira de interação, *Ci*SEPT7. Essa mudança no comportamento de *Ci*SEPT9 corrobora a ideia de septinas ganharem estabilidade na presença de seus parceiros.

Em concordância com os dados obtidos em relação à presença de nucleotídeo, a avaliação do estado oligomérico dos heterocomplexos parciais demonstrou que estes correspondem majoritariamente a tetrâmeros e hexâmeros quando formados por duas ou três subunidades, respectivamente. Esses oligômeros mostraram-se dispostos na forma de um bastão quando analisados por microscopia eletrônica de transmissão. No caso do heterocomplexo incluindo as quatro septinas, oligômeros de vários tamanhos foram observados e mesmo sob altas concentrações de sal esse complexo foi capaz de polimerizar-se, levando a formação de filamentos e feixes.

Ensaios de polimerização dos complexos, realizados a partir de diálise e analisados por microscopia eletrônica de transmissão, apontaram que a polimerização é dependente da presença de *Ci*SEPT2. Este fato sugere que possivelmente *Ci*SEPT2 esteja posicionada na extremidade do oligômero, de acordo com o complexo mostrado em leveduras. Ainda, foi observado que o complexo *Ci*SEPT2/6/7/9, forma filamentos de mais alta ordem de organização, os quais são capazes de interagir lateralmente, provavelmente via *coiled-coil*, entre filamentos adjacentes, formando estruturas do tipo trilhos de trem similares às já observadas em *S. cerevisiae*.

Novas análises de MET do heterocomplexo com as quatro septinas deverão ser realizadas, dessa vez empregando uma construção de *Ci*SEPT2 fusionada à MBP que funcionará como *tag* para determinação da posição dessa proteína dentro do oligômero. Ainda, análises envolvendo o emprego das subunidades truncadas na região do C-terminal deverão auxiliar no esclarecimento de como se dão as interações laterais entre filamentos adjacentes que levam a formação de estruturas do tipo trilho de trem como as observadas nesse trabalho.

Por fim, as análises de MST revelaram maior afinidade de interação entre subunidades e oligômeros pré-formados, sugerindo que as subunidades quando já complexadas, possam atuar como fator de nucleação para a montagem do heterocomplexo. Esse resultado aponta para a potencial existência de uma ordem para a formação do heterocomplexo, de forma que as interações via NC só seriam formadas após a estabilização da interface G. Experimentos adicionais deverão ser realizados para examinar a atuação dos nucleotídeos na formação da interface G e consequente influência na montagem dos oligômeros.

Em síntese, esse trabalho apresenta os primeiros estudos de caracterização das septinas de *C. intestinalis* mostrando a formação do heterocomplexo e sua relação com a presença de nucleotídeos, representando um modelo simplificado e viável para estudos estruturais relativos aos filamentos de septinas. Assim, através de uma abordagem comparativa com complexos oriundos de outros organismos, este modelo poderá contribuir para a compreensão do mecanismo de montagem e controle da polimerização de septinas.

REFERÊNCIAS

1 HARTWELL, L. H. Genetic control of cell division cycle in yeast .4. genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research,** v. 69, n. 2, p. 265, 1971.

2 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of cell-division cycle in yeast .1. detection of mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 66, n. 2, p. 352,1970.

3 HARTWELL, L. H. et al. Genetic-control of cell-division cycle in yeast. **Science,** v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974.

4 SANDERS, S. L.; FIELD, C. M. Cell division - septins in common. **Current Biology,** v. 4, n. 10, p. 907-910, 1994.

5 BYERS, B.; GOETSCH, L. Highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology,** v. 69, n. 3, p. 717-721, 1976.

6 HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the Saccharomyces cerevisiae CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular Cell Biology,** v. 7, n. 10, p. 3678-87, 1987.

7 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Current Opinion Microbiology,** v. 4, n. 6, p. 681-9, 2001.

8 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. **Journal of Cell Biology,** v. 112, n. 4, p. 535-44, 1991.

9 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? **Trends in Cell Biology,** v. 9, n. 10, p. 387-394, Oct 1999.

10 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 9, n. 6, p. 478-489, 2008.

11 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.

12 TADA, T. et al. Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology,** v. 17, n. 20, p. 1752-1758, 2007.

13 HU, Q. C. 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.

14 CAUDRON, F.; BARRAL, Y. Septins and the lateral Ccmpartmentalization of ekaryotic membranes. **Developmental Cell,** v. 16, n. 4, p. 493-506, 2009.

15 FINGER, F. P.; KOPISH, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in C-elegans. **Developmental Biology,** v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.

16 IHARA, M. et al. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity. **Neuron,** v. 53, n. 4, p. 519-533, 2007.

17 IHARA, M. et al. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell,** v. 8, n. 3, p. 343-352, 2005.

18 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.

19 STEELS, J. D. et al. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. **Cell Motility and the Cytoskeleton,** v. 64, n. 10, p. 794-807, 2007.

20 BARRAL, Y. et al. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. **Molecular Cell,** v. 5, n. 5, p. 841-851, 2000.

21 TAKIZAWA, P. A. et al. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. **Science,** v. 290, n. 5490, p. 341-344, 2000.

