

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Nayara Cavalcante Silva

Estudo das interações da Septina 4 humana

São Carlos

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nayara Cavalcante Silva

Estudos das interações da septina 4 humana

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

Área de concentração: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos

2009

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

Silva, Nayara Cavalcante.

Estudos das interações da septina 4 humana / Nayara Cavalcante Silva; orientador Richard Charles Garratt. – São Carlos, 2009.

113 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Septinas. 2. A-sinucleína . 3. Duplo-híbrido. 4. Expressão em células de insetos. I. Título



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nayara Cavalcante Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovada em: 09/09/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Debora Foguel

Instituição: UFRJ

Assinatura

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Instituição: EACH/USP

Assinatura

Prof. Dr. Richard Charles Garrat

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Dedico este trabalho a todos que trabalham para fazer da ciência uma vela no escuro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu caro orientador Prof. Dr. Richard Garratt por ter dado a oportunidade de realizar esse trabalho, por ter me inspirado a ser mais apaixonada pelas incríveis proteínas e suas lindas estruturas. Quando crescer eu quero olhar para uma estrutura de proteína como o Prof. Richard olha...

Aos meus sábios orientadores da iniciação científica da Universidade de Brasília: Bergmann Moraes Ribeiro e Sônia Maria de Freitas, meu pai e mãe científicos. A oportunidade de aprender em seus laboratórios foi determinante para que eu decidisse que desejo fazer ciência. Obrigado por cada ensinamento seja no mundo da biologia molecular ou das proteínas e, sobretudo de como é ser um orientador.

A Prof. Dra. Ana Paula pelo apoio e disponibilizar a utilização do laboratório de Biofísica para realização do meu trabalho de mestrado.

Agradeço imensamente as técnicas da biofísica Bel e Andressa. Vocês são demais! Com certeza esse trabalho teria sido muito mais difícil sem a pronta ajuda de vocês. E Bel obrigado por ser mãe de todos nós.

Aos meus pais, Edson e Gedalva, me faltam palavras para dizer o quanto vocês são importantes nessa conquista. Pai, obrigado pelo apoio e ensinamentos mais importantes sobre a vida. E mãe, obrigado por ter sempre sido a melhor mãe do mundo a mais doce e companheira e sempre nem por segundo ter deixado de acreditar em mim. Amo-os muito!

A minha querida irmã Dayanne. Sei que a saudade foi muita e foram dois anos difíceis para você, mas obrigado pelo apoio, amizade e carinho.

A minha outra pequenina irmã Anna Clara. Saiba que cada cartinha sua foi uma injeção de motivação e doçura na minha jornada. Você é o anjo que sempre me traz alegria.

A minha avó Juracy por todo amor e dedicação. Você me inspira com sua força. E em memória ao meu avô, José, por ter sido tão querido e especial.

As minhas tias: Josefa, Maria e Betânia. Você são as melhores tias que alguém pode querer ter.

A toda minha grande e querida família tias, tios, primos e primas.

Aos meus amigos de uma vida: Clarice, Wesser, Giovani, Thiago, Suelen, Felipe, André, Roger, Eduardo (Duda), Andréa, Emanuel, Daniel, Karol, Janaína, vocês fazem parte de muitos melhores momentos da minha vida. E, sobretudo a minha grande amiga Diana, porque ela sem sombra de dúvida foi a organizadora desses melhores momentos. Obrigado pela leal amizade.

Ao meu fiel amigo de graduação Gabriel por me trazer a sanidade em algum momentos.

A minha querida amiga Isabella. Por me inspirar e dividir essa insana e profunda paixão pela vida e ainda mais pelo estudo dela. Você é minha bióloga favorita. Merci beacoup!

A minhas queridas amigas científicas de outrora e amigas pessoais de sempre: Cláudia, Ana Paula, Maria, Susane por serem as melhores amigas de viagem, congresso, bobagem e coisas sérias. Não me esqueço de vocês!

A minha amiga Karen, amizade que conquistei em São Carlos e foi quem me ajudou a me sentir em casa pela primeira vez aqui.

A Fran, Fabíola e Marisa por serem companheiras que me fazem sentir em casa e Fran obrigado por me emprestar o computador tantas vezes durante a escrita dessa dissertação.

Aos professores e colegas da biofísica: prof. Jabah, prof. Otaciro, profa. Nelma, profa. Leila, prof. Ricardo de Marco, Ana Paula, Débora, Camila, Militar, Ceara, Luís, Sheila, Júlio, José Luiz, Ana Isabel, Julia, Fernando Melo, Leandro e Assuero (querido Sussu) por serem excelentes companhias, com certeza vocês fizeram meus dias de trabalho muito mais agradáveis.

Aos colegas da cristalografia. Em especial a Livia e Daiana por serem amigas tão prestativas e queridas. A Tati por ter sempre uma palavra de ânimo e perseverança.

Ao pessoal da sala 15. Dani e Carol obrigada pela companhia e dicas no trabalho. Lucas pelos preciosos ensinamentos de cristalografia, pelos vinhos e, sobretudo pela amizade. Alessandro por todas as ajudas computacionais e boas conversas. Nathalia por me ajudar em tantas coisas que nem posso listar e o mais importante pela amizade. A Aline por ser a amiga maluca mais divertida que conheci em São Carlos. A meu querido amigo batráquio Fernando Bachega, obrigado pelas boas conversas, risadas, caronas, pela ajuda nas figuras. Você não existe! Obrigado pela amizade.

Aos corajosos estudiosos de septinas: Joci, Júlio, Carol Hoff, Ivo, Nathalia por todas as preciosas discussões e ajudas no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao incansável Napoleão pelas complicadas medidas no SPR. Obrigado por não ter desistido das minhas proteínas e pela enorme paciência e disponibilidade.

A Dra. Ana Carolina Zeri e ao Dr. Mauricio Sforza pelo tempo e suporte na utilização dos aparelhos de RMN do LNLS.

Ao Marcel, Eugênia e Dr Jörg do LNLS pela ajuda no sequenciamento dos clones do duplo híbrido e suporte na expressão em células de inseto.

A prof. Dra Débora Foguel e a Dra. Ana Carolina Braga pela colaboração no estudo da interação SEPT4 e α -sinucleína.

E em especial ao meu namorado Diorge, porque você foi crucial para realização do meu mestrado. Foi sem dúvida com quem eu mais discuti esse trabalho, que ouviu todas as minhas dúvidas, aspirações científicas e idéias malucas. Por escutar as reclamações quando os

experimentos davam errados e me motivar a continuar, por tratar os espectros de ressonância, por ajudar a analisar os gráficos de CD, e ajudar a produzir os anticorpos anti-sept4, por me ajudar no seqüenciamento e todas as outras que não vou nem citar. E acima de tudo por ter sido o meu grande motivador, companheiro, amigo, amante. Obrigado por acreditar em mim e pelo seu grande afeto. Meu anjo, te amo e admiro muito.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles mesmo não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.



“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

Carlos Drummond de Andrade

"Se procurar bem, você acaba encontrando

não a explicação (duvidosa) da vida, mas a poesia (inexplicável) da vida."

Carlos Drummond de Andrade

**"PARA SER GRANDE, SÊ INTEIRO: NADA
TEU EXAGERA OU EXCLUI.
SÊ TODO EM CADA COISA. PÕE QUANTO ÉS
NO MÍNIMO QUE FAZES.
ASSIM EM CADA LAGO A LUA TODA
BRILHA, PORQUE ALTA VIVE."**

Fernando Pessoa



RESUMO

Septinas são proteínas ligantes a GTP encontradas desde fungos até metazoários. A primeira função identificada para septinas foi o seu papel central na organização e dinâmica do septo de divisão de leveduras. Uma das características marcantes é que septinas se organizam em heterofilamentos de 7 a 9 nm de espessura que foram purificados de diversos organismos tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* e cérebro de camundongos. Hoje se sabe que septinas não estão envolvidas apenas nos processos de divisão celular, mas em uma variedade de processos como tráfico de vesículas, exocitose, interação com proteínas do citoesqueleto e com a membrana plasmática, o que resulta em alterações da morfologia celular. Neste trabalho foram desenvolvidos estudos da septina 4 humana (SEPT4) nos quais foi realizado a expressão e purificação da SEPT4 pelo uso do sistema de expressão heteróloga em *E. coli* e em células de insetos (Sf-9) via baculovírus. A tentativa de expressão usando o vetor pETTEV em *E.coli* não obteve sucesso, pois a proteína não foi expressa na forma solúvel. A construção do baculovírus recombinante AcSept4 e expressão da SEPT4 nas células de insetos foi realizada com êxito, mas o processo de purificação não foi satisfatório. Com o intuito de obter informações sobre possíveis proteínas que interagem com a SEPT4 e conseqüentemente sobre as funções desempenhadas por ela na célula, a SEPT4 foi utilizada como isca para ensaios de interação proteína-proteína pela técnica de duplo híbrido. Para isso, o gene da SEPT4 foi clonado fusionado ao domínio de ligação ao DNA Lex-A. A realização do ensaio de duplo híbrido com a proteína completa não foi possível, pois a mesma provocou a auto ativação do sistema, por isso uma nova construção foi realizada com a região GTPase e C-terminal SEPT4GC (124-478) como isca. Dentre as interações identificadas, foram encontradas apenas septinas do grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10 e SEPT11) e quatro novas interações, que ainda precisam ser confirmadas. Por outro lado, uma interação já descrita na literatura envolve a proteína α -sinucleína, que é uma proteína abundantemente expressa no cérebro e associada à doença de Parkinson. O foco do estudo dessa interação foi realizar ensaios com os diferentes domínios da SEPT4 para comprovar uma interação direta e com isso tentar mapear o sítio de interação com a α -sinucleína. Os resultados obtidos pela ressonância plasmônica de superfície (SPR) indicam que o domínio C-terminal participa da interação com baixa afinidade ($K_D=390 \mu\text{M}$) e sugerem que o domínio GTPase também pode

estar envolvido. Já os dados obtidos com os experimentos de RMN e anisotropia de fluorescência mostram indícios que a interação é dependente da conformação da α -sinucleína por que a interação aconteceria com maior afinidade quando a α -sinucleína está na presença de SDS.

Palavras chaves: Septina 4, α -sinucleína, expressão em células de inseto, duplo híbrido.

ABSTRACT

Septins are a family of GTP binding proteins found in a great diversity of organisms. These proteins have been identified as having a central role in septum organization during yeast division. Septins are organized into heterofilaments which are 7 to 9 nm wide and these have been purified from yeast, *Drosophila* and mice brain. Septins are not only required for cell division, but seem to play a role also in vesicle trafficking and in the formation of diffusion barriers within cells, since they interact with cytoskeleton proteins and the plasma membrane causing changes in cell morphology. In the present work, the aim was investigate human Septin 4 (SEPT4), a septin highly expressed in the brain. One objective of this work was to find a suitable expression system and purification method for SEPT4. The protein was expressed in both *E.coli* and insect cells (Sf-9). Expression in *E. coli* with the vector pETTEV was unsuccessful because the protein was insoluble. Expression in insect cells using the recombinant baculovirus AcSept4, was obtained successfully, but the purification was difficult. Important information concerning SEPT4 function might be acquired, if interactions partners involved in cellular process were identified. With this goal in mind, a yeast two hybrid assays were performed. The sept4 gene was fused to the Lex-A DNA binding domain and used as bait in the yeast two hybrid essays. However, full length SEPT4 showed autonomous activation of reporter genes. A second construct was prepared including only GTPase domain and the carboxy terminus domain, (residues 124 to 478) and the screen of interactions were carried out only with SEPT4GC. All of the group II septins (SEPT6, SEPT8, SEPT10 and SEPT11) were identified together with four new interactions. The latter still need be confirmed. In addition, another interaction already described in the literature is between SEPT4 and α -synuclein, which is a protein highly expressed in brain and related to Parkinson's disease. Different spectroscopic methods and SPR were used to identify which domain of SEPT4 interacts directly with α -synuclein and in which region. The surface plasmon resonance (SPR) results indicate that the carboxy terminus participates in the interaction with low affinity ($K_D = 390 \mu\text{M}$) and suggests that the GTPase domain may also be involved. The results obtained by fluorescence anisotropy and NMR studies provide evidence that the interaction is dependent on the α -synuclein conformation, because the affinity of SEPT4 and α -synuclein seemed to be higher in the presence of SDS.

Keywords: Septin 4, α -synuclein, insect cell expression system, yeast two hybrid,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Localização da septinas nas células.....	22
Figura 1.2.	Domínios estruturais das septinas.....	23
Figura 1.3.	Relações filogenéticas entre as septinas humanas.....	24
Figura 1.4.	Alinhamento múltiplo do domínio GTPase das septinas humanas..	27
Figura 1.5.	A. Representação do hexamero formado pelo heterofilamento das septinas humanas 2, 6 e 7.....	29
Figura 1.6.	Nothern Blot eletrônico mostrando o padrão de expressão da Sept4.....	33
Figura 1.7	Imunomarcações para a SEPT4 e α -sinucleína de secções do cérebro de pacientes com a doença de Parkinson	34
Figura 3.1	Esquema das etapas para construção do baculovírus recombinante AcSept4	42
Figura 3.2.	Esquema geral do sistema de detecção de SPR do equipamento Biacore X [®]	60
Figura 3.3.	Sensorgrama típico. As linhas coloridas em azul e verde mostram a variação do sinal de SPR em função do tempo em duas medidas diferentes. As etapas de associação e dissociação estão indicadas no próprio sensorgrama.....	60
Figura 3.4.	Sensorgrama mostrando a imobilização da α -sinucleína ao sensor chip CM5 pelo método de acoplamento amina.....	62
Figura 4.1.	SDS - PAGE do teste de expressão pETTEVSept4 em E. coli BL-21(DE-3).....	64
Figura 4.2.	Expressão e purificação da Sept4 em E. coli a 18 °C.....	64
Figura 4.3.	Esquema da clonagem do gene da septina 4 no vetor pFastBacHTB (Invitrogen).....	65
Figura 4.4.	Amplificação da septina 4 no vetor pFastBacHTB.....	66
Figura 4.5.	Confirmação da inserção da SEPT4 no bacmidio.....	66
Figura 4.6.	Expressão de septina 4 em células de inseto Sf-9.....	67

Figura 4.7.	SDS – PAGE da purificação SEPT4 expressa em células Sf-9 (cromatografia de afinidade).....	68
Figura 4.8.	Purificação da SEPT4 expressa em células de inseto.....	69
Figura 4.9.	Análise da purificação da SEPT4 expressa em células de insetos por SDS-PAGE 15% e Western Blot.....	70
Figura 4.10.	A- Esquema da Sept4(1-478) e os domínios GC4 (124-478) que foram fusionados ao domínio de ligação ao DNA Lex-A para realização do ensaio de duplo híbrido. B- teste de autoativação do pBTMSept4(1-478) a cor azul das colônias indica a ativação do Lac Z. C - O mesmo teste de autoativação, mas agora realizado com o pBTMGC4 (124-478) não mais é visto a atividade do gene reporter.....	73
Figura 4.11.	A - Triagem das interações da biblioteca de cérebro fetal humano. Colônias recuperadas da transformação do pBTMGC4 com a biblioteca, as colônias foram crescidas em SD-WLH mais 5mM de 3-AT. B- Teste da β -galactosidase para confirmar a ativação do gene reporter nas colônias recuperadas.....	74
Figura 4.12.	A - Cotransformação da SEPT4GC e os clones obtidos no screen do duplo-híbrido. B – Ensaio da β galactosidase das colônias cotransformadas As colônias azuis indicam que o gene da β -galactosidase foi ativado, nas colônias que foram transformadas sem o SEPT4GC não é possível observar a formação de colônias azuis.....	75
Figura 4.13.	Esquema dos possíveis filamentos formados pela SEPT4.....	77
Figura 4.14.	Possíveis sítios de sumoilação identificados na sequência da SEPT4 pelo programa SUMOplot.....	79
Figura 4.15.	Espectro de CD da Sept4NGC e da α -sinucleína.....	82
Figura 4.16.	Espectro de CD da Sept4GC e da α -sinucleína.....	83
Figura 4.17.	Espectro de CD da Sept4G e da α -sinucleína.....	82
Figura 4.18.	Espectro de CD da Sept4C e da α -sinucleína.....	84
Figura 4.19.	Espectro de CD da Sept4C e a α -sinucleína com SDS.....	84
Figura 4.20.	Titulação da SEPT4C na alfa sinucleína marcada com rodamina.....	86

Figura 4.21.	Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ de ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C sem SDS.....	89
Figura 4.22.	Assinalamento da α -sinucleína.....	91
Figura 4.23.	Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ da ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C com SDS	92
Figura 4.24.	Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ da ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C com SDS a 40°C.....	94
Figura 4.25.	Deslocamento químico composto e razão das intensidades da α -sinucleína antes e após adição da SEPT4C.....	95
Figura 4.26.	Deslocamento químico composto da α -sinucleína após adição da SEPT4C na presença de SDS a 40°C.....	96
Figura 4.27.	Sítio de interação da α -sinucleína ligada a SDS com a SEPT4C.....	96
Figura 4.28.	Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ da alfa-sinucleína com SEPT4GC.	97
Figura 4.29.	Figura 4.32. Avaliação da influência da concentração de NaCl em amostras contendo 100 μM do domínio C-Terminal da SEPT4.....	99
Figura 4.30.	Interação do domínio C-Terminal da septina 4 com a α -sinucleína imobilizada.....	100
Figura 4.31.	Ensaio de saturação do domínio C-Terminal da SEPT4 com a α -sinucleína imobilizada.....	101
Figura 4.32.	Curva de ajustes dos dados de ligação do domínio C-terminal da SEPT4 a α -sinucleína.....	101
Figura 4.33.	Interação da SEPT4 com a α -sinucleína.....	102
Figura 4.34.	Interação da SEPT4GC com a α -sinucleína.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Nomenclatura estabelecida para as septinas de mamíferos, exemplificado em camundongo e humanos. Tabela extraída da referência de (Macara et al, 2002).....	28
Tabela 3.1	Oligonucleotídeos usados neste trabalho. Destacado em vermelho os sítios de restrição.....	37
Tabela 3.2	Meios de cultura para seleção auxotrófica nos ensaios de duplo-híbrido	48
Tabela 3.3	Plasmídios e meios usados na transformação em pequena escala da levedura L40	48
Tabela 3.4	Parâmetros das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho.....	55
Tabela 4.1	Proteínas identificadas pela triagem de interações da Sept4GC com proteínas expressas na biblioteca de cérebro fetal humano pela técnica de duplo híbrido	76

LISTA DE ABREVIATURAS

3- AT - 3- amino-1,2,4- triazole

Aas – aminoácidos

BL21 (DE-3) – Linhagem bacteriana para expressão com a T7 RNA polimerase

CD – difração circular

CDC – cell division cycle

DH5 α – Linhagem bacteriana para propagação

D.O. – densidade ótica

GST – Glutathione-S-Transferase

GDP – Guanosina Difosfato

GTP – Guanosina Trifosfato

IPTG - Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo

MBP – Maltose Binding Protein

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation

Ni – NTA – coluna de Níquel

PBS - Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

PDB – Protein Data Bank

PCR – Reação da polimerase em cadeia

SEPT – Septina

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Sódio Dodecil Sulfato

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 Introdução	21
1.1 Septinas	21
1.2 Características Estruturais de Septinas	23
1.3 Complexo de Septinas	24
1.4 Septina 4	26
1.5 Alfa sinucleína	30
2 Objetivos	35
2.1 Objetivos	35
3 Metodologia	36
PARTE I – Expressão e purificação da SEPT4	36
3.1 Subclonagem no vetor pETTEV	36
3.2 Expressão da SEPT4 em <i>E.coli</i>	38
3.3 Expressão em células de insetos	39
3.4 Subclonagem da Sept4 no plasmídio para expressão em células de inseto.....	40
3.5 Obtenção dos baculovírus recombinantes	43
3.6 Ensaio de expressão em células de inseto e purificação	44
PARTE II –Triagem de novas interações da SEPT4 por estudos de duplo híbrido	45
3.7 Duplo híbrido	45
3.8 Clonagem no vetor para duplo híbrido	46
3.9 Transformação em pequena escala de levedura	47
3.10 Transformação em larga escala de levedura – triagem das interações com a biblioteca de cérebro fetal humano	50
3.11 Isolamento do vetor pACT2.....	51
3.12 Cotransformação	52
PARTE III–Estudo da interação entre SEPT4 e α-sinucleína	53
3.13 Expressão e purificação dos domínios da SEPT4 em <i>E. coli</i>	53
3.14 Expressão e purificação da α -sinucleína	53
3.15 Cálculo da concentração proteica.....	54
3.16 Medidas de dicroísmo circular da α -sinucleína e SEPT4	55
3.17 Medidas de anisotropia de fluorescência	56
3.18 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear da interação α -sinucleína e SEPT4.....	57
3.19 Medidas de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) da interação α -sinucleína e SEPT4	59
4 Resultados e Discussões	63

PARTE I – Expressão e purificação da SEPT4	63
4.1 Expressão da SEPT4 em <i>E.coli</i>	63
4.2 Expressão em células de inseto	65
4.3 Purificação da SEPT4 expressa em células de inseto	67
PARTE II –Triagem de novas interações da SEPT4 por estudos de duplo híbrido	70
4.4 Duplo híbrido da SEPT4	70
4.5 Duplo híbrido da SEPT4GC	72
PARTE III – Estudo da interação entre a SEPT4 e α-sinucleína	80
4.6 SEPT4 e α -sinucleína	80
4.7 Medidas de dicroísmo circular	81
4.8 Medidas de anisotropia de fluorescência	85
4.9 Medidas de Ressonância Magnética nuclear	86
4.10 Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	98
5 Conclusões	104
6 Perspectivas	106
Referências	107

1 Introdução

1.1 Septinas

A história das septinas começa a ser contada quando mutantes sensíveis à temperatura de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentavam como fenótipo problemas no processo de divisão celular, foi identificado por Hartwell em 1971. Em tais mutantes, se verificava que as células filhas não se separavam das células mãe. Os estudos de microscopia eletrônica mostravam que a formação do septo que separa célula mãe e filha no brotamento em leveduras não mais ocorre do modo correto, desta forma as proteínas formadoras do septo de divisão receberam o nome de septinas. A alteração do fenótipo nessas leveduras estava envolvido com mutações nos genes CDC 3, CDC 10, CDC 11 ou CDC 12 que foram as primeiras septinas identificadas (HARTWELL, 1971).

Septinas são uma família de proteínas que se ligam a nucleotídeos de guanina e possuem como característica marcante a capacidade de formar filamentos, os quais parecem se organizar em estruturas de maior ordem. Tais estruturas desempenham funções como no caso das septinas de levedura na formação de uma barreira que separa as proteínas de membrana da célula mãe e célula filha (Figura 1.1a), e também atuam como ancoradoras para proteínas envolvidas no reconhecimento do sítio de septação e no ciclo celular (BERTIN et al., 2008); (VERSELE; THORNER, 2005).

Contudo as funções das septinas não se restringem apenas à divisão celular. Os filamentos de septinas estão envolvidos em diversas outras funções celulares, tais como, controle do ciclo celular, formação e localização do fuso mitótico, resposta a danos ao DNA e morfologia celular (BARRAL; KINOSHITA, 2008). Septinas também são altamente expressas em células com baixas taxas de divisão celular, em neurônios, por exemplo, elas estão envolvidas em exocitose e tráfico de vesículas. In vivo, sabemos que septinas interagem tanto com o citoesqueleto quanto com a membrana plasmática e essas interações nos indicam duas possíveis funções ainda não bem entendidas. Septinas funcionam como arcabouços que recrutam e ancoram proteínas ou estruturas celulares e barreiras que segregam diferentes regiões celulares (WEIRICH et al., 2008) e (KINOSHITA, 2003). Estudos realizados com extrato cerebrais de porco mostraram que quando adicionados a lipossomos provocavam a formações de estruturas tubulares uniformes, subseqüentemente foi identificado que as

septinas presentes no extrato eram responsáveis por esse fenótipo e que o complexo das septinas humanas 2-6-7 também causavam o mesmo fenótipo. Esses resultados mostraram que septinas podem alterar significativamente a morfologia celular (TANAKA-TAKIGUCHI et al., 2009). Trabalhos também mostraram que a septina 7 estava presente na base das espículas dendríticas e que sua super expressão provocava maiores ramificações da árvore dendrítica enquanto a diminuição causava uma redução no número de ramificações e os ramos ficavam mais curtos (Figura 1.1b) (GLADFELTER; MONTAGNA, 2007).

Hoje sabemos que septinas não estão presentes apenas em leveduras, mas encontram-se amplamente distribuídas desde fungos até metazoários e parecem estar ausentes em plantas (GLADFELTER; MONTAGNA, 2007). Em humanos foram identificadas até o momento 14 septinas parálogas, as quais podem ser divididas em quatro grupos considerando a identidade de suas seqüências de aminoácidos (figura 1.3)

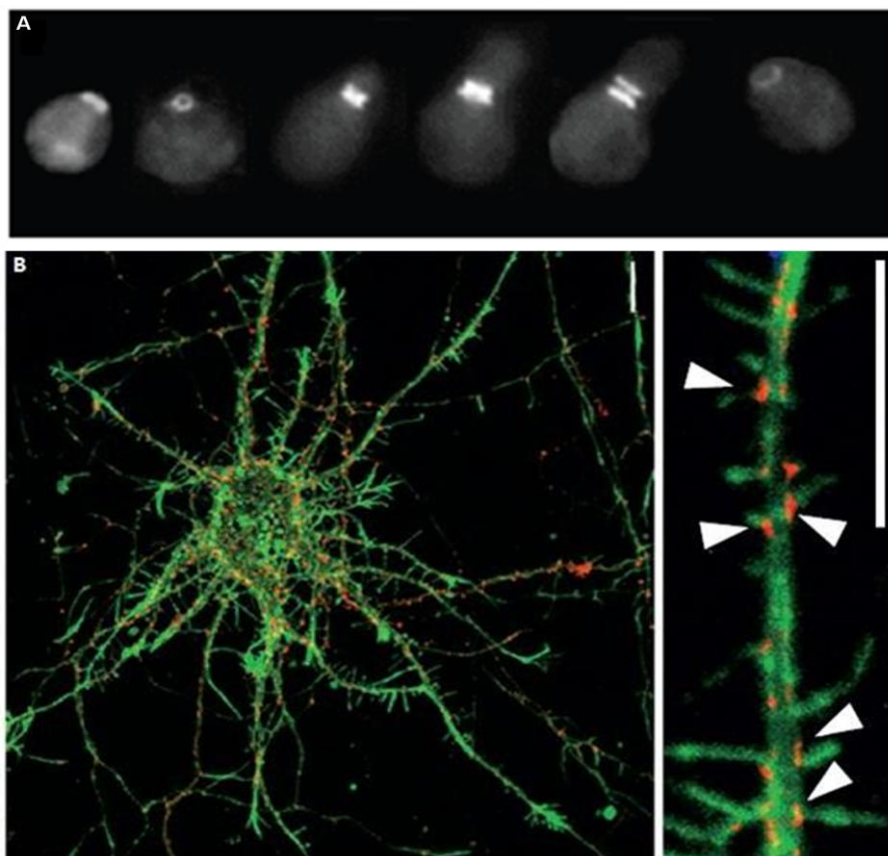


Figura 1.1. Localização das septinas nas células. A - Localização das septinas em leveduras durante a citocinese observada por microscopia de fluorescência. B - Imunoflorescência da Sept7 em neurônios. Localização natural da Sept7 expressa em culturas de neurônios do hipocampo. (F-actin em verde e Sept7 em vermelho). As setas brancas mostram a Sept7 nas espículas dendríticas regiões ricas em actina. Figura adaptada das referências (GLADFELTER et al., 2001) ; (GLADFELTER; MONTAGNA, 2007)

À medida que as septinas de diversos organismos foram sendo descobertas, uma variedade de nomes foram empregados. Por isso, tentando evitar a confusão que existia na literatura uma nomenclatura padrão para septinas de mamíferos foi proposta por Macara e colaboradores (MACARA et al., 2002). Nela cada septina é identificada por um número e as isoformas de cada septina por um “v” seguido do número da isoforma. Por exemplo: SEPT3_v1 (Septina humana 3 isoforma 1) (tabela 1.1).

1.2 Características estruturais de septinas

Em suas características estruturais, septinas são uma família de proteínas ligantes a GTP, mais precisamente P-loop GTPases. Como uma representante da superfamília das GTPases as septinas possuem um domínio GTPase altamente conservado (figura 1.4), no qual encontra-se três motivos estruturais de ligação ao GTP, conhecidos como G1, G3 e G4. O motivo G1 possui a sequência conservada GxxxxGK, o qual forma um loop que interage com os grupos fosfato do nucleotídeo. O G3 forma-se por alguns resíduos hidrofóbicos seguidos pela sequência DxxG, o G4 é responsável pela especificidade de ligação ao GTP e constitui-se pela sequência NKxD (figura 1.2 e 1.4) (PAN et al., 2007)



Figura 1.2. Domínios estruturais das septinas. Esquema que mostra a organização dos domínios estruturais de uma septina. Em verde, o domínio N-terminal que é bastante variável entre as septinas; em amarelo o domínio GTPase incluindo os três motivos G1, G3 e G4 e em vermelho o domínio C-terminal. Em preto está destacado a região polibásica, possível região de ligação a membrana plasmática.

Além do domínio GTPase, que alta identidade entre as septinas, dois outros domínios estão presentes e variam bastante em tamanho e sequência de aminoácidos. A região N-terminal, anterior ao domínio GTPase, é bastante variável, podendo conter alguns poucos resíduos, como nos casos das septinas 1 e 7, até centenas de resíduos, como é o caso das septinas 4 e 9. Posterior ao GTPase está o domínio C-terminal. Na maioria das septinas, este domínio é predito como uma estrutura do tipo coiled coil (GARCIA et al., 2006), menos nos caso das septinas humanas SEPT3, SEPT9 e SEPT12 (figura 1.2).

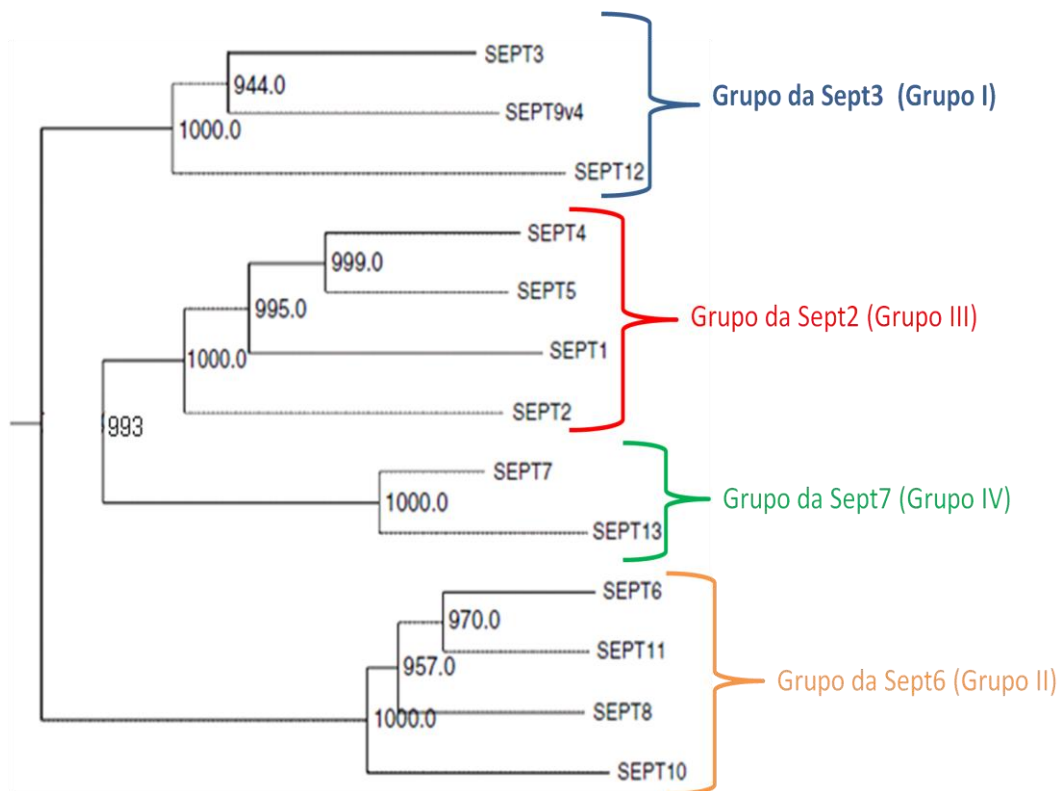


Figura 1.3. Relações filogenéticas entre as septinas humanas. A partir da identidade entre as seqüências do domínio GTPase, elas foram classificadas em quatro grupos como mostrado acima. Figura modificada da referência (Hall et al., 2005)

1.3 Complexos de septinas

À medida que septinas foram sendo purificadas de fontes nativas tais como *S. cerevisiae*, *Drosophila* e humanos observou-se que eram sempre formadas por heterofilamentos. Por exemplo, o complexo de septinas isolado de embriões de *Drosophila* formava uma estrutura filamentosa de 8 nm de espessura e era composto de três septinas, Sep1, Sep2 e Pnut em uma razão molar 1:1:1 (KINOSHITA, 2003). Devido ao fato de humanos possuírem várias septinas, cartorze ao total, a compreensão das relações entre elas na formação de complexos é dificultada, ainda mais pelo fato que muitas septinas aparentam ser substituíveis por outras nos filamentos por elas formados.

O primeiro complexo identificado pelas septinas humanas na razão molar de 1:1:1 foi isolado por uma cromatografia de afinidade que buscava proteínas que interagissem com a GST-Borg3 (JOBERTY et al., 2001). Borg-3 é um dos efetores da GTPase Cdc 42, a qual esta

envolvida na regulação da divisão celular, transporte de vesículas e reorganização do citoesqueleto. Após a identificação das bandas copurificadas com a Borg-3 descobriu-se que se tratava do complexo de septinas 2-6-7. Este complexo passou a ser o modelo para estudo da formação de filamentos em septinas e foram elas as primeiras estruturas cristalográficas publicadas da família das septinas; o complexo das septinas humanas 2-6-7 a 4 Å de resolução e o domínio GTPase da septina 2 a 3,4 Å de resolução (SIRAJUDDIN et al., 2007).

O complexo 2-6-7 purificado por gel filtração mostrava uma massa molecular de aproximadamente 285 KDa, o que indicava a presença de um hexâmero na razão molar 2:2:2. Em relação ao conteúdo de nucleotídeos, se observou uma relação GDP:GTP de 2:1 o que pode ser confirmado na estrutura cristalográfica pois tanto a septina 2 e 7 possuem uma molécula de GDP ligada e somente a septina 6 permanece ligada a GTP (figura 1.5a). Na estrutura do complexo se pode observar diferentes interfaces de interação. A interação entre a SEPT2 e SEPT6 ocorre pela interface de ligação ao GTP (interface G), enquanto a interação entre a SEPT6 e SEPT7 ocorre por uma estável interação entre o N e o C-terminal (interface N/C) dos domínios GTPase de ambas as proteínas. A estrutura da SEPT2 sozinha mostra as mesmas duas interfaces formando o filamento da SEPT2 (figura 1.5b) (SIRAJUDDIN et al., 2007). A capacidade da SEPT2 em formar homofilamentos através da utilização destas duas interfaces indica que essas interações podem ser promiscuas e intercambiáveis entre septinas.

Para detectar qual era a ordem de organização do hexâmero, medidas de microscopia eletrônica em alta concentração salina com a SEPT2 fusionada a MBP (maltose binding protein) foram feitas e revelaram que o dímero da SEPT2 estava no centro do hexâmero. A disposição do complexo seria 7-6-2-2-6-7, o que indica que os filamentos são apolares (figura 1.5a). Essa organização coloca a SEPT7 nas pontas, expondo uma superfície que está disponível para a formação de uma interface do tipo G com outra SEPT7 na extremidade de outro hexâmero, assim iniciando a formação do filamento. Essa interface é mais suscetível a altas concentrações de sal limitando a polimerização nestas condições (SIRAJUDDIN et al., 2007) ; (GLADFELTER; MONTAGNA, 2007).

Os resultados obtidos até agora indicam que a dinâmica de formação dos filamentos e estruturas de maior ordem são essenciais para o funcionamento das septinas. Muitas possibilidades de complexos podem ser formadas, utilizando combinações alternativas de septinas. Segundo Kinoshita os complexos das septinas humanas, tendo como modelo o complexo 2-6-7, devem ser formados por septinas de diferentes grupos. A SEPT2 poderia ser

substituída pela SEPT1, SEPT4 e SEPT5, enquanto a SEPT6 seria substituída por suas parceiras de grupo; SEPT8, SEPT10 e SEPT11 (KINOSHITA, 2003). Ainda não é muito compreendido como o grupo da SEPT3/9 estaria presente na formação dos filamentos. No entanto, o complexo com as septinas 7-9-11 já foi isolado de fibroblastos de ratos (NAGATA et al., 2004) e o complexo 3-5-7 foi isolado de cérebro de ratos (LUKOYANOVA et al., 2008). Isso mostra que a formação dos complexos de septinas possui grande diversidade que talvez esteja associada com distintas funções.

1.4 Septina 4

A Septina 4 (SEPT4), também conhecida como Peanut-like protein 2, Brain protein H5, Cell division control-related protein 2, hCDCREL-2, CE5B3 β , Cerebral protein 7 e Bradeiona β é um dos membros da família de septinas, incluída no grupo III. Ela tem sido relacionada a diversos processos celulares tais como divisão celular, transporte de vesículas, apoptose e supressão de tumores (HALL; RUSSELL, 2004); (TANAKA et al., 2001). No entanto, até hoje pouco é sabido sobre sua real função e como ela está envolvida com tais processos celulares.

A SEPT4 é altamente expressa no sistema nervoso central (HALL et al., 2005) (figura 1.6), sendo também detectada sua expressão no coração, fígado, células endoteliais e em menor escala em outros tecidos (ZIEGER et al., 2000). Um fato interessante é a relação de SEPT4 com alguns tumores. Trabalhos mostraram que há um aumento de expressão da SEPT4 em tumores coloretais, urológicos e melanoma maligno (TANAKA et al., 2001).

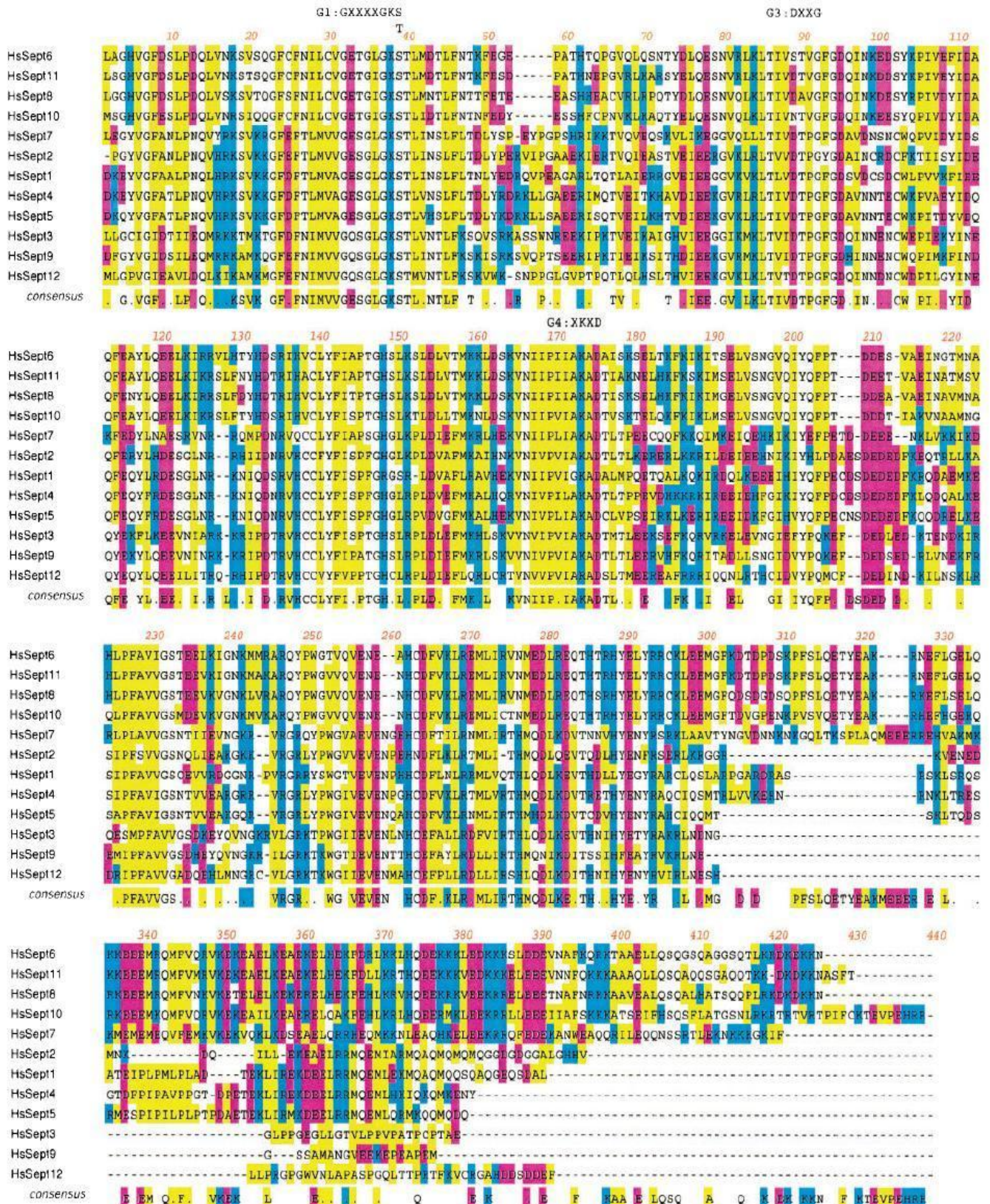


Figura 1.4. Alinhamento múltiplo do domínio GTPase das septinas humanas. Figura extraída de (KINOSHITA, 2003).

Tabela 1.1 - Nomenclatura estabelecida para as septinas de mamíferos, exemplificado em camundongo e humanos. Tabela extraída da referência de (Macara et al, 2002)

Approved mouse septin nomenclature (Locus/protein)	Approved human septin nomenclature (Locus/protein)	Mouse, rat septin aliases ^a	Mouse, rat GenBank accession nos. (selected)	Human septin aliases	N-terminal sequence (human, longest splice variant)	C-terminal sequence (human, longest splice variant)	Human GenBank accession nos. (selected)	Human chromosome locus
<i>Sept1</i> /SEPT1	<i>SEPT1</i> /SEPT1	Diff6, Septin1	M37030, NM_017461	SEPT1	MDKEYVGF	QGEQSDAL	NM_052838	16p11.1
<i>Sept2</i> /SEPT2	<i>SEPT2</i> /SEPT2	Nedd5, Septin2	NM_010891, D49382	Nedd5, Pnutl3, Diff6, KIAA0158	MSKQQPTQ	GGALGHHV	NM_004404, AF038404	2q37.3
<i>Sept3</i> / <i>SEPT3_v1-3^b</i>	<i>SEPT3</i> / <i>SEPT3_v1-2^c</i>	G-septin(α,β,γ), Septin3(A-C)	AF111179(α), AF111180(β), AF111181(γ), NM_011889, NM_019375	Sep3 ^c	MSELVPEP	EESHDSNP	NM_019106	22q13.2
<i>Sept4</i> / <i>SEPT4_v1-6</i>	<i>SEPT4</i> / <i>SEPT4_v1-6</i>	H5, Sep4	NM_011129	H5, Bradeion(α,β), Pnutl2(variants 1-4), hCDCrel-2(a-b), ARTS, ^d MART ^d	MDRSLGWQ	QKQMKENY	NM_004574, NM_080415-7, AF176379, AB008753, AB002110	17q23
<i>Sept5</i> /SEPT5	<i>SEPT5</i> /SEPT5	Cdcrel-1 Pnutl1 ^e	NM_053931	Pnutl, hCDCrel-1A, B	MSTGLRYK	MKQQMQDQY11593, NM_002688		22q11.2
<i>Sept6</i> /SEPT6	<i>SEPT6</i> /SEPT6_v1-6	Septin6	NM_019942	SEPT2, Septin6(I-VI), KIAA0128	MAATDIAR	KRDKEKKN	AF403058-62, AB023622	Xq24
<i>Sept7</i> /SEPT7	<i>SEPT7</i> /SEPT7	Septin7, Cdc10	NM_022616	hCdc10	MVAQQKNLE	NKKKKGKIF	AF142759, NM_001788	7q36.1
<i>Sept8</i> /SEPT8	<i>SEPT8</i> /SEPT8		AA636820 (partial)	KIAA0202	MAATDLERFS ^f	RKDKDKKN	D86957, BAA13193.1	5q31
<i>Sept9</i> / <i>SEPT9_v1-5</i>	<i>SEPT9</i> / <i>SEPT9_v1-5</i>	Sint1, Sep9, E-septin, SLP-a	NM_017380, AJ250723	AF17q25 gene, MSF(a-d), SEPT9, SepD1, Ov/Br septin, Pnutl4, KIAA0991	MKKSYSYGTR	EKEPEAPEM	NM_006640, AB023208, AF189712, AF123052	17q25.3
<i>Sept10</i> /SEPT10	<i>SEPT10</i> /SEPT10		AV254985	SEPT10, Sep1-	MASSEVARHL	QGQYISQSE	AF146760	8q11.23

O gene da septina 4 possui como endereço no cariótipo humano o cromossomo 17q23. Como outras septinas, a septina 4 também apresenta diferentes isoformas geradas por splicing alternativo, muitas delas sendo mais expressas em alguns tecidos do que em outros (HALL; RUSSELL, 2004). Sua maior isoforma, a isoforma 1, codifica uma proteína de 478 aminoácidos e peso molecular de 55kDa. A septina 4 possui um dos maiores N-terminais encontrados na família com 124 resíduos cuja seqüência não possui similaridade com outras septinas. Entre o N-terminal e o domínio GTPase encontra-se a região poli-básica, que é a suposta região de ancoragem na membrana plasmática. Esta região é composta por uma seqüência rica em aminoácidos

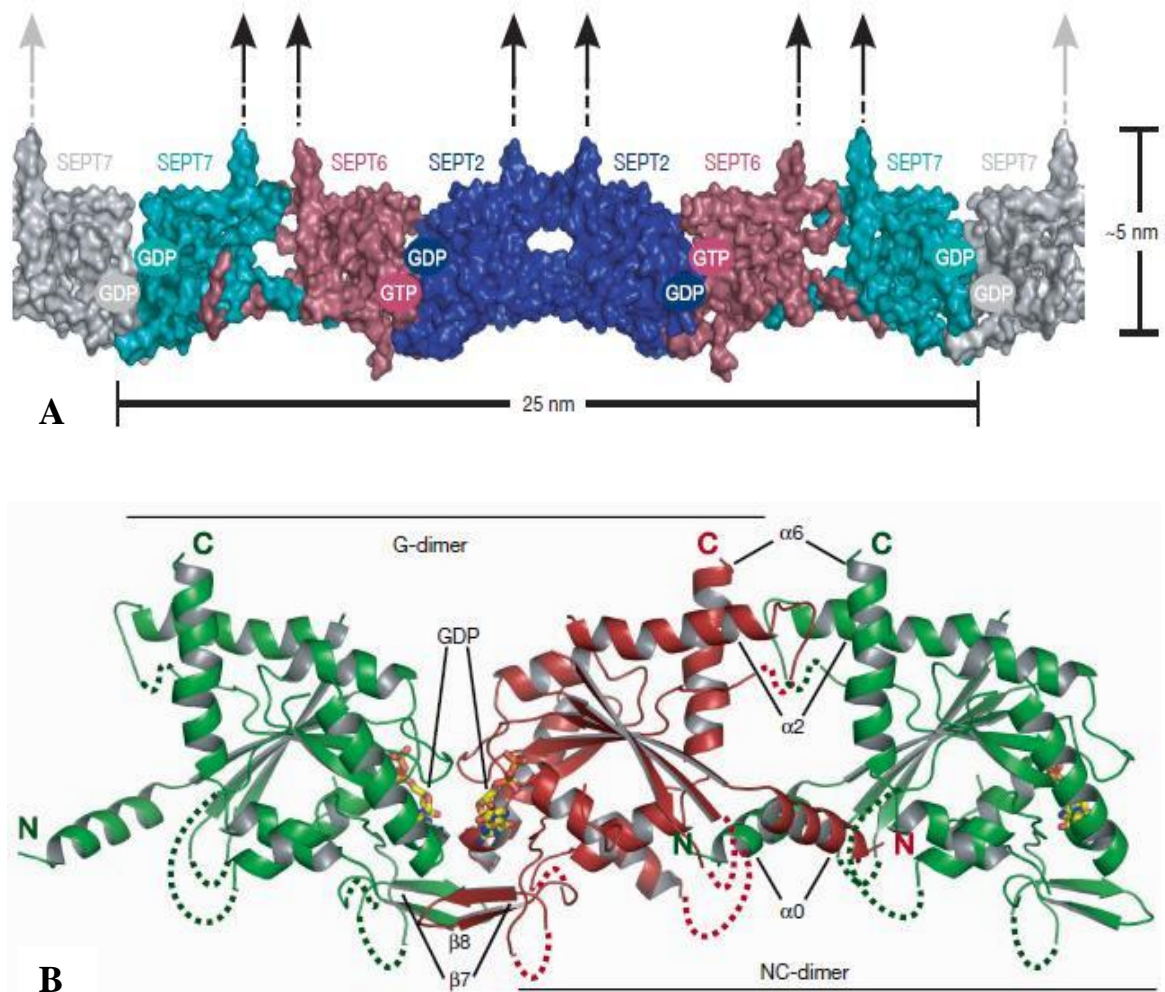


Figura 1.5. A. Representação do hexâmero formado pelo heterofilamento das septinas humanas 2, 6 e 7. Aqui podemos observar as interfaces de cada interação e o seu conteúdo de nucleotídeos. As setas indicam predição de onde estariam os coiled coils do domínio C-terminal. B. Estrutura do domínio GTPase da septina 2. Aqui também se pode observar as duas interfaces NC e G. Os pontilhados representam regiões desordenadas. (Figura extraída de (SIRAJUDDIN et al., 2007))

básicos (RKSVKK), que segundo Zhang, corresponde a região de ligação a fosfolípidos como fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato e fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (ZHANG et al., 1999). No domínio C-terminal encontra-se uma sequência com um trecho rico em prolinas e em seguida uma região com a predição de formar um coiled-coil (figura 1.2). Foi com a isoforma 1 que os experimentos foram desenvolvidos neste trabalho.

Uma das isoformas de septina 4 chamada ARTS (apoptosis-related protein in the TGF- β signalling pathway) foi identificada por estar envolvida em uma das vias de ativação da morte celular programada por TGF- β (Fator de crescimento transformador beta). ARTS é uma proteína que se localiza na mitocôndria sendo translocada para o núcleo no começo da

apoptose. Esta isoforma possui apenas 274 aminoácidos, possui uma deleção de 21 resíduos no N-terminal quando comparado a isoforma 1 e tem um C-terminal composto de 27 resíduos não encontrado em outras isoformas (LARISCH et al., 2000) e (GOTTFRIED et al., 2004).

A diversidade no padrão de isoformas expressas em diferentes tipos celulares ressalta a possibilidade de diferentes e especializadas funções estarem sendo exercidas pela SEPT4. O envolvimento da SEPT4 em algumas patologias também já foi descrito na literatura. Por exemplo, Kinoshita em 1998 descreveu a presença e acúmulo das septinas 1, 2 e 4 em neurofibrilas e fibrilas gliais da proteína tau presentes em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer (KINOSHITA et al., 1998). Além disso, exames imunohistoquímicos de tecidos cerebrais de pacientes acometidos pela doença de Parkinson e outras sinucleopatias mostraram a colocalização da SEPT4 em corpos de inclusão conhecidos como Lewy bodies (figura 1.7) (IHARA et al., 2003). Tais resultados parecem indicar o envolvimento da SEPT4 com desordens neurodegenerativas.

1.5 - Alfa-sinucleína

A α -sinucleína é uma proteína abundantemente encontrada no cérebro. Estima-se que 1% de toda proteína citosólica solúvel no cérebro seja α -sinucleína (UVERSKY, 2007). Ela é encontrada nos terminais nervosos próximos as vesículas sinápticas e está envolvida com a plasticidade das sinapses e liberação de neurotransmissores. No entanto, maiores detalhes sobre suas funções ainda não foram elucidados. A α -sinucleína é uma proteína pequena, composta de apenas 140 aminoácidos, em sua seqüência podemos observar sete cópias de uma repetição não usual de 11 resíduos incluindo um motivo hexamérico conservado (KTKEGV). O N-terminal forma α -hélices anfipáticas, parecidas com o domínio de ligação a lipídio das apolipoproteínas e seria uma possível região de interação com lipídios de membrana (ULMER et al., 2005) ;(WOODS et al., 2007). Há também uma região central hidrofóbica entre os resíduos 61-95, e os últimos 30 aminoácidos formam uma região altamente carregada, rica em resíduos ácidos e prolinas (UVERSKY, 2007).

A α -sinucleína pode ser denominada uma proteína intrinsecamente desenovelada, que não possui nem estrutura secundária e nem terciária definidas. Contudo esse padrão muda quando ela se associa com membranas ou mesmo micelas, preferencialmente micelas

negativamente carregadas. Nessa situação os 100 primeiros aminoácidos se organizam em hélices anfipáticas que interagem com a membrana como mencionado acima e os últimos 40 aminoácidos permanecem não estruturados (ULMER et al., 2005). Outra conformação adotada pela α -sinucleína ocorre em seu estado agregado, no qual se observa a formação de fitas β amilóides, formas fibrilares que são encontradas, por exemplo, nos corpos de Lewy presente em cérebros de pacientes com Parkinson.

O papel da α -sinucleína em doenças neurodegenerativas começou a ser estabelecido quando se descobriu que mutações no gene da α -sinucleína eram encontradas em casos familiares da doença de Parkinson e que animais transgênicos expressando a α -sinucleína ou seus mutantes apresentavam fenótipos parecidos com os encontrados em pacientes afetados pela doença (IHARA et al., 2003). A α -sinucleína é também o maior componente fibrilar encontrado nos corpos de Lewy. Tais agregados fibrilares estão associados a doenças como Parkinson, Alzheimer, Síndrome de Down e Atrofia sistêmica múltipla (WOODS et al., 2007) (UVERSKY, 2007) ;(SITZ et al., 2008). A presença das estruturas fibrilares da α -sinucleína é um dos atributos observados para confirmação do diagnóstico da doença de Parkinson (MORAN et al., 2007).

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum afetando entre 1 a 2% da população acima de 65 anos (MORAN et al., 2007). A causa dessa doença ainda não é bem conhecida e possui muitas variações. Pode-se identificar uma forma familiar, a qual está associada a algumas mutações no gene da α -sinucleína e parkina, e a de casos esporádicos, que parecem envolver muitos fatores e geralmente se manifestam em pessoas com mais de 60 anos (STONE et al., 2009). A intensidade dos sintomas pode variar bastante nos casos esporádicos.

Os sintomas decorrentes da doença de Parkinson devem-se a uma forte redução das funções da dopamina no striatum, que é um componente central dos gânglios da base e responsável pela iniciação e controle do movimento. Todo esse processo é iniciado por uma progressiva morte de neurônios localizados na substância negra, que são responsáveis pela produção de dopamina (SHEHADEH et al., 2009).

A história da interação entre SEPT4 e α -sinucleína começa a ser contada quando a SEPT4 foi colocalizada com a α -sinucleína nos corpos de Lewy encontrados no cérebro de pacientes acometidos pela doença Parkinson (IHARA et al., 2003). Os dados apresentados na literatura mostram uma interação entre as duas proteínas. In vitro, quando ambas as proteínas são

coexpressas em cultura de células de neuroblastoma e fibroblasto de camundongo e realizado um experimento de imunoprecipitação, α -sinucleína e SEPT4 coprecipitam juntas. Além disso, este mesmo trabalho mostra que quando ambas são coexpressas em cultura de células, uma maior quantidade de α -sinucleína forma agregados insolúveis (IHARA et al., 2003), ou seja, este trabalho sugere que nessa situação não fisiológica a SEPT4 estaria potencializando a agregação da α -sinucleína. Contudo, dados mais recentes sugerem uma interação fisiológica entre as duas proteínas, uma vez que elas se colocalizam em ensaios de imunomarcção. Além disso, as duas são menos expressas no putamen de pacientes afetados pela doença de Parkinson. No mesmo trabalho, outros ensaios sugerem e que a SEPT4 protegeria a α -sinucleína de uma fosforilação na Ser129. Essa fosforilação torna a α -sinucleína mais suscetível a oligomerização e, portanto a interação com a SEPT4 protegeria a α -sinucleína da oligomerização (IHARA et al., 2007). Em outro estudo realizado com uma corte de cérebros de pacientes afetados pela doença de Parkinson, foi detectada uma diminuição na expressão do mRNA tanto da SEPT4 como da α -sinucleína na região da substância negra e da amígdala. Imunomarcções semiquantitativas realizadas na região da substância negra mostrou um aumento maior do que 10 vezes da SEPT4 e α -sinucleína quando comparado aos controles (SHEHADEH et al., 2009). Tudo indica que na doença de Parkinson há uma mudança no perfil de expressão de ambas as proteínas, mas se isso é uma causa ou consequência da doença ainda não foi esclarecido.

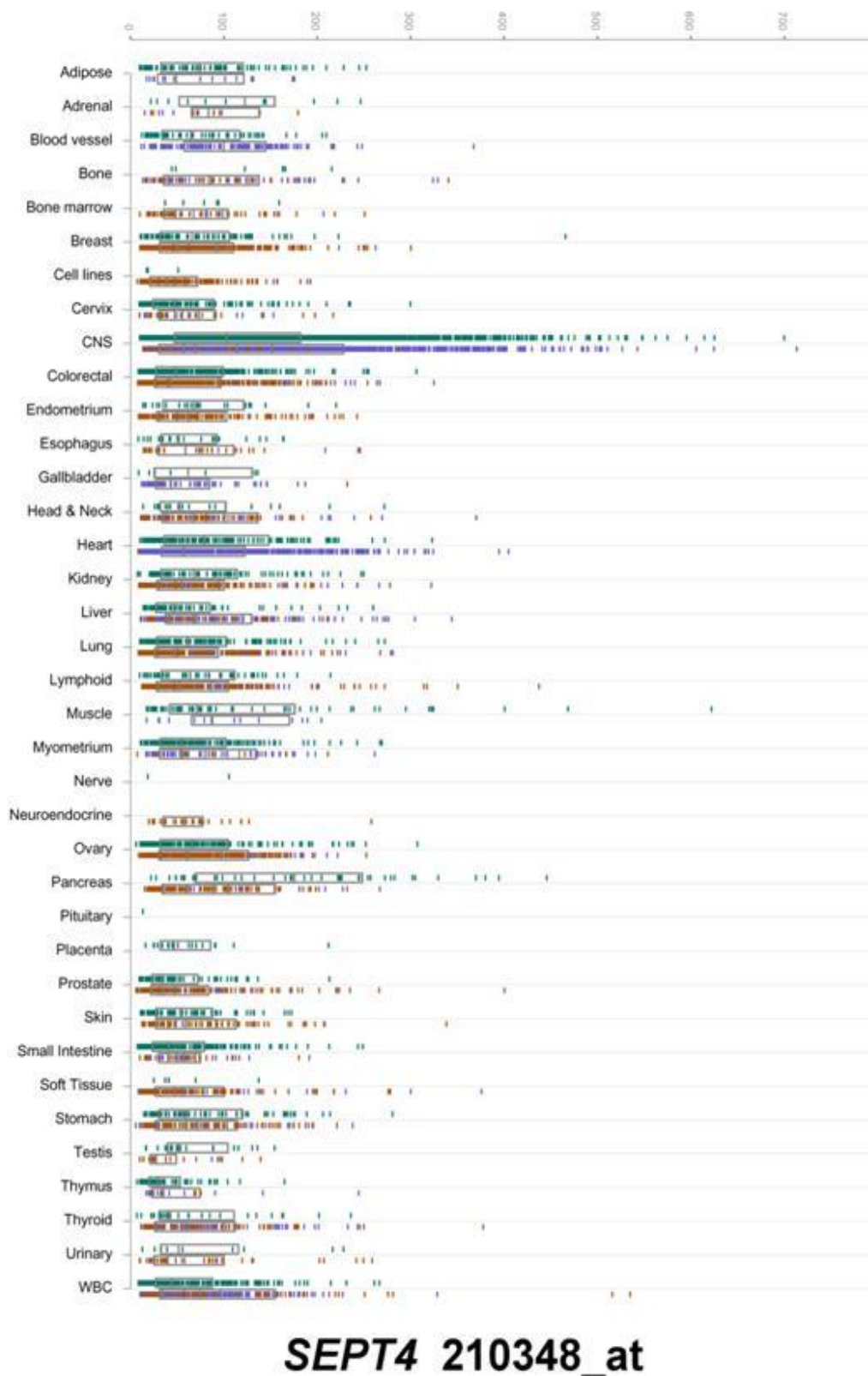


Figura 1.6. Northern Blot eletrônico mostrando o padrão de expressão da Sept 4. Cada ponto representa uma amostra de um paciente. Os pontos verdes são as amostras de tecidos normais, as azuis são de indivíduos doentes, mas não neoplásicos e as vermelhas de tecidos que apresentavam neoplasia. Esta figura foi retirada do suplementos do artigo publicado por (HALL et al., 2005).

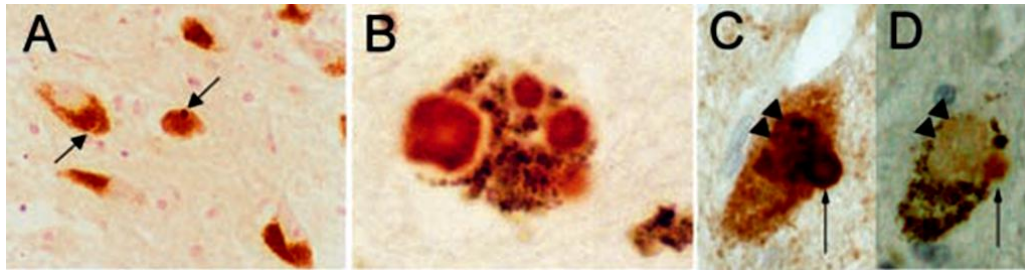


Figura 1.7. Imunomarcações para a SEPT4 e α -sinucleína de secções do cérebro de pacientes com a doença de Parkinson. A e B, células nervosas marcadas positivamente para a SEPT4, as setas indicam os corpos de Lewy (LBs). C e D, secções mostrando as células nervosas com os LBs imunomarcadas para a α -sinucleína (C) e para a SEPT4 (D). Figura retirada da referência (IHARA et al., 2003)

Como relatado os dados sobre a interação entre a α -sinucleína e SEPT4 são escassos e de certa forma contraditórios. Não há informações sobre detalhes moleculares da interação e nem de que regiões das proteínas estariam envolvidas. A compreensão de como estas duas proteínas estão interagindo pode fornecer informações importantes sobre suas funções nas células assim como no desenvolvimento da doença. Tudo isso abre uma oportunidade para o estudo de como ocorre a interação dessas duas interessantes proteínas, sobretudo de um ponto de vista estrutural.

2.1 OBJETIVOS

As septinas humanas parecem estar envolvidas em uma grande diversidade de processos celulares, porém pouco ainda é entendido sobre tais funções. A Septina 4 (SEPT4) humana é majoritariamente expressa em tecidos do sistema nervoso central e há indícios de que ela está envolvida na dinâmica de tráfico de vesículas e interage com a membrana plasmática. Por outro lado, a sua maior expressão em alguns tipos de câncer e o fato que uma de suas isoformas está envolvida com a ativação da apoptose indica também funções relacionadas ao ciclo celular. Como não foi resolvida nenhuma estrutura tridimensional da SEPT4, a determinação da estrutura dessa septina seria relevante e esse foi um dos objetivos primeiros desse trabalho. Além disso, há interesse em conhecer melhor as funções da SEPT4 e identificar a sua rede de interações, o que se tornou outro objetivo principal deste trabalho. Ainda na temática de interações, uma já descrita na literatura para SEPT4 é com a α -sinucleína o que sugere seu possível envolvimento com a doença de Parkinson. No entanto, as informações dessa interação são escassas e não há nenhuma descrição dos detalhes moleculares. Caracterizar melhor esta interação se tornou outro foco deste trabalho. Por estes motivos os objetivos específicos desse trabalho de mestrado foram:

- I. Expressão e purificação da SEPT4;
- II. Determinar a rede de interação da SEPT4 através da técnica de duplo-híbrido;
- III. Realizar o estudo da interação da SEPT4 com a α -sinucleína.
- IV. Realizar ensaios de cristalização para obtenção de cristais da SEPT4;

3 Metodologia

PARTE I – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA SEPT4

3.1 Subclonagem no vetor pETTEV

O gene da septina 4 já havia sido subclonado para expressão em *E. coli* durante o trabalho de doutorado de Wanius Garcia (SILVA, 2005). Para tal expressão a proteína SEPT4 foi clonada no vetor pGEX-5X-1, no qual está fusionada a proteína carreadora Glutathione S-transferase (GST).

Como a expressão nesse vetor apresentava um baixo rendimento pensamos que talvez o uso de outros vetores pudesse melhorar a expressão da proteína. Optamos, então, pelo vetor pETTEV (Novagen) no qual a proteína estaria fusionada apenas a uma cauda de seis histidinas. O vetor pETTEV é igual ao vetor pET28a da Novagen, exceto pela região que codifica os aminoácidos reconhecidos pela protease trombina, a qual foi substituída pelos aminoácidos reconhecidos pela TEV protease. Para realizar esta subclonagem oligonucleotídeos Sept4sense*Bam*HI e Sept4antisense*Xho*I foram desenhados para que o gene da septina 4 pudesse ser transferido para o vetor pETTEV (Tabela 3.1).

A reação de PCR foi preparada com as seguintes proporções e com a seguinte seqüência de temperatura e tempo: 94°C/ 5min - (94°C/1min30s – 52°C/1min – 68°C/1min30s) x 30 ciclos - 68°C/7min:

- ✓ 5 µl tampão 10X com MgCl₂ High Fidelity (Fermentas)
 - ✓ 1 µl DNTPs 10mM
 - ✓ 1 µl sept4sense*Bam*HI
 - ✓ 1 µl sept4antisense*Xho*I
 - ✓ 0,2 µl Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
 - ✓ 1 µl DNA template (vetor com o cDNA da septina 4)
 - ✓ 40,8 µl água
- Total: 50µl

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para retirar restos de enzima e oligonucleotídeos. O fragmento de PCR foi então submetido a restrição com a enzima *Bam*HI (Promega) segundo as instruções do fabricante. Ao final da reação, a mesma foi submetida a análise em gel de agarose 0,8%. A banda foi recortada e eluída usando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Uma nova reação de clivagem foi realizada com a enzima *Xho*I (Fermentas) segundo instruções do fabricante. A banda correspondente a gene da Sept 4 foi identificada em gel de agarose 0,8% e eluída com o mesmo kit citado acima.

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos usados neste trabalho. Destacado em vermelho os sítios de restrição.

Sept4sense <i>Bam</i> HI	ATTGGATCCATGGACCGTTCACTG
Sept4antisense <i>Xho</i> I	GCCTCGAGTTAATAGTTCTCCTTC
Sept4fowY2H(<i>Bam</i> HI)	AGGATCCGTATGGACCGTTCACTGGG
Sept4revY2H(<i>Pst</i> I)	TGGCTGCAGTTAATAGTTCTCCTTCATCTG
<i>Bam</i> HI/DOM1sense	CGGGATCCTGTATGTGGGCTTTGCAACC
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Após purificar e quantificar o inserto foi preparada uma reação de ligação com o vetor pETTEV que havia sido previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. A reação foi incubada a 4 °C por 12 horas.

- ✓ 3 µl pETTEV
- ✓ 4 µl inserto
- ✓ 1 µl água
- ✓ 1 µl tampão 10x Ligase (Fermentas)
- ✓ 1 µl T4 DNA Ligase (Fermentas)

Todo o sistema de ligação foi transformado por choque térmico em *E.coli* DH5α (SAMBROOK et al., 1989). As colônias que cresceram na placa foram transferidas para 5ml de meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl) com 50 µg/ml de kanamicina. O DNA plasmidial foi purificado com o kit Wizard (Promega) conforme

instruções do fabricante. Para confirmação da clonagem uma reação de PCR preparada usando como molde o DNA purificado das colônias foi realizado e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Na colônia 3 uma banda na altura esperada foi observada. O plasmídeo pTETEVSept4 purificado foi então submetido ao sequenciamento.

3.2 Expressão da SEPT4 em *E. coli*

Uma vez confirmado pelo sequenciamento que a seqüência inserida no vetor pETTEVSept4 estava correta e que não haviam mutações, começaram os teste de expressão.

O vetor pETTEVSept4 foi transformado por choque térmico nas células de *E.coli* BL21(DE3). Algumas colônias foram transferidas para 5ml de meio LB depois de crescer o pré-inóculo, o mesmo foi inoculado em 50 ml de meio LB acrescido de 50 µg/ml de kanamicina. As bactérias cresceram a 37°C até atingirem a D.O₆₀₀=0,7. A temperatura foi reduzida a 20°C e realizada a indução com 0,4 mM de IPTG por 12 horas. Alíquotas de 100 µl foram retiradas a cada 2 horas, centrifugadas, descartado o excesso de sobrenadante e ressuspensas em tampão de amostra desnaturante. Todas foram analisadas em SDS-PAGE 15%, no qual foi possível observar uma banda correspondente ao tamanho esperado de aproximadamente 55kDa. Ao final da indução as bactérias foram ressuspensas em 5 ml tampão (Tris 50mM pH 8,0 e 100mM de NaCl), sonicadas e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. O pellet e sobrenadante foram separados e também analisados em SDS PAGE 15%.

Uma vez confirmada a expressão, o próximo passo foi a expressão em larga escala. Um pré-inóculo de 5 ml com BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pETTEVSept4 foi inóculado em 500ml de meio LB com 50µg/ml de kanamicina. As bactérias foram crescidas e induzidas nas mesmas condições descritas acima.

Ao final da indução as bactérias foram centrifugadas a 6000 rpm por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 10 ml de tampão (Tris 50mM pH 8,0, 100mM de NaCl e 10% de glicerol). O volume de células foi submetido a sonicção 10 vezes (20 segundos sonicando - 40 segundos de intervalo sempre em gelo). Após lisadas as células foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos para separar as frações

solúvel e insolúvel. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna com 1ml da resina Ni-NTA sepharose (Quiagen). A resina foi lavada com 10 volumes de tampão acrescidos de 5mM e 10mM de imidazol e crescentes concentrações de imidazol foram testadas para realizar a eluição da proteína, mas em nenhuma das concentrações foi observado a banda correspondente a SEPT4.

Com o intuito de melhorar a solubilidade e rendimento da SEPT4, foi utilizada outra cepa “Arctic cells” (Stratagene). Essa cepa possui duas chaperonas Cpn10 e Cpn60 da bactéria psicrófila, *Oleispira antarctica*. Diferentemente das chaperonas de *E. coli*, que tem sua atividade reduzida a baixas temperaturas, estas chaperonas tem sua atividade ótima na faixa de 4 a 12°C (Catálogo ArcticExpress™ RIL Competent Cells and ArcticExpress™ RP Competent Cells - Stratagene). As instruções para expressão foram seguidas conforme as recomendações do fabricante. As amostras da expressão e purificação na coluna de afinidade foram analisadas em SDS PAGE 15%. A banda da SEPT4 não foi detectada nas frações eluídas.

3.3 Expressão em células de inseto

A expressão em células de insetos faz uso de um robusto sistema eucariótico, que oferece modificações pós-traducionais, podendo contribuir para um ambiente celular adequado para o correto enovelamento e atividade da proteína. Além disso, a manutenção de uma cultura de células de insetos é mais simples e menos cara que células de mamíferos.

Baculovírus são vírus que infectam artrópodes, em sua grande maioria insetos. Os vírus da família Baculoviridae são patogênicos a muitos insetos pragas, entre eles lepidópteros pragas de culturas como milho e soja, e por isso baculovírus foram vastamente usados como controle de praga. O baculovírus *Anticarsia gematalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) patogênico a *Spodoptera frugiperda*, uma praga importante para as lavouras de soja, foi utilizado no maior projeto nacional de uso de bioinseticida para controle de pragas (OLIVEIRA et al., 2006).

Para o desenvolvimento de baculovírus mais eficientes no controle de insetos praga muito começou a ser estudado de sua biologia molecular. Sua utilização como ferramenta

biotecnológica começa no início da década de 80 e sua utilização para expressão de proteínas heterólogas recombinantes vem sendo desenvolvida (O'REILLY et al., 1992)

O sistema de expressão em células de insetos via baculovírus oferece algumas interessantes vantagens. Baculovírus são vírus de genomas grandes e por isso podem acomodar inserções grandes em seu genoma sem apresentar instabilidade e perda dos fragmentos inseridos. Baculovírus possui duas formas infectivas diferentes em seu ciclo de vida que refletem sua estratégia de infecção em diferentes ambientes. Uma de suas formas é conhecida como *Budded vírus* (BV) que é o vírus extracelular responsável pela transmissão célula a célula dentro dos tecidos do inseto infectado. Sua outra forma os *occlusion bodies* (OB) ou vírus oclusos, na qual vários nucleocapsídeos são envolvidos por matriz protéica composta majoritariamente por proteínas expressas no final da infecção. Os vírus oclusos são dispersos no ambiente e podem infectar outras larvas que ao ingerir o vírus, sua matriz protéica é dissolvida dentro do intestino das larvas, e os nucleocapsídeos são liberados para serem endocitados pelas células do intestino e começar uma nova infecção.

A infecção em baculovírus pode ser dividida em etapas, sendo expressas na fase tardia as proteínas que fazem parte da matriz que envolve os nucleocapsídeos nos vírus oclusos. Dentre essas proteínas está a Poliedrina. Trata-se de uma proteína altamente expressa na fase final da infecção podendo corresponder a 30% ou mais de toda proteína produzida nesta fase. Por esse motivo o locus da *poliedrina* é vastamente utilizado para expressão heteróloga em baculovírus.

3.4 Subclonagem da Sept4 no plasmídeo para expressão em células de inseto

Com as dificuldades encontradas para expressar a SEPT4 em *E. coli* era necessário tentar novas alternativas. O sistema escolhido foi expressão em células de inseto via baculovírus. Para construção do baculovírus recombinante foi utilizado o sistema comercial Bac-to-Bac (Invitrogen).

O plasmídeo utilizado para construção do baculovírus recombinante foi o pFastBacHTB (Invitrogen), pois este plasmídeo possuía a mesma fase de leitura que o pETTEV e sítios de clonagem compatíveis o que permitiu a utilização dos mesmo

oligonucleotídeos desenhados para a clonagem no pETTEV. O plasmídeo pFastBacHTB é um vetor que permite que o inserto de interesse seja depois transferido por um mecanismo de transposição para o genoma do baculovírus AcMNPV presente na forma de um plasmídeo (Bacmídeo) dentro de uma *E.coli* (DH10-Bac, Invitrogen). Neste vetor o gene de interesse deve ser inserido nos sítios presentes na região de multiclonagem e estar posicionados entre os sítios de transposição, logo após o promotor da poliedrina.

Uma reação de ligação foi preparada com o mesmo inserto utilizado na subclonagem no pETTEV e o vetor pFastBacHTB que havia sido previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I (Promega e Fermentas) segundo as instruções do fabricante. A reação foi incubada a 4 C° por 12 horas.

- ✓ 2 µl pFastBacHTB (40ng)
 - ✓ 4 µl inserto (50ng)
 - ✓ 0,2 µl água
 - ✓ 0,8 µl tampão 10x Ligase (Fermentas)
 - ✓ 1 µl T4 DNA Ligase (Fermentas)
- Total: 8µl

O sistema de ligação foi transformado por choque térmico em *E. Coli* DH5α. A transformação foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100µg/ml do antibiótico ampicilina. As colônias que cresceram foram amplificadas em meio LB e seu DNA plasmidial extraído. Para confirmação da clonagem foi realizado uma reação de PCR com os oligonucleotídeos Sept4sense*Bam*HI e Sept4antisense*Xho*I conforme descrito para a amplificação da Sept4. A clonagem também foi confirmada pela restrição com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. Assim obtivemos sucesso na construção do vetor pFastBacSept4.

Ao usar o sistema Bac-to-Bac para a construção do baculovírus recombinante é necessário que primeiro se contrua um bacmideo recombinante. Para contrução do bacmidio foi utilizada uma linhagem de *E.coli* denominada DH10Bac (Invitrogen), na qual foi inserido o genoma completo do baculovírus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV, na forma de um plasmídeo. O bacmídeo possui um sítio de inserção do transposon Tn7 no locus do gene da poliedrina. Há também outro plasmídeo presente na bactéria chamado de plasmídeo ajudante “helper”, que codifica transposases responsáveis pelo evento de tranposição entro o plasmídeo doador, no caso o pFastBacSept4 e o genoma do baculovírus inserido no bacmídeo (figura 3.1).

O plasmídio pFastBacsept4 foi utilizado na transformação por choque térmico da linhagem de *E. coli* DH10Bac seguindo as orientações do fabricante (Catálogo Bac-to-Bac Expression System - Invitrogen). A seleção das colônias transformadas é possível porque as bactérias onde houve a transposição são resistentes à tetraciclina, kanamicina (genes de resistência presentes na DH10Bac) e gentamicina (gene de resistência presente apenas nas bactérias onde o evento de transposição obteve sucesso). Outro teste realizado para confirmar o evento de transposição foi testar a atividade da enzima β -galactosidase. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos necessários mais 40 μ g/ml de IPTG e 100 μ g/ml de X-gal. Quando o evento de transposição ocorre com sucesso, o gene da β -galactosidase é interrompido o que impediria a produção da enzima. Conseqüentemente, o substrato da enzima, no caso o análogo X-gal, não é hidrolisado e assim as colônias permaneciam brancas. Portanto, as colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 50 ml de meio LB e o bacmídeo foi extraído seguindo orientações do fabricante com o Kit S.N.A.P. MidiPrep (Invitrogen).

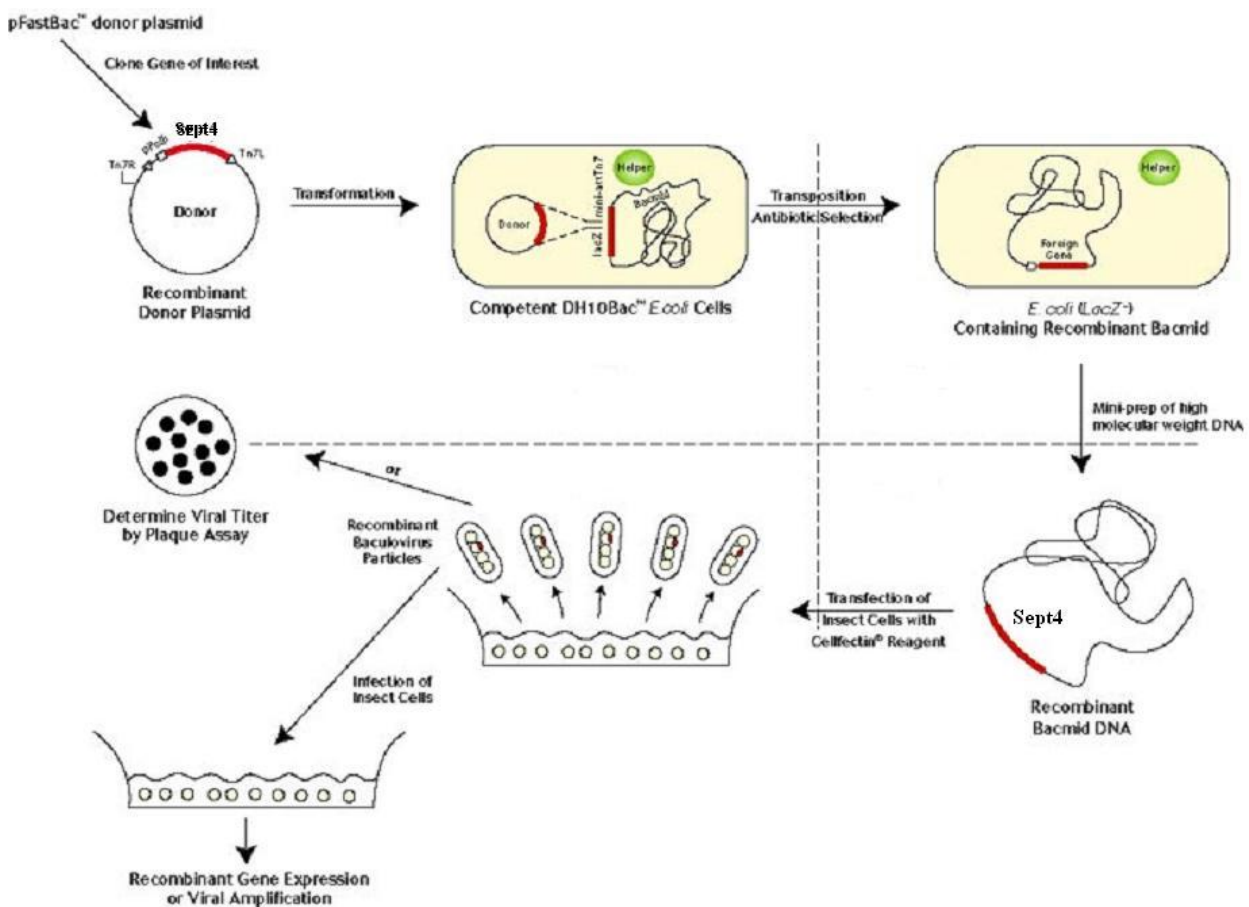


Figura 3.1. Esquema das etapas para construção do baculovírus recombinante AcSept4. Figura adaptada do catálogo Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen)

A confirmação da inserção do gene da Sept4 no genoma do baculovírus foi feita por uma reação de PCR, uma vez que se trata de um plasmídeo de alto peso molecular e baixo número de cópias. Nesse PCR foram usados os oligonucleotídeos Sept4sense*BamHI* e M13 Reverse (tabela 3.1). Este oligonucleotídeo anela-se aproximadamente a 600 pb posteriores ao sítio de transposição. Utilizando essa combinação de oligonucleotídeos, se ocorrer o evento de transposição a banda esperada deve possuir aproximadamente 2000pb. A reação foi preparada conforme recomendado pelo fabricante (Catálogo Bac-to-Bac Expression System - Invitrogen).

3.5 Obtenção dos baculovírus recombinantes

Aproximadamente 0.5×10^6 células de *Spodoptera fugiperda* Sf-9 em cultura foram transferidas para uma placa de poliestireno de 35mm de diâmetro. Em outra placa, 1 µg do bacmideo Bacsept4 foi diluído em 0.5 ml de meio TC-100 sem soro ao qual foi adicionado 10µl dos lipossomos Cellfectin Reagent (Invitrogen) e incubado por 15 minutos. Após esperar 1 hora ocorreu a formação de uma monocamada das células e o meio de cultura foi substituído pela mistura de meio TC-100 sem soro com o BacSept4 e lipossomos e esta solução foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo a suspensão DNA/lipossomos foi substituída por meio TC-100 com 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas à 28°C por 7 dias. Durante esses dias as células foram observadas procurando sinais de infecção que indicassem o sucesso da transfecção. Ao final, o sobrenadante que continha o Baculovírus recombinante AcSept4 foi recuperado e amplificado em outras infecções de células Sf-9.

Para que fosse confirmada a presença do baculovírus recombinante AcSept4, aproximadamente 1×10^6 de células Sf-9 foram infectadas com 150µl do sobrenadante das células transfectadas pós 7 dias. As células foram incubadas por 72 horas a 28°C. Ao final da infecção as células foram ressuspensas e centrifugadas a 500xg por 5 minutos. O pellet de células foi ressuspenso em 10 ml de tampão PBS (10 mM de Na_2HPO_4 , 2 mM de KH_2PO_4 , 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl pH 7,4) e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Ao final, as células foram ressuspensas em 2 ml do tampão PBS. Uma alíquota de 40µl foi retirada, a qual foi adicionado 20µl de tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE. Os

controles negativos, Sf-9 sem infecção e Sf-9 infectadas com o vírus selvagem AcMNPV, foram produzidos da mesma maneira. Todas as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% e a western blot com o anticorpo anti-penta His (Quiagen). O Western Blot foi realizado conforme as orientações presente no catálogo QIAexpress® Detection and Assay Handbook (Quiagen). O vírus recombinante AcSept4 foi submetido a mais dois ciclos de amplificação em células Sf-9 sendo que no último ciclo a quantidade de célula infectadas foi de aproximadamente 15×10^6 , pois era necessário um grande estoque viral para realizar uma titulação.

A titulação do vírus foi realizada da seguinte forma. Aproximadamente 1×10^6 de células Sf-9 foram crescidas em placas de 6 poços e a cada poço foi adicionado quantidades diferentes da solução estoque de vírus: 400, 200, 80, 40, 27, 20, 16, 13, 12 e 10 μ l. As placas foram incubadas por 72 horas e ao final as células de cada poço foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE e western blot com o anticorpo anti-penta His (Quiagen). Ao final calculamos que aproximadamente 10 μ l de estoque viral por 1×10^6 de células era suficiente para produção da proteína.

3.6 Ensaio de expressão em células de inseto e purificação

Aproximadamente 15×10^6 de células Sf-9 foram crescidas em garrafas de poliestireno com 75 cm^2 . Foram adicionados 150 μ l do estoque viral AcSept4 e as células foram incubadas por 48 horas a 28°C. Ao final foram recuperadas por centrifugação como já descrito, lavadas com tampão PBS e ressuspensas em 10 ml de tampão PBS acrescido dos inibidores de protease (1 mM de PMSF, 1 μ M de leupeptina e 10 μ M de pesptatina). As células foram lisadas por ultra-som (sonicação) 10 ciclos 20 segundo de sonicação e 40 segundos de intervalo sempre em banho de gelo. A fração solúvel foi separada por centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna com 2 ml da resina de Ni-NTA sepharose (Quiagen). A resina foi lavada com 10 volumes de tampão e posteriormente com tampão acrescido de 10 mM e posteriormente com 20 mM de imidazol. Ao final foram testados concentrações crescentes de imidazol para realizar a eluição da proteína, porém nenhuma banda foi detectada quando as amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

Devido a essa aparente não ligação da proteína a resina foi preciso testar se a cauda estava presente e não se tratava de algum problema com a não existência da cauda ou ao seu processamento por proteases. Para isso foi repetida a expressão, porém o tampão de lise utilizado foi o tampão PBS acrescido de 1 M de uréia. A lise foi realizada na mesma maneira. A resina foi lavada com 10 volumes de tampão PBS acrescido de 10 mM e 20 mM de imidazol. Ao final a proteína foi eluída com 200 mM de imidazol em tampão PBS. Desta vez quando analisada por SDS-PAGE foi possível detectar uma banda na altura esperada.

Como a cromatografia de afinidade apresentou dificuldades para a purificação da proteína, uma vez que apenas em condições parcialmente desnaturantes a proteína se ligou a resina, optou-se, por testar alternativas de purificação que mantivessem a SEPT4 em sua condição nativa. A expressão foi realizada na mesma maneira, porém dessa vez o tampão de lise foi 50mM de tris pH 7,5 acrescido dos inibidores de protease. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca iônica com 40 ml de resina Q-sepharose (Amershan/GE) e a coluna foi submetida a um gradiente linear de 0 a 1M de NaCl. Quando analisadas por SDS-PAGE algumas frações apresentaram um grau de pureza razoável. Essas frações foram reunidas e concentradas em um concentrador com membrana de corte de 30KDa da Milipore. Após concentrada, a proteína foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular Superdex 200 Hiload 16/60 pré equilibrada com o tampão 50mM tris pH7,5 e 100mM de NaCl e a um fluxo de 1 ml por minuto. As frações eluídas estavam muito diluídas e por isso foram concentradas para um volume que permitisse a visualização no SDS-PAGE 15%.

PARTE II – TRIAGEM DE NOVAS INTERAÇÕES DA SEPT4 POR ESTUDOS DE DUPLO HÍBRIDO

3.7 Duplo Híbrido

A técnica de duplo híbrido permite o estudo de interações proteína-proteína baseado no princípio de que fatores de transcrição são em geral formados por dois domínios. Um domínio é responsável pelo reconhecimento da sequência de DNA e ligação ao mesmo e o

outro é o domínio de ativação, o qual é reconhecido pela maquinaria de transcrição e ativa a expressão do gene por ele regulado. Em muitos fatores de transcrição esses dois domínios podem ser separados e continuam funcionais desde que eles estejam fisicamente próximos sem, contudo estarem covalentemente ligados (VAN CRIEKINGE; BEYAERT, 1999).

Com essa descoberta sistemas comerciais que utilizam o fator de transcrição GAL4 foram desenvolvidos. Ao domínio de ativação GAL4 de levedura são fusionados as presas, que são normalmente cDNA de RNA mensageiros expressos em um determinado tecido ou organismo, a esse conjunto de presas denominamos a biblioteca. Ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição é clonado o que chamamos de isca, que é a proteína para qual desejamos encontrar as interações. Neste trabalho, o domínio de ligação de DNA utilizado foi o LexA de *E. coli*, o qual também pode ser reconhecido pelo domínio de ativação GAL4 de levedura.

3.8 Subclonagem no vetor para duplo híbrido

O vetor escolhido para a realização do duplo híbrido foi o pBTM116 que possui o domínio de ligação a DNA Lex-A. O gene da Sept 4 foi amplificado com oligonucleotídeos (tabela 3.1) desenhados com sítios de *Bam*HI e *Pst*I compatíveis com tal vetor e de forma que a septina 4 esteja fusionada ao domínio de ligação ao DNA Lex-A.

A reação de PCR foi realizada com as seguintes proporções:

- ✓ 5 µl tampão 10X com MgCl₂ High Fidelity (Fermentas)
 - ✓ 1 µl DNTPs 10mM
 - ✓ 1 µl Sept4fowY2H(*Bam*HI)
 - ✓ 1 µl Sept4revY2H(*Pst*I)
 - ✓ 0,2 µl Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
 - ✓ 1 µl DNA template (vetor com o cDNA da septina4)
 - ✓ 40,8 µl água
- Total: 50µl

O fragmento amplificado de aproximadamente 1,4Kb foi inserido no vetor pTZ57 (Fermentas) conforme as instruções do fabricante. Após a confirmação da subclonagem, o DNA plasmidial foi purificado com o Kit Wizard (Promega). O plasmídeo pTZSep4Y2H foi submetido a reação de restrição para liberação do inserto, nas seguintes condições:

- ✓ 5µl plasmídeo pTZSept4Y2H
- ✓ 2µl tampão H (Promega)

- ✓ 2µl BSA 10mg/ml
 - ✓ 1,2µl *Bam*HI (Promega)
 - ✓ 1µl *Pst*I (Promega)
 - ✓ 8,8µl água
- Total: 20µl

A restrição foi analisada em gel de agarose 0,8%. A banda liberada correspondente ao gene da septina 4 foi recortada e eluída com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. O inserto foi então ligado ao vetor pBTM116 que havia sido previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I:

- ✓ 4µl vetor pBTM116 (50ng)
 - ✓ 5,8µl inserto sept4Y2HI (60ng)
 - ✓ 1,2µl tampão 10X (Promega)
 - ✓ 1,0µl T4DNA ligase (Promega)
- Total: 12µl

Células de *E. coli* DH5α competentes foram transformadas por choque térmico com 6 µl dessa ligação. A subclonagem foi confirmada por restrição com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I. O plasmídeo pBTMSept4NGC gerado foi seqüenciado para confirmação da fase de leitura com o Lex-A e se não havia mutações. Após a seqüência ter sido confirmada pudemos começar os ensaios com as leveduras.

3.9 Transformação em pequenas escala de levedura

Uma placa de meio YPD sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 1,8% de ágar) foi preparada na qual foram semeadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da cepa L40, a qual possui o genótipo *MATa his3D200 trp1-901, leu2-3,112 ade2 lys2-801am LYS2::(lexAop)4-URA3::(lexAop)8-lacZ*. Tal cepa de levedura possui modificações em seu genoma que são usados como marcadores auxotróficos ou como genes repórteres. Os dois genes repórteres: *his3* da via de biosíntese de histidina assim como gene *LacZ* foram colocados sobre o controle da região promotora reconhecida pelo Lex-A.

Tabela 3.2 - Meios de cultura para seleção auxotrófica nos ensaios de duplo-híbrido

Meios de cultura seletivos	SD - W	SD - L	SD - WL	SD - WLH
YNB	6,7g	6,7g	6,7g	6,7g
Glicose	20g	20g	20g	20g
Adenina	0,02g	0,02g	0,02g	0,02g
Leucina	0,03g	----	----	----
Histidina	0,02g	0,02g	0,02g	----
Triptofano	----	0,02g	----	----

As leveduras cresceram 48 horas em uma estufa a 30°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 50 ml de YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose). As leveduras cresceram a 30 °C sob uma agitação de 200 rpm por 24 horas. Ao final das 24 horas alíquotas de 1 ml do crescido foram retiradas para cada transformação. As alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Após retirar o sobrenadante, o pellet de leveduras foi ressuspensão em 200µl do tampão de transformação: (1340µl de polietileno glicol 3350 (50%), 200µl Acetato de Lítio 2M, 200µl TE 10X, 200µl Dithiothreitol (DTT)). A mistura foi submetida a agitação em vortex por 10 segundos e em seguida foi adicionado 0,05 mg do DNA fita simples (DNA de esperma de salmão). A cada tubo foi acrescentado os plasmídeos conforme a tabela (3.3):

Tabela 3.3 - Plasmídios e meios usados na transformação em pequena escala da levedura L40.

	Plasmídios usado na transformação	Meio de cultura seletivos
Tubo 1	200ng pBTMSept4NGC	SD-W
Tubo 2	200ng pBTM116 vazio (controle)	SD-WL
Tubo 3	200ng pBTM116 vazio + 200 ng pGAD (controle)	SD-WL
Tubo 4	1,5µl água (controle)	SD-W

Os tubos foram incubados a 45°C por 40 minutos, agitando-os eventualmente. Ao final do choque térmico os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O pellet foi então ressuspensão em apenas 100µl do tampão de transformação e plaqueado nos respectivos meios seletivos conforme descrito na tabela (3.2) e (3.3).

As placas foram colocadas na estufa a 30°C e incubadas por 3 dias. Após serem incubadas por 3 dias doze colônias foram selecionadas para serem testadas quanto a atividade dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Elas foram replicadas em meio seletivo SD – WH com concentrações crescentes de 3- amino-1,2,4- triazole (3AT) : 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM. O 3AT é um inibidor competitivo da proteína HIS3, que pode inibir possíveis vazamentos da expressão do gene repórter.

Com o intuito de realizar o ensaio da β-galactosidase, no qual o objetivo é verificar se ocorre auto-ativação do gene repórter mesmo sem a presença do domínio de ativação, as colônias foram crescidas em SD-W por dois dias. Posteriormente, elas foram transferidas para o papel de filtro e mergulhadas no nitrogênio líquido por 3 minutos. A membrana foi retirada e embebida em solução do tampão Z (87 mM Na₂HPO₄, 47 mM NaH₂PO₄, 19mM KCl, 1,38 mM MgSO₄, pH 7,0, 0,27% β-mercaptoetanol e 1mg/ml de X-gal) e incubada a 37°C de 30 minutos a 60 minutos.

Ao serem realizados ambos os testes foram observados que os dois genes repórteres estavam sendo ativados sem a presença do domínio de ativação. O teste foi repetido mais duas vezes com colônias de diferentes transformações e em todos foi observada a auto-ativação dos genes repórteres. Devido a este fato, a construção da proteína inteira não pôde ser utilizada para triagem de interações com outras proteínas pelo sistema de duplo-híbrido.

Para que se pudesse dar continuidade ao ensaio era necessário descobrir qual região da proteína era responsável pela auto-ativação. Com isso era necessário tentar diferentes construções da SEPT4 fusionada ao domínio de ligação ao DNA. A primeira tentativa foi feita com a retirada do domínio N-terminal que corresponde aos primeiros 124 resíduos. Para tal construção foram reutilizado oligonucleotídeos que já haviam sido utilizados em outras clonagens, o *BamHI*/DOM1sense e o *Sept4revY2H(PstI)* (tabela 3.1), para amplificar os domínios GTPase e C-terminal da SEPT4, construção chamada de SEPT4GC. Esta construção corresponde aos resíduos 124 até o 478 e foram clonados no vetor pBTM116 fusionado ao domínio de ligação ao DNA Lex-A como já descrito para a proteína inteira.

Após a confirmação da clonagem, o vetor pBTMGC4 foi submetido ao seqüenciamento para confirmação da seqüência e em fase com o domínio de ligação ao DNA Lex-A.

A transformação em pequena escala em levedura foi realizada da mesma maneira que para o pBTMSept4, e após crescidas, as colônias foram submetidas aos ensaios de ativação dos genes repórteres. Contudo, dessa vez não foi observado a auto-ativação. Quando realizado o teste da β -galactosidase as colônias não apresentaram a coloração azul como observado anteriormente.

3.10 Transformação em larga escala de levedura – triagem das interações com a biblioteca de cérebro fetal humano

Com o intuito de identificar proteínas que interagissem com a SEPT4GC pela metodologia de duplo híbrido a biblioteca escolhida para realizar a triagem das interações foi a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano clonada no vetor pACT2 (Clontech, Cat. N° HL4028AH).

Um pré-inoculo da cepa L40 transformada com o vetor pBTMGC4 foi transferido para 150 ml de meio mínimo SD-W e crescido por 16 horas a 30 °C, 250 rpm até atingir uma densidade ótica a 600nm (DO_{600}) igual à 0,91. Neste momento as leveduras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5min e transferidas para 500 ml de meio YPD. As leveduras cresceram a 30°C, 250 rpm até atingir a OD_{600} de 0,56.

As leveduras foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e foram ressuspensas em 500 ml de água MiliQ estéril e submetida a nova centrifugação. O pellet de leveduras foi ressuspenso em 4 ml em TE 1X (10mM Tris pH 7,5 e 1mM EDTA) contendo 0,1M de acetato de lítio. A esta mistura foi adicionado 1mg de DNA carreador (DNA de esperma de salmão desnaturado), 25 μ g da biblioteca de cérebro fetal humano e 30 ml da solução TE 1X acrescido de 0,1 M de acetato de lítio e 40% de polietilenoglicol (PEG) 3350. A solução foi misturada em agitação vortex e incubada a 30 °C por 30 minutos a uma rotação de 200 rpm. Após os 30 minutos as células foram submetidas a choque térmico: 15 minutos à 42°C e posteriormente 3 minutos em gelo.

A suspensão de células foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 5ml de TE 1X e plaqueadas em meio SD-WLH acrescido de 5mM de 3-AT. Um controle negativo (sem a adição da biblioteca de cDNA) e um controle positivo (a mistura de células plaqueada em meio SD-WL) foram feitos em paralelo. As placas foram incubadas a 30°C por até cinco dias.

As colônias que cresceram nas placas foram transferidas para uma nova placa com meio SD-WLH mais 5mM de 3-AT para realização do teste da β -galactosidase. A realização do teste visa confirmar a ativação do gene repórter Lac-Z nas colônias que foram recuperadas da transformação com a biblioteca.

3.11 Isolamento do vetor pACT2

Para que pudéssemos descobrir quais eram as interações que haviam sido recuperadas pela isca Sept4GC, era necessário recuperar o vetor pACT2 com o cDNA de interesse. Como a marca de seleção auxotrófica inserida no vetor pBTM116 é o gene que recupera a capacidade de síntese do aminoácido triptofano e do pACT2 é o recupera a síntese do aminoácido leucina foi realizado a cura do vetor pBTMGC4. Isto consiste na perda do plasmídeo pela levedura por não haver mais pressão seletiva, através do crescimento das colônias recuperadas na transformação em meio com triptofano. As colônias foram crescidas em 5ml de meio SD-L a 30°C por 20 horas. As células crescidas foram centrifugadas a 10.000g por 2 minutos. Após descartar o sobrenadante as células foram ressuspensas em 60 μ l de solução Tris 50mM pH 8,0 e adicionado 20 μ l de liticase (5mg/ml), agitadas em aparelho vortex e incubadas a 37°C por uma hora. Seguido a incubação, foi adicionado 20 μ l de SDS 20% e as células agitadas no vortex por 1 minuto. Para ocorrer a lise celular as células foram submetidas a 10 ciclos de banho em nitrogênio líquido e banho a 42°C e ao final foi adicionado 100 μ l de água MiliQ. Para precipitar a maioria das proteínas e recuperar o DNA plasmidial foi adicionado 200 μ l de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e submetido a forte agitação no vortex por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 20.000g por 1 minuto. Com cuidado, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo eppendorf e adicionados 10 μ l de cloreto de lítio 8M. Em seguida a solução foi homogenizada e acrescentado 300 μ l de etanol absoluto gelado. Essa mistura foi incubada a -20°C por 20 minutos, seguido por uma centrifugação a 20000g por 10 minutos para precipitação do DNA plasmidial. O precipitado

foi lavado com 500 µl de etanol 70% gelado e submetido a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Após descartar o sobrenadante a mistura foi deixada a temperatura ambiente para o restante do etanol evaporar. Depois de seco o DNA plasmidial foi ressuspensão em 30µl de água MiliQ estéril.

Células de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico com os vetores pACT2 dos cDNAs isolados das leveduras. Uma colônia de cada placa foi crescido em 5ml de meio LB acrescido de 50µg de ampicilina e o DNA plasmidial purificado com o Kit Wizard (Promega). O DNA plasmidial foi então enviado para seqüenciamento no seqüenciador automático modelo DNS ABI PRISM 377 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas 2 para confirmação da fase de leitura e subsequentemente comparadas as sequências depositadas no GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo uso do program BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

3.12 Cotransformação

No caso dos resultados positivos, para se confirmar que se trata de uma interação específica era necessário a realização da cotransformação do plasmídeo que contém a isca pBTMGC4 e as presas recuperadas presentes no vetor pACT2 na levedura L40 para realização do teste da β-galactosidase.

A transformação em pequena escala foi realizada como já descrito acima. Foram acrescentado 200ng do vetor pBTMGC4 ou pBTM116 e 200ng dos plasmídios das colônias que tinham o cDNA correspondente as presas: 1, 5, 7, 25, 26, 50, 57 e 76 e as leveduras foram plaqueadas em meio sólido SD-WLH. Após 3 dias de crescimento 3 colonias de cada placa foram transferidas para uma outra placa com meio SD-WLH. Depois de 2 dias as colonias foram transferidas para o papel de filtro para realização do ensaio da β-galactosidase conforme já descrito.

PARTE III – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE SEPT4 E α -SINUCLEÍNA

3.13 Expressão e purificação dos domínios da Sept4 em *E. coli*

Para o estudo da interação da Sept4 com a α -sinucleína a proteína inteira e diferentes domínios da proteína foram utilizados. O domínio N-terminal (resíduos 1 ao 123), o domínio GTPase (resíduos 144 ao 416), os domínios GTPase e C-terminal juntos (resíduos 144 ao 478) e somente o C-terminal (resíduos 417 ao 478) foram clonados no vetor pET28a (Novagen). A SEPT4 inteira (também chamada de NGC) foi clonada no vetor pGEX-5X-1. Eles foram expressos e purificados como descrito em (GARCIA et al., 2006), com exceção do C-terminal no qual modificações no protocolo de purificação foram realizadas.

A purificação do domínio C-terminal da SEPT4 foi realizada da seguinte forma. Após a expressão as bactérias foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio 50mM e NaCl 30mM ou 150mM. A lise celular foi realizada por sonicação por um ultra-som por ciclos 20 segundos de sonicação e 40 segundos de repouso sempre em banho de gelo. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 14.000 rpm. A fração solúvel foi aplicada em uma coluna com 2ml da resina Ni-NTA sepharose (Quiagen). Foram realizadas lavagens com 10 volumes de coluna com o tampão acrescido de 1M de NaCl e posteriormente com tampão contendo imidazol nas concentrações de 10mM, 20mM, 40mM e 50mM. Ao final, a proteína foi eluída com 200mM de imidazol.

A purificação somente com a cromatografia de afinidade já resultava em ótimos graus de pureza. A amostra eluída era dialisada para retirar o imidazol e após a dialise a proteína era alíquotada em pequenas frações e congelada em nitrogênio líquido e estocada no freezer a -80°C.

3.14 Expressão e purificação da α -sinucleína

O plasmídio pT₇Syn que contem o gene da α -sinucleína sobre o controle do promotor T7 foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Débora Foguel. A purificação da proteína

foi realizado como descrito por Conway et al. com algumas modificações (CONWAY et al., 1998)

As bactérias da cepa *E. coli* Rosseta (DE-3) foram transformadas com o vetor para expressão da α -sinucleína. As bactérias foram crescidas a 37°C em meio LB ou M9 até atingirem uma densidade ótica de 0,5. A indução foi realizada com 0.5 mM de IPTG por 4 horas a 37°C. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6.000 rpm por 10 min e ressuspensas no tampão de lise (50mM Tris pH 8,5, 50mM KCl, 5mM de acetato de magnésio). As células foram lisadas por sonicação por ciclos de 20 segundos de sonicação e 40 segundos de repouso sempre em banho de gelo. Após a lise, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. A fração solúvel recuperada foi transferida para um novo tubo e colocada em um banho a 100°C por 15 minutos. Após a fervura a amostra foi submetida à centrifugação nas mesmas condições já descritas. O sobrenadante recuperado foi submetido à precipitação com 50% de sulfato de amônio. A solução foi centrifugada novamente nas mesmas condições e o pellet foi ressuspensado em 3 ml do tampão Tris 20mM pH 7,0 e dialisado contra água destilada. Essa amostra então foi aplicada em uma coluna de Q-sepharose 40 ml equilibrada com 20mM tris pH 7,0 e eluída em uma gradiente de 0 a 1M de NaCl. As frações com a proteína foram reunidas e dialisadas contra água destilada novamente, liofilizadas e guardadas no freezer - 20°C.

3.15 Cálculo da concentração protéica

O cálculo da concentração protéica foi feita com base na absorção ao comprimento de onda de 280 nm, em um espectrofotômetro Hitachi-2001, por meio do coeficiente de extinção teórico (ϵ) calculado a partir da composição dos aminoácidos de cada proteína. Esses dados foram obtidos do programa ProtParam tool, encontrado do servidor ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) (GASTEIGER E., 2005). Os dados para cada proteína usada estão descritos na tabela 3.4.

Somente para o domínio C-terminal foi utilizado um outro método de determinação da concentração protéica, pois como este domínio não possui nenhum triptofano a determinação da concentração pelo coeficiente de extinção apresenta um erro grande. Para este domínio foi

utilizado o método BCA pelo uso do kit BCA Protein Assay kit (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

Tabela 3.4 - Paramêtros das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho

<i>Proteína (resíduos presentes nos domínios)</i>	<i>Massa Molecular (Da)</i>	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	<i>pI (ponto isoelétrico)</i>
Sept4NGC (1-478)	55.098,1	45.470	5,77
Sept4GC*(144-478)	40.950,6	24.785	6,52
Sept4G*(144-416)	33.520,1	23.295	6,25
Sept4N*(1-119)	15.659,9	21.095	5.41
Sept4C*(417-478)	8.913	1.490	9,16
α -sinucleína	14.460,1	5.960	4,67

* com a cauda de histidinas do pET28a

3.16 Medidas de dicroísmo circular da α -sinucleína e Sept4.

A luz plana polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de igual magnitude, um deles tem a rotação anti-horária e o outro no sentido horário. O dicroísmo circular se refere à diferença de absorção entre estes dois componentes. Ao passar por uma amostra se as componentes L e R não são absorvidas da mesma maneira, as combinações das componentes L e R em diferentes magnitudes gera uma onda elipticamente polarizada. O sinal de dicroísmo circular surge quando a luz plana polarizada é aplicada ao uma amostra com atividade ótica, por exemplo, amostras que possuem centros quirais. A diferença entre os tipos de estrutura secundárias encontradas nas proteínas resulta em padrões característicos nos espectros de CD dentro da faixa espectral do UV distante (190-260nm) (KELLY et al., 2005).

O espectropolarímetro utilizado nas análises de dicroísmo circular foi um aparelho JASCO-815 CD Spectrometer. As medidas de dicroísmo circular realizadas com a SEPT4 inteira (NGC) e α -sinucleína foram feitas em tampão Tris 50 mM pH 8,0; 100 mM NaCl e 10% glicerol a 10°C a uma concentração 5 μ M. Primeiro foram realizadas medidas a

Sept4NGC, depois da α -sinucleína e posteriormente das duas juntas em razão molar 1:1. Foram realizadas 8 varreduras no intervalo de comprimento de onda de 198 a 250 nm.

As medidas de dicroísmo circular com as construções SEPT4G e SEPT4GC foram realizadas a 15°C em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4; NaCl 30mM e 10% glicerol. A concentração protéica de ambas as proteínas utilizadas nas medidas foi de 10 μ M. Primeiro foram realizados 8 varreduras com a SEPT4G e SEPT4GC no intervalo de comprimento de onda de 198 a 250nm. Posteriormente, com a α -sinucleína diluída para 10 μ M foram realizadas 8 varreduras e por fim com ambas proteínas juntas com a razão molar de 1:1 no mesmo intervalo. No caso do domínio GTPase foram realizadas medidas na ausência e presença de 2mM de SDS.

As medidas realizadas com o domínio C-terminal foram realizadas em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 40°C) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4 e 30 mM NaCl ou com 150 mM de NaCl. A concentração de ambas as proteínas, α -sinucleína e SEPT4C, eram de 15 μ M e as medidas foram feitas como já descritas para os outros domínios. As medidas foram realizadas também na ausência ou presença de 2 mM de SDS. Para o domínio C-terminal 16 varreduras no intervalo de 198 a 250 nm foram tomadas.

3.17 Medidas de anisotropia de fluorescência

Os experimentos de anisotropia de fluorescência foram realizados na UFRJ pela Dr. Ana Carolina Braga, pesquisadora do grupo da professora Dr. Débora Foguel. As medidas de polarização de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, EUA).

Os experimentos de polarização foram realizados com α -sinucleína marcada com isotiocianato de rodamina (TRITC). A marcação foi realizada com 5mg/ml de alfa sinucleína pura ressuspensa em tampão bicarbonato de sódio pH 9,0. O volume de 20 μ l de TRITC em DMSO foi adicionado à proteína e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Para retirar a rodamina livre a proteína foi lavada 6 vezes em um Microcom 3000Da com tampão fosfato de sódio pH 7,5.

A alfa sinucleína marcada com rodamina foi diluída para 2 μ M em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5. A esta solução foram acrescentadas concentrações crescentes de

SEPT4C na ausência ou na presença de 0,4 mM de SDS no tampão a temperatura ambiente. A excitação foi realizada a 548 nm e a emissão a 572 sendo utilizado o filtro 26-2 na emissão.

3.18 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear da interação α -sinucleína e SEPT4

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica, na qual a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética ocorre entre o núcleo atômico e a componente magnética da radiação. Trata-se de uma técnica que vem crescendo nos últimos anos em grande parte pela melhoria da instrumentação e desenvolvimento de equipamentos que podem gerar altos campos magnéticos. Sobretudo tem ganhado espaço o uso da técnica para resolução de estruturas de proteínas, haja vista o crescimento de estruturas resolvidas por essa metodologia depositadas no PDB (Protein Data Bank). O RMN é uma técnica poderosa capaz de dar informações estruturais em alta resolução a partir de dados coletados com as proteínas em solução, possibilitando a aquisição de informações sobre dinâmica molecular e interações não detectáveis por outras técnicas. Medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas para estudar a interação entre SEPT4 e α -sinucleína.

A α -sinucleína é uma proteína pequena com apenas 140 aminoácidos e se classifica como uma proteína intrinsecamente desenhada. Muito se descobriu sobre a dinâmica e padrões estruturais observados para a α -sinucleína pelo uso da técnica de RMN. As medidas de RMN foram realizadas com o intuito de monitorar se ocorreriam mudanças no espectro da α -sinucleína quando a SEPT4 fosse adicionada. Estudos iniciais foram realizados com o C-terminal da SEPT4 e estendido depois para outras regiões da molécula.

Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrona (LNLS) utilizando um espectrômetro Varian operando a 600 MHz e equipado com sonda criogênica de 5mm e três canais para ^1H , ^{15}N e ^{13}C . Para realizar essas medidas a α -sinucleína foi expressa em meio mínimo M9 (6g/l de Na_2HPO_4 , 3g/l KH_2PO_4 , 0,5g/l de NaCl , 1g/l de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 2g/l de glicose, 1mM de MgSO_4 , 0,1mM de CaCl_2 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina), meio enriquecido com o isótopo ^{15}N . A purificação foi realizada como já descrito.

Estes experimentos foram desenhados para estudar se ocorreria mudança nas frequências dos hidrogênios da proteína marcada com ^{15}N quando fosse adicionada a outra

proteína não marcada. Para observar as frequências dos hidrogênios o tipo de espectro utilizado foi um ^{15}N -HSQC (“Heteronuclear Single Quantum Correlation”) trata-se de um espectro 2D, no qual se pode detectar um pico em determinada frequência para cada hidrogênio ligado a um nitrogênio (NH) seja da cadeia principal ou lateral da proteína.

Os espectros foram realizados em 50 mM tampão fosfato de potássio e 150 mM de NaCl a 25°C quando não indicado outra temperatura. A cada amostra foi adicionado 10% de água deuterada, o sinal emitido pelo deutério é utilizado para padronizar o campo magnético na amostra.

Primeiro foi medido um espectro da α -sinucleína a uma concentração de 200 μM marcada com o isótopo ^{15}N . Posteriormente foi realizada a titulação do domínio C-terminal com as razões molares de 1:1; 1:1,5 e 1:2 (α -sinucleína:SEPT4C).

A α -sinucleína é uma proteína que ao ligar-se a lipídios sofre uma mudança conformacional de uma proteína sem estrutura secundária para uma hélice anfipática que interage com a membrana plasmática. O detergente SDS acima da sua concentração crítica micelar também possui a capacidade de provocar essa transição e ele foi utilizado para isso em algumas medidas. Uma amostra com 100 μM de α -sinucleína marcada com o isótopo ^{15}N foi diluída no tampão, ao qual foi adicionado SDS para uma concentração final de 50 mM, os espectros foram medidos a 25 °C, 30 °C, 37 °C e 40 °C. Posteriormente foi adicionado o C-terminal da SEPT4 na razão molar 1:2 e medido espectros nas mesmas condições que o controle.

Experimentos análogos foram realizados com a SEPT4GC em uma razão molar de 1:1. Porém, neste caso o tampão utilizado foi tampão fosfato de potássio 50 mM, NaCl 30mM e 10% glicerol.

Os espectros foram processados com o programa NMRPipe (DELAGLIO et al., 1995) e visualizados no CcpNmr Analysis (VRANKEN et al., 2005).

3.19 Medidas de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) da interação α -sinucleína e SEPT4

Introdução ao equipamento Biacore[®]

O equipamento Biacore X[®] é um sistema que utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície para monitorar em tempo real as interações entre duas ou mais moléculas. São utilizados chips denominados sensor chips, que consistem de uma superfície de vidro coberta com uma fina camada de ouro, freqüentemente modificada com uma camada de dextrano carboximetilado, que forma um ambiente hidrofílico para a ligação de biomoléculas, preservando-as em um estado não desnaturado.

A tecnologia envolve a ligação de uma molécula a um *sensor chip* e posterior aplicação de uma amostra contendo outra molécula sobre a superfície do *sensor chip*. Geralmente uma dessas moléculas é uma proteína e a outra pode ser um pequeno ligante, um carboidrato, um peptídeo ou outra proteína. A ligação de moléculas à superfície do sensor chip gera uma resposta proporcional à massa dessas moléculas, e mudanças na quantidade ligada podem ser detectadas até picogramas por mm² na superfície do sensor chip (figura 3.2).

A técnica apresenta uma terminologia própria que será utilizada nessa dissertação. É chamada “ligante” a molécula que se encontra imobilizada na superfície do sensor chip e “analito” a molécula que for injetada no sistema micro fluídico para interagir com esse ligante. A etapa chamada de regeneração consiste na injeção de uma solução capaz de remover o analito da superfície do sensor chip após uma medida, sem reduzir a atividade do ligante, propiciando assim a reutilização desse sensor chip. O equipamento Biacore X[®] possui duas células de detecção do sinal de SPR denominadas respectivamente *Flow Cell 1* (Fc1) e *Flow Cell 2* (Fc2). Como padrão, a Fc1 é utilizada como controle, e o ligante é covalentemente imobilizado apenas na superfície da Fc2. Frequentemente, os resultados são apresentados como a diferença do sinal medido na Fc2 e na Fc1.

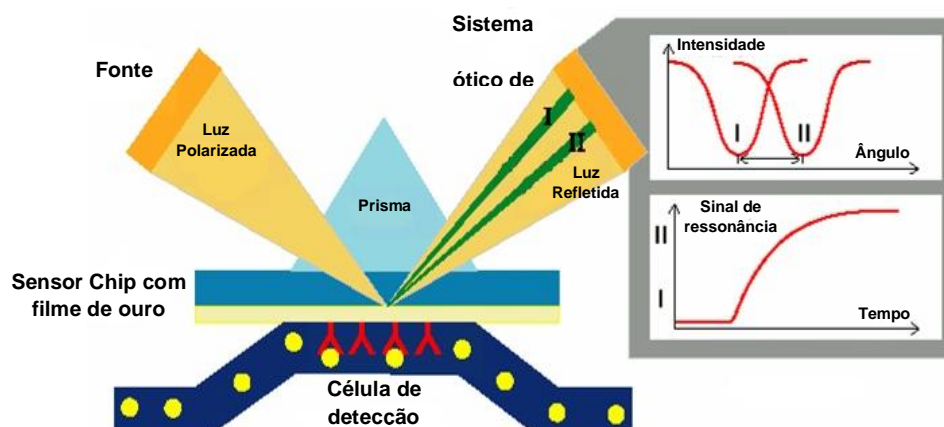


Figura 3.2. Esquema geral do sistema de detecção de SPR do equipamento Biacore X[®].

Sensorgrama é um gráfico obtido em tempo real em que as medidas realizadas no equipamento Biacore X[®] podem ser visualizadas. Em um sensorgrama, o eixo das abscissas apresenta o tempo e o eixo das ordenadas a resposta medida em unidades de ressonância (RU). Um RU é equivalente a um pico grama por milímetro quadrado na superfície do sensor chip. Geralmente os sensorgramas apresentam uma etapa de associação na qual o tampão contendo o analito passa pela célula de detecção contendo o ligante imobilizado. Durante essa etapa é comum que o complexo ligante-analito se acumule na superfície do sensor chip, o que resulta em um aumento do sinal de SPR. Então, tem início a etapa de dissociação, na qual apenas o tampão passa pela célula de detecção e, à medida que o complexo ligante-analito se dissocia, o analito é removido da célula de detecção. A Figura 3.3 mostra um sensorgrama típico.

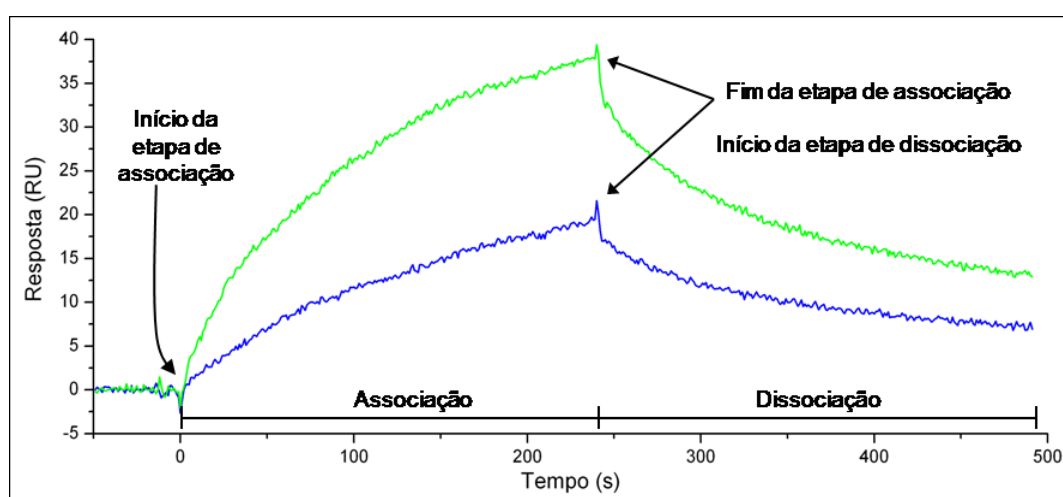


Figura 3.3. Sensorgrama típico. As linhas coloridas em azul e verde mostram a variação do sinal de SPR em função do tempo em duas medidas diferentes. As etapas de associação e dissociação estão indicadas no próprio sensorgrama.

Imobilização da α -sinucleína ao sensor chip CM5 por acoplamento amina

A α -sinucleína foi imobilizada em sensor chips CM5 no equipamento Biacore X[®] utilizando a técnica de acoplamento amina. O procedimento foi realizado à temperatura de 25°C e fluxo de 5 μ L/min, e está apresentado na Figura 3.4.

Sobre a superfície de um sensor chip CM5 foi aplicada uma mistura dos reagentes N-hidroxisuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) durante 4 minutos para a ativação da superfície pela modificação dos grupos carboximetil para ésteres de N-hidroxisuccinimida. A imobilização se deu pela injeção de 60 μ L de α -sinucleína em uma concentração de 200 μ g/mL, em acetato de sódio 10 mM, pH 4.0, seguida pela lavagem com tampão HBS-EP, que é composto de HEPES 0.01 M (pH 7,4), NaCl 0.15 M, 3 mM EDTA e 0.005% do surfactante P20. Após a injeção da α -sinucleína foi realizada uma injeção de 35 μ L de uma solução N-Etanolamina, para a inativação dos grupos reativos restantes. A Figura 1.3 ilustra esse procedimento, e nesse caso foram imobilizados aproximadamente 800 RU de α -sinucleína.

Uma triagem de pH determinou que o pH 4 é a condição mais adequada para a imobilização da α -sinucleína nas condições descritas. Esse valor é coerente com o baixo ponto isoelétrico da α -sinucleína (pI teórico 4.67).

Condições experimentais, tratamento e análise dos dados

A obtenção de uma condição onde a regeneração se dá de forma a remover totalmente o analito da superfície do sensor chip sem causar a perda da atividade do ligante imobilizado é essencial para a obtenção de medidas confiáveis e reprodutíveis. A condição que apresentou melhores resultados de regeneração foi a injeção de uma solução 50 mM de NaOH, 3 M NaCl e 4 M de uréia, seguida de um intervalo de 1 minuto para a estabilização da linha de base. O chip se mostrou estável, mantendo sua atividade mesmo após vários ciclos de medidas e regeneração.

Exceto quando mencionado, todas as medidas foram realizadas a 12 °C, em um fluxo de 10 uL/min, utilizando um tempo de associação de 3 minutos e um tempo de dissociação de 1 minuto.

Para remover as respostas decorrentes da mudança do índice de refração das amostras, as respostas da superfície de referência foram subtraídas das respostas da superfície ativa com os peptídeos imobilizados. Todos os dados cinéticos também foram submetidos ao processo de referência dupla, um procedimento no qual a resposta de uma injeção de tampão é subtraída de todas as medidas, corrigindo os dados através da remoção de artefatos que possam ocorrer sistematicamente em todas as injeções. Os programas BIAevaluation 4.1 e Scrubber 2 foram utilizados realizar os procedimentos acima mencionados.

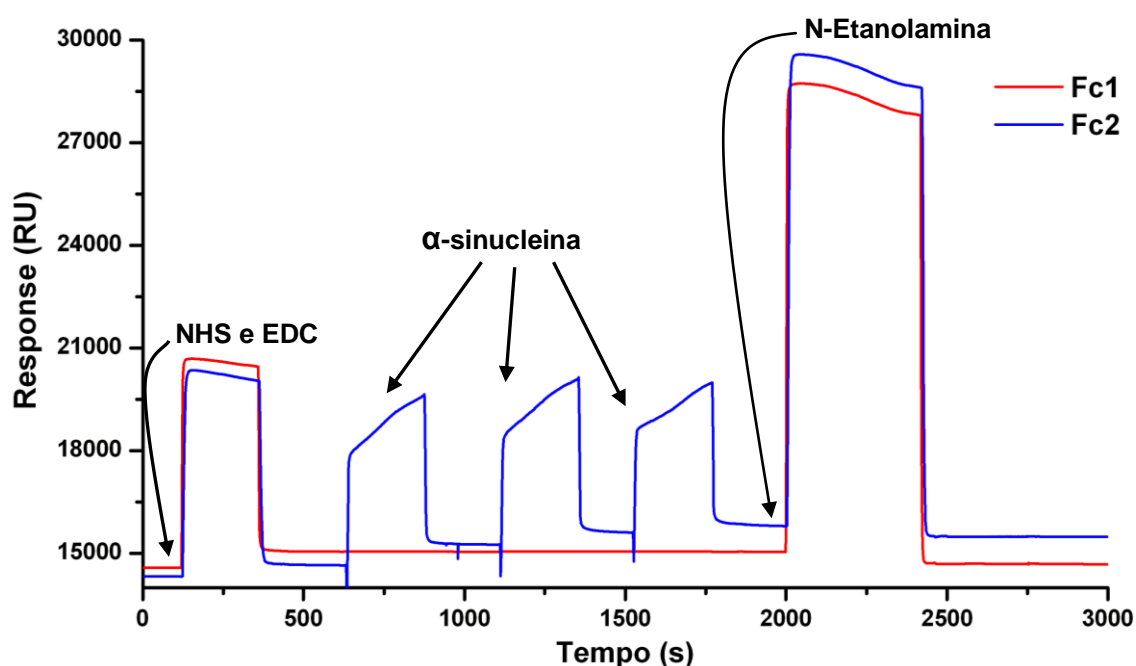


Figura 3.4. Sensorgrama mostrando a imobilização da α -sinucleína ao sensor chip CM5 pelo método de acoplamento amina. A linha vermelha mostra as medidas realizadas na Fc1 e a linha azul as realizadas na Fc2. As setas com legendas indicam as injeções de NHS e EDC, de α -sinucleína e de N-Etanolamina. Note que todas as injeções ocorreram simultaneamente nas duas células de detecção, à exceção da injeção de α -sinucleína, que foi injetada apenas na FC2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA SEPT4

4.1 Expressão da SEPT4 em *E.coli*

Expressar e purificar a septina 4 (Sept4) inteira foi um desafio desde o primeiro trabalho realizado com ela no grupo. Como o objetivo central era a produção de proteína recombinante para estudos estruturais tanto a qualidade como a quantidade da proteína produzida deveriam ser altas. Então, o início desse trabalho começa com a exploração de alternativas de expressão e purificação para a septina 4.

A SEPT4 havia sido clonada durante o trabalho de doutorado do então aluno Wanius Garcia no vetor pGEX-5x, no qual encontrava-se fusionada a proteína carreadora Glutathione-S-transferase (GST). Em tal construção a expressão apresentava um baixo rendimento e ainda parte permanecia na fração insolúvel mesmo com a expressão sendo realizada a baixa temperatura e ter sido testada em diferentes cepas. Com o intuito de tentar melhorar o nível de expressão, a SEPT4 foi clonada no vetor pETTEV. Neste vetor a proteína estaria fusionada a uma cauda de seis histidinas.

Para a clonagem no vetor pETTEV foram desenhados dois oligonucleotídeos como descritos na metodologia com os sítios de *Bam*HI e *Xho*I e por uma reação de PCR o gene da Sept4 foi amplificado e subseqüentemente clonado no vetor pETTEV. A clonagem foi confirmada por uma reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos e clivagem com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O clone pETtevSept4 foi submetido a seqüenciamento no qual foi confirmada a integridade do gene da Sept4 sem nenhuma mutação.

Depois de concluída a etapa de clonagem, se passou para os testes de expressão em *E.coli* cepa BL-21(DE3) à temperatura de 18°C por 12 horas. Como podemos observar na figura 4.1, a proteína foi expressa, pois uma banda fraca da altura esperada aproximadamente 55kDa estava presente na cultura induzida, mas ausente na não induzida. Com a confirmação da expressão passamos para as tentativas de estabelecer o protocolo de purificação.

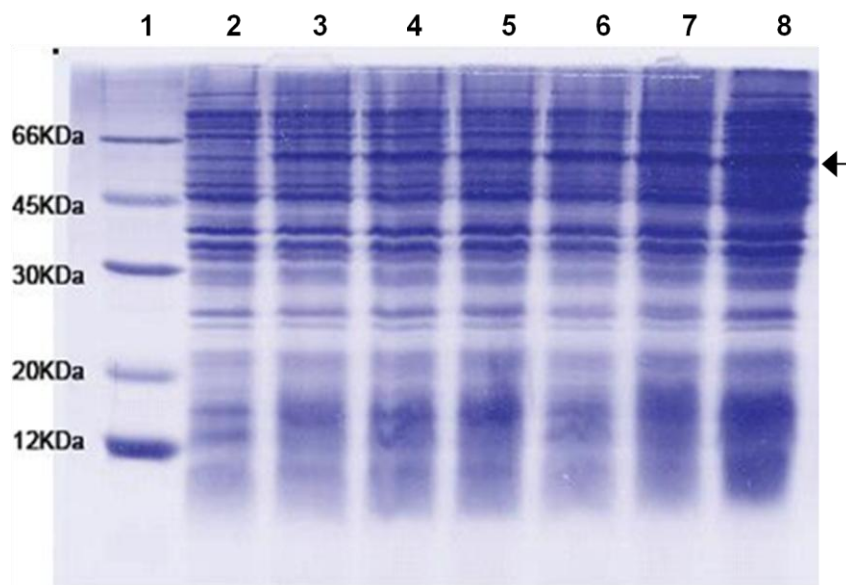


Figura 4.1. SDS - PAGE do teste de expressão pETTEVSept4 em E. coli BL-21(DE-3). Poço 1 - marcador molecular, 2 - cultura não induzida, 3 a 8 - cultura 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas pós-indução;

Após as bactérias terem sido lisadas por sonicação, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação. Infelizmente, constatamos que a proteína encontrava-se majoritariamente na fração insolúvel e mesmo com expressões a baixa temperatura pouco foi mudado desse quadro (figura 4.2). Mesmo assim, tentativas de purificar algum pouco da proteína que estivesse na fração solúvel foram realizadas.

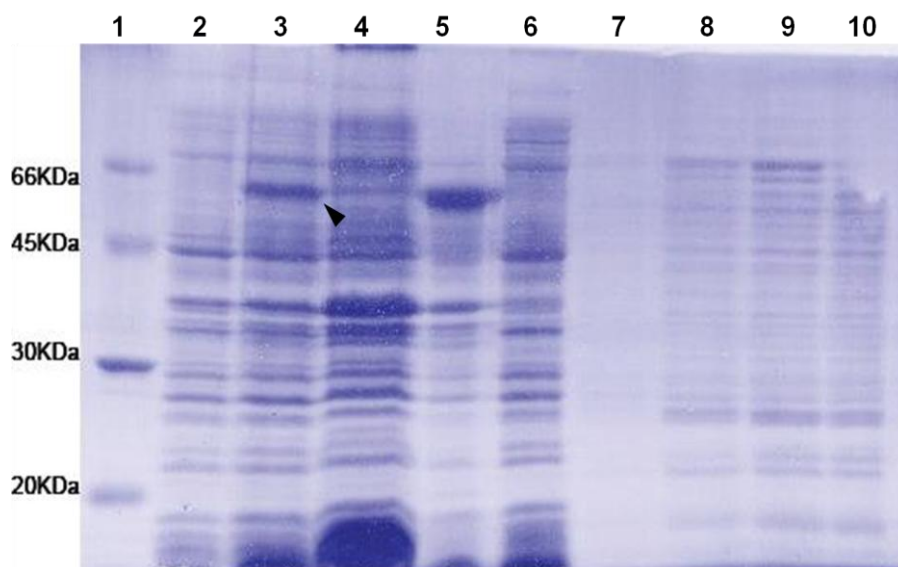


Figura 4.2. Expressão e purificação da Sept4 em E. coli a 18 °C. Poço 1 - marcador molecular, 2 - cultura não induzida, 3 - cultura induzida, 4 - fração solúvel, 5 - fração insolúvel, 6- fração solúvel após passar pela coluna de afinidade, 7 a 10 - frações eluídas com 50, 150, 200 e 250 mM de imidazol.

A fração solúvel submetida à coluna de Ni-NTA sepharose não se ligou a resina. Possivelmente toda proteína ficou na fração insolúvel, pois quando eluída em diferentes

concentrações de imidazol não era possível detectar a banda da proteína (figura 4.2). Uma tentativa para resolver o problema de insolubilidade foi a utilização de outra cepa “Artic Cells- Stratagene”, que possui chaperonas especiais ativas em baixa temperatura. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, porém nenhuma banda na altura esperada foi eluída, o que indica o não sucesso na solubilização da proteína. Pelos resultados já descritos foi verificado que com essa construção não seria possível à purificação da SEPT4.

4.2 Expressão em células de insetos

Ao mesmo tempo em que se trabalhava para melhorar a expressão em *E.coli* foi decidido também tentar um novo sistema de expressão para a SEPT4. Um sistema eucariótico poderia fornecer alguns elementos que auxiliassem na expressão da SEPT4 com maior sucesso. O gene da Sept4 foi amplificado usando oligonucleotídeos específicos e clonado no vetor pFastBacHTB (Figura 4.3). Neste vetor, o gene da Sept4 encontra-se sob o controle do promotor da *polyedrina* e fusionado a uma cauda de seis histidinas em seu N-terminal.

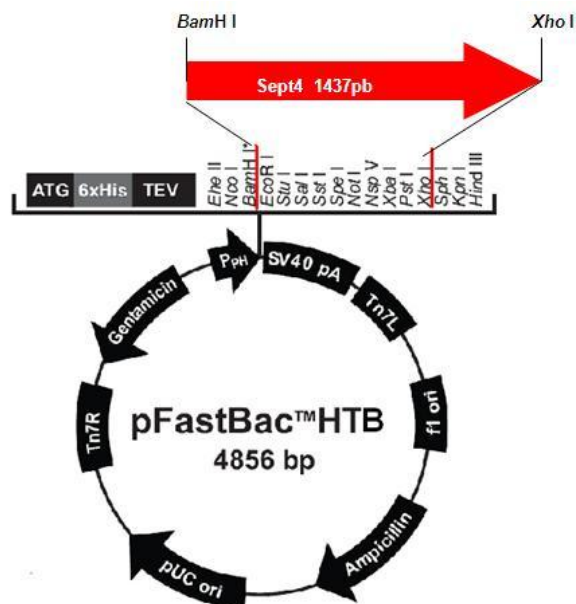


Figura 4.3. Esquema da clonagem do gene da septina 4 no vetor pFastBacHTB (Invitrogen).

Após a confirmação da clonagem no vetor pFastBacHTB o próximo passo foi a inserção desse conjunto no genoma do baculovírus (figura 4.4). Por um evento de transposição realizado pelo transposon Tn7 contido em um plasmídeo “helper” presente na

cepa DH10Bac, o cassete contendo o promotor e o gene da Sept4 foram transferidos para o genoma do baculovírus. A confirmação de que essa transposição havia ocorrido com sucesso foi realizada por PCR com um oligonucleotídeo específico para uma região posterior a seqüência do transposon Tn7 e o outro para a o gene da Sept4 (Figura 4.5).

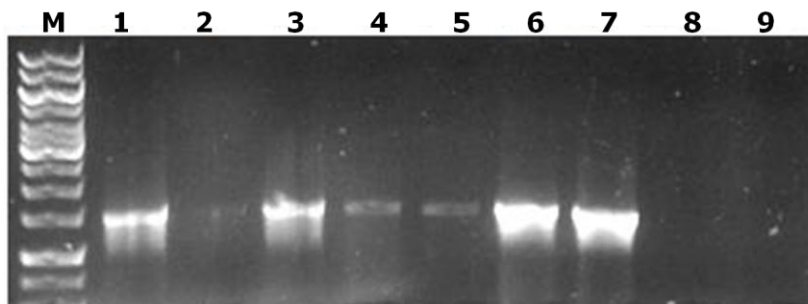


Figura 4.4. Amplificação da septina 4 no vetor pFastBacHTB. Reação da polimerase em cadeia com oligonucleotídeos específicos para confirmação dos clones positivos no pFastBacHTB. M – 1kb ladder Fermentas, 1 ao 9 colônias analisadas para a presença do gene da Sept4.

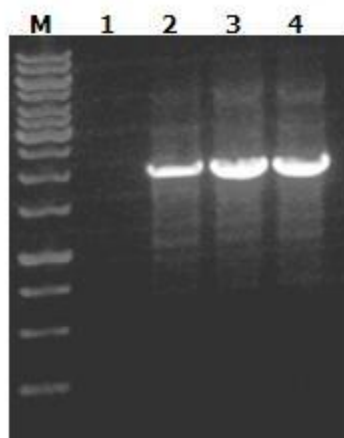


Figura 4.5. Confirmação da inserção da SEPT4 no bacmidio. Reação da polimerase em cadeia com oligonucleotídeos específicos para confirmação dos clones positivos no Bacmid AcSept4. M – 1kb ladder Fermentas, 1 a 4 colônias analisadas, sendo que na colônia 2 a 4 houve sucesso na geração do Bacmid com a SEPT4.

Uma vez obtido o genoma do vírus recombinante passou-se aos ensaios de transfecção em células Sf-9. Após a transfecção, as células foram incubadas e observado se havia sinais de infecção viral. Com o sucesso da transfecção foi obtido o primeiro estoque do baculovírus recombinante AcSept4. A partir do primeiro estoque foram feitas amplificações do estoque viral para que se pudesse realizar uma titulação bem simples do estoque viral.

Também com os primeiros estoques virais foi feitas algumas infecções nas células Sf-9 para detectar a expressão da proteína SEPT4.

A presença de uma banda na altura esperada para a SEPT4 foi detectada em SDS-PAGE 15%, sendo que esta banda estava presente somente nas células infectadas com o vírus recombinante. Para eliminar a dúvida se seria realmente a banda da SEPT4 expressa foi realizado um western blot contra a cauda de histidina, no qual foi possível observar a marcação da banda esperada confirmando assim a expressão da SEPT4 nas células Sf-9 e o sucesso na construção do baculovírus recombinante (Figura 4.6).

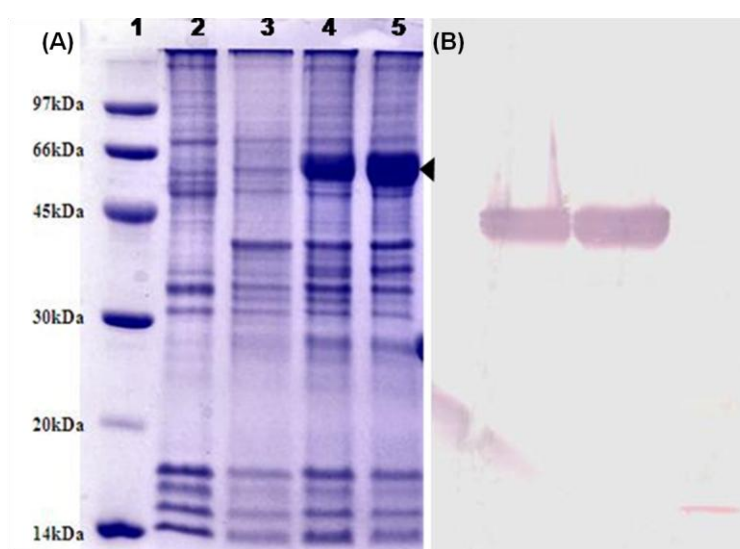


Figura 4.6. Expressão da SEPT4 em células de inseto Sf-9. A – SDS- PAGE 15% dos extratos celulares de Sf-9: poço 1 – Marcador meolecular, 2 – células não infectadas, 3 – células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV, 4 e 5 - células infectadas com o vírus r ecombinante AcSept4. B - Detecção da sept4 expressa em células Sf-9 por Western blot com o anticorpo Penta-His.

4.3 Purificação da SEPT4 expressa em células de insetos

Com os resultados positivos que mostravam a expressão da SEPT4 nas células Sf-9, então, agora era necessário estabelecer o protocolo de purificação da proteína. Para isso uma quantidade maior de células foi infectada com vírus AcSept4. O extrato celular obtido foi submetido à cromatografia de afinidade e frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE, mas, não foi detectada nenhuma banda do tamanho esperado para a SEPT4. Alguns testes foram feitos em diferentes tampões, mas a situação não mostrou mudança do quadro inicial.

Como havia sido confirmada a expressão, uma possibilidade é que pudesse haver algum problema como a falta ou processamento da cauda de histidina por proteases. Com intuito de confirmar a presença da cauda de histidinas foi realizada uma purificação com a adição de um agente desnaturante ao tampão. Já nesta situação, quando realizado a cromatografia de afinidade, as frações eluídas apresentaram a banda esperada para a SEPT4 (figura 4.7). Isso mostrou que possivelmente a cauda de histidina não estava acessível à resina. Com esses resultados, a purificação da SEPT4 pela cromatografia de afinidade mostrou dificuldades em ser realizada em condições não desnaturantes

O fato da cauda de histidina não se ligar a resinas de afinidade já foi descrito para outras proteínas. Possivelmente a SEPT4 adquiriu conformações que esconderam a cauda ou a proteína formou algum tipo de agregado solúvel que não é capaz de interagir com a resina.

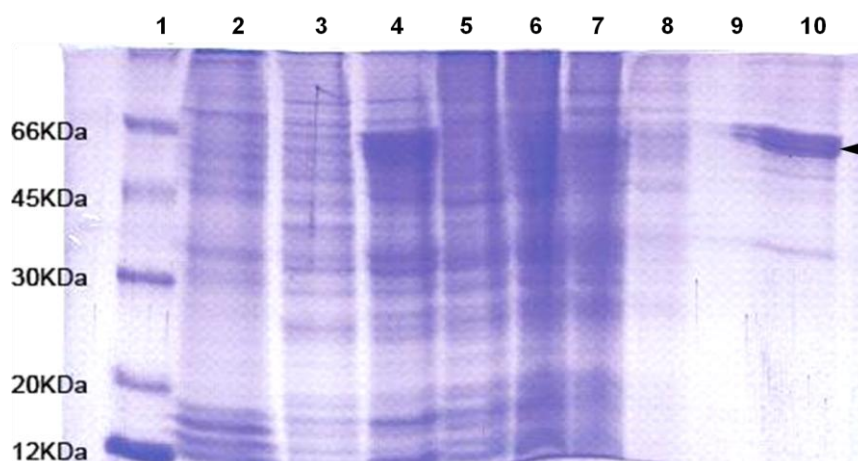


Figura 4.7. SDS – PAGE da purificação Sept4 expressa em células Sf-9 (cromatografia de afinidade). Poço 1- marcador de massa molecular; 2- Sf-9 não infectadas; 3- Sf-9 infectadas com AcMNPV selvagem; 4- sobrenadante após a lise da células Sf-9 infectadas com o AcSept4 em tampão com 1 M de Uréia; 5 - pellet; 6 - sobrenadante após passado pela resina; 7- lavagem com tampão acrescido 10mM de imidazol; 8- lavagem com 20mM de imidazol; 9- lavagem com 30mM de imidazol; 10- eluição com 200mM de imidazol.

Com as dificuldades relatadas para a purificação através da cromatografia de afinidade, foram realizadas outras tentativas utilizando outras metodologias de purificação, desta vez pela cromatografia de troca iônica. Células Sf-9 foram infectadas com o vírus recombinante AcSept4 e o extrato das células foi aplicado em uma coluna de troca iônica Q-sepharose (figura 4.8a). Algumas frações com uma pureza razoável foram obtidas. Essas frações foram reunidas, concentradas e submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular em uma Superdex 200 (figura 4.8b). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE

e western blot confirmando ser a SEPT4. Apesar dessas frações apresentarem um grau de pureza razoável, que ainda poderia ser melhorado sem contar rendimento obtido foi pequeno. (figura 4.9).

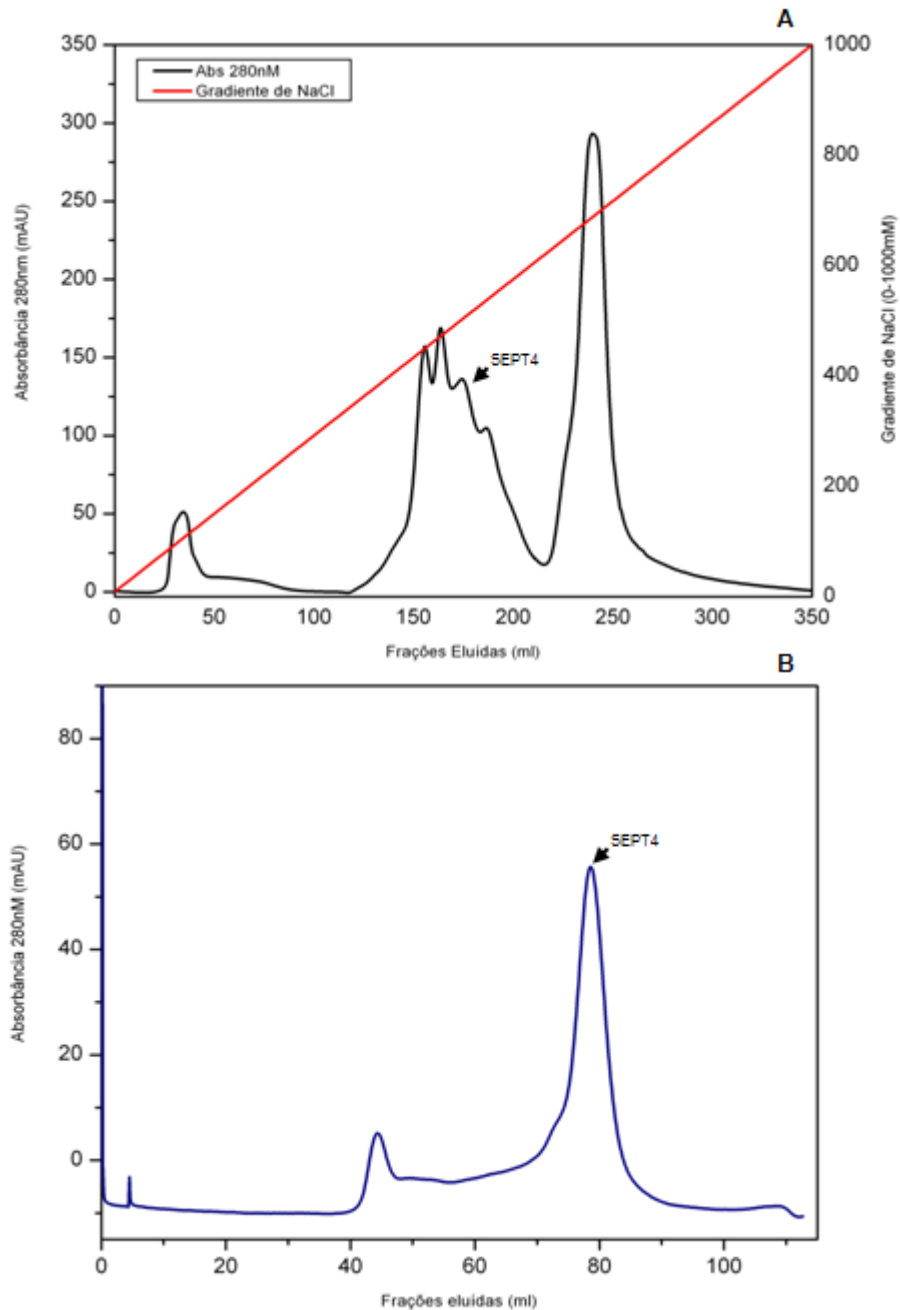


Figura 4.8. Purificação da SEPT4 expressa em células de inseto. A - Extrato das células Sf-9 infectadas com o vírus AcSept4 foi lisado e aplicado na coluna de Q-sepharose seguido de uma gradiente linear de 0 a 1M de NaCl (curva vermelha). B- As frações purificadas pela troca iônica foram concentradas e submetidas a gel filtração em uma Superdex 200 HiLoad 16/60.

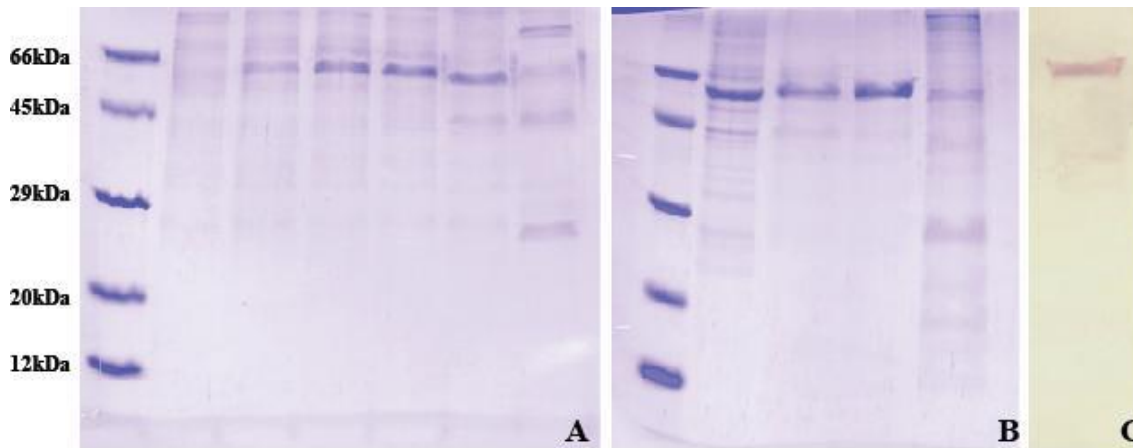


Figura 4.9. Análise da purificação da SEPT4 expressa em células de insetos por SDS-PAGE 15% e Western Blot. A - frações da cromatografia de troca iônica (Q-sepharose) (estas frações são as indicadas pela seta na figura acima 4.8 A). B- frações da cromatografia de exclusão molecular (estas frações são as indicadas pela seta na figura acima 4.8B). C- Detecção da Sept4 purificada por western com o anticorpo anti-penta His.

Devido a grande dificuldade do processo de purificação e o rendimento ao final ser pequeno, a eficiência do sistema de purificação nessas condições não foi satisfatória. Com isso nenhuma das duas estratégias utilizadas nos sistemas de expressão, tanto *E.coli* como células de insetos, se mostraram favoráveis para obtenção da proteína nas condições inicialmente desejadas para estudos de cristalização e outros ensaios.

PARTE II – TRIAGEM DE NOVAS INTERAÇÕES DA SEPT4 VIA DUPLO HÍBRIDO

4.4 Duplo híbrido da SEPT4

Como foi discutido na introdução septinas formam heterofilamentos que combinam diferentes septinas, porém ainda não se sabe quais e em que ordem as septinas se combinam fisiologicamente para formar esses filamentos. Com o intuito de responder a essa pergunta o grupo de estudos de septinas, formado por pesquisadores do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME) e o Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, decidiu estudar as relações das interações entre as septinas, o que foi chamado de “Septinoma”. A metodologia escolhida para desenvolver esse trabalho foi utilizar a técnica de duplo híbrido para mapear interações

proteína-proteína entre septinas assim como outras proteínas que interajam com as septinas. Até agora já foram ou estão sendo realizados os ensaios de duplo híbrido para a SEPT1, SEPT2, SEPT3, SEPT4, SEPT6, SEPT7, SEPT8, SEPT9 e SEPT10. Neste trabalho serão apresentados os resultados obtidos com a o duplo híbrido da SEPT4.

O gene da SEPT4 (1-478) foi clonado no vetor pBTM116 no qual ele está fusionado ao domínio de ligação ao DNA Lex-A. Ao se realizar os ensaios de duplo híbrido é necessário avaliar se a proteína fusionada ao domínio de ligação ao DNA “a isca” seria capaz sozinha de ativar a transcrição dos genes repórteres (no caso o gene da β -galactosidase e o His3), uma vez que o gene repórter somente deveria ser ativado quando o domínio de ligação ao DNA encontrasse o domínio de ativação da transcrição, o que ocorre no duplo híbrido quando a isca encontra uma presa.

Ao se realizar os testes de ativação dos genes repórteres com as leveduras contendo apenas a SEPT4 (1-478) fusionada ao domínio de ligação ao DNA Lex-A foi observado que ocorria a auto-ativação do sistema (figura 4.10b). As leveduras transformadas com o pBTMSept4 ficavam azuis quando realizado o ensaio que media a atividade da β -galactosidase contra o substrato X-gal. Tal resultado mostrou que o gene da β -galactosidase estava sendo ativado. Como a auto-ativação do gene da β -galactosidase foi intensa, isso tornaria o processo de identificação das interações com as proteínas da biblioteca muito difícil.

O outro ensaio realizado observa a ativação do gene repórter His3, pois é realizada uma seleção em meio auxotrófico no qual não é adicionado o aminoácido histidina. Se o gene His3 não for ativado as leveduras não podem crescer em meio sem histidina. No caso da SEPT4 as colônias cresceram em meio sem histidina. A auto-ativação do sistema muitas vezes acontece de forma branda, na maioria dos casos para o gene repórter His3, podendo ser resolvida freqüentemente com a adição de 3-AT. Porém, no nosso quando adicionado altas concentrações de 3-AT, um inibidor do vazamento de expressões de fundo do gene His3, o crescimento continuava ocorrendo, o que mostrou a auto-ativação do gene His3 também.

Na literatura encontrou-se um trabalho publicado por Blaser em 2004, que também descreve a auto-ativação quando o gene inteiro da Sept4 foi fusionado ao domínio GAL4 (BLASER et al., 2004). Com a nossa confirmação da auto-ativação essa construção se tornou inviável para a continuação do ensaio e rastreamento das presas na biblioteca. Por outro lado, o fato da SEPT4 inteira auto-ativar o sistema é algo intrigante, uma vez que não existem

relatos na literatura de que nenhuma septina possa agir como um fator de transcrição. Inclusive, no projeto que visa determinar o “Septinoma”, nenhuma das outras septinas estudadas apresentou o fenômeno de auto-ativação quando utilizadas como isca. Então, para que se pudesse continuar com os ensaios de duplo híbrido com a SEPT4 foi necessário realizar novas construções buscando eliminar qual domínio promovia a auto