22 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 13, n. 3, p. 183-194, 2012.

23 AKHMETOVA, K. A.; CHESNOKOV, I. N.; FEDOROVA, S. A. Functional characterization of septin complexes. **Molecular Biology,** v. 52, n. 2, p. 137-150, 2018.

24 ANGELIS, D.; SPILIOTIS, E. T. Septin mutations in human cancers. **Frontiers in Cell and Developmental Biology,** v. 4, p. 122, 2016. doi:10.3389/fcell.2016.00122.

25 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. The pathobiology of the septin gene family. **Journal of Pathology,** v. 204, n. 4, p. 489-505, Nov. 2004.

26 IHARA, M. et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry,** v. 278, n. 26, p. 24095-24102, 2003.

27 PAN, F. F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology,** v. 7, 2007. doi: 10.1186/1471-2148-7-103.

28 DIDOMENICO, B. J. et al. Homologs of the yeast neck filament-associated genes - isolation and sequence-analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. **Molecular & General Genetics,** v. 242, n. 6, p. 689-698, 1994.

29 HARRIS, S. D.; MORRELL, J. L.; HAMER, J. E. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. **Genetics,** v. 136, n. 2, p. 517-532, 1994.

30 NGUYEN, T. Q. et al. The *C.elegans* septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **Journal of Cell Science,** v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000.

31 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.

32 NAKATSURU, S.; SUDO, K.; NAKAMURA, Y. Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Sccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 202, n. 1, p. 82-87, 1994.

33 MORI, T. et al. Isolation and mapping of a human gene (DIFF6) homologous to yeast CDC3, CDC10, CDC11, and CDC12, and mouse Diff6. **Cytogenetics and Cell Genetics,** v. 73, n. 3, p. 224-227, 1996.

34 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.

35 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.

36 BERTIN, A. et al. Saccharomyces cerevisiae septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.

37 SULSTON, J. E.; HORVITZ, H. R. Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Development Biology,** v. 82, n. 1, p. 41-55, 1981.

38 WHITE, J. G.; HORVITZ, H. R.; SULSTON, J. E. Neurone differentiation in cell lineage mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Nature,** v. 297, n. 5867, p. 584-7, 1982.

39 MADDOX, A. S. et al. Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow. **Developmental Cell,** v. 12, n. 5, p. 827-835, 2007.

40 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. **Cell,** v. 77, n. 3, p. 371-379, 1994.

41 WLOGA, D. et al. Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. **Eukaryotic Cell,** v. 7, n. 8, p. 1373-1386, 2008.

42 AURY, J. M. et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. **Nature,** v. 444, n. 7116, p. 171-178, 2006.

43 EISEN, J. A. et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. **Plos Biology,** v. 4, n. 9, p. 1620-1642, 2006.

44 CAO, L. H. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **Febs Letters,** v. 581, n. 28, p. 5526-5532, 2007.

45 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.

46 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.

47 VALADARES, N. F. et al. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews,** v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017.

48 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.

49 ZERAIK, A. E. et al. Septins of Platyhelminths: identification, phylogeny, expression and localization among developmental stages of *Schistosoma mansoni*. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 7, n. 12, p. 22602, 2013.

50 PINTO, A. P. A. et al. Filaments and fingers: Novel structural aspects of the single septin from Chlamydomonas reinhardtii. **Journal of Biological Chemistry,** v. 292, n. 26, p. 10899-10911, 2017.

51 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.

52 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.

53 SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop - a common motif in ATP-binding and GTP-binding proteins. **Trends in Biochemical Sciences,** v. 15, n. 11, p. 430-434, 1990.

54 NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The Mammalian septin interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology,** v. 5, p. 3, 2017. doi: 10.3389/fcell.2017.00003.

55 BERTIN, A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology,** v. 404, n. 4, p. 711-731, 2010.

56 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology,** v. 9, n. 24, p. 1458-67, 1999.

57 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.

58 TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHIL, K. Septin-Mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes. **Current Biology,** v. 19, n. 2, p. 140-145, 2009.

59 ZERAIK, A. E. et al. Biophysical dissection of schistosome septins: Insights into oligomerization and membrane binding. **Biochimie,** v. 131, p. 96-105, 2016. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.014.

60 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.

61 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of Cell Science,** v. 114, n. 5, p. 839-844, 2001.

62 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.

63 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. **Trends in Cell Biology,** v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.

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

65 LUPAS, A. N.; GRUBER, M. The structure of alpha-helical coiled coils. **Fibrous Proteins:** coiled-coils, collagen and elastomers, v. 70, p. 37-78, 2005. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70003-6.

66 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.

67 MARTINEZ, C. et al. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. **Journal of Thrombosis and Haemostasis,** v. 4, n. 6, p. 1388-1395, 2006.

68 HALL, P. A. et al. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology,** v. 206, n. 3, p. 269-278, 2005.

69 HU, H. et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of human septin 1 with site-directed mutations. **Acta Crystallographica Section F:**structural biology communications, v. 62, pt. 2, p. 128-132, 2006.

70 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. 11101-9, 2007.

71 MCMURRAY, M. A. et al. Septin filament formation is essential in budding yeast. **Developmental Cell,** v. 20, n. 4, p. 540-549, 2011.

72 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell,** v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.

73 BEITES, C. L. et al. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. **Nature Neuroscience,** v. 2, n. 5, p. 434-439, 1999.

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

75 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. 737-49, 1998.

76 MORTENSEN, E. M. et al. Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. **Molecular Biology of the Cell,** v. 13, n. 6, p. 2091-2105, 2002.

77 CARROLL, C. W. et al. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. **Journal of Cell Biology,** v. 143, n. 3, p. 709-717, 1998.

78 OEGEMA, K. et al. Purification and assay of a septin complex from Drosophila embryos. **Molecular Motors and the Cytoskeleton,** v. 298, p. 279-295, 1998. doi: 10.1016/s0076-6879(98)98025-9.

79 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature,** v. 449, n. 7160, p. 311-5, 2007.

80 MENDONÇA, D. C. etal. **Reposiotining septins within the core particle.** 2019. Disponível em: <https://www.biorxvi.org/content/biorxiv/early/2019/03/08/569251.full.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2019

81 SOROOR, F. et al. **Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polimerization properties.** 2019. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/07/569871.full.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2019

82 KIM, M. S. et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **Journal of Cell Biology,** v. 195, n. 5, p. 815-826, 2011.

83 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.

84 NAKAHIRA, M. et al. A Draft of the Human septin interactome. **Plos One,** v. 5, n. 11, p. e13799, 2010.

85 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry,** v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.

86 SERRAO, V. H. B. et al. Promiscuous interactions of human septins: The GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. **Febs Letters,** v. 585, n. 24, p. 3868-3873, 2011.

87 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. **Biological Chemistry,** v. 392, n. 8-9, p. 791-797, 2011.

88 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.

89 FARKASOVSKY, M. et al. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. **Biological Chemistry,** v. 386, n. 7, p. 643-656, 2005.

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

91 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.

92 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.

93 GARCIA, 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.

94 FUNG, K. Y. Y.; DAI, L.; TRIMBLE, W. 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.

95 MARQUES, I. D. 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.

96 MENDOZA, M.; HYMAN, A. A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. **Current Biology,** v. 12, n. 21, p. 1858-1863, 2002.

97 HUANG, Y. W. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **Febs Journal,** v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.

98 DAMALIO, J. C. et al. Lipid interaction triggering Septin2 to assembly into beta-sheet structures investigated by Langmuir monolayers and PM-IRRAS. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.1828, p. 1441-1448, 2013.

99 SATOH, N.; LEVINE, M. Surfing with the tunicates into the post-genome era. **Genes & Development,** v. 19, n. 20, p. 2407-2411, 2005.

100 SATOH, N. An advanced filter-feeder hypothesis for urochordate evolution. **Zoological Science,** v. 26, n. 2, p. 97-111, 2009.

101 DEHAL, P. et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. **Science,** v. 298, n. 5601, p. 2157-2167, 2002.

102 CAO, L. H. et al. The evolution, complex structures and function of septin proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences,** v. 66, n. 20, p. 3309-3323, 2009.

103 MACEDO, J. N. A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal,** v. 450, p. 95-105, 2013. doi: 10.1042/BJ20120851.

104 SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3rd ed.. New York: CSHS Press, 2001.

105 LEES, J. G. et al. CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry,** v. 332, n. 2, p. 285-289, 2004.

106 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.

107 WIENKEN, C. J. et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. **Nature Communications,** v. 1, p. 100, 2010. doi: 10.1038/ncomms1093.

108 JERABEK-WILLEMSEN, M. et al. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure,** v. 1077, p. 101-113, 2014. doi: 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.

109 BLOBEL, J. et al. Protein tyrosine phosphatase oligomerization studied by a combination of N-15 NMR relaxation and Xe-129 NMR. Effect of buffer containing arginine and glutamic acid. **Journal of the American Chemical Society,** v. 129, n. 18, p. 5946-5953, 2007.

110 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.

111 WALLACE, B. A. et al. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. **Protein Science,** v. 12, n. 4, p. 875-884, 2003.

112 GARCIA, W. et al. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry,** v. 45, n. 46, p. 13918-13931, 2006.

113 ZERAIK, A. E. et al. Reversible paralysis of Schistosoma mansoni by forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin that affects septins. **International Journal for Parasitology,** v. 44, n. 8, p. 523-531, 2014.

114 MARQUES, I. A. **Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas**. 2010. 148p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

115 FARES, H.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. **Molecular Biology of the Cell,** v. 6, n. 12, p. 1843-1859, 1995.

116 XIE, Y. L. 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.

117 BRIDGES, A. A. et al. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. **Journal of Cell Biology,** v. 213, n. 1, p. 23-32, 2016.

118 BEBER, A. et al. Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. **Nature Communications,** v. 10, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-08344.

119 MARTINS, C. S. **Análise das interfaces de interação septina-septina.** 2017. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

120 CABREJOS, D. A. L. **Especificidade na montagem de filamentos de septinas:** o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8. 2016. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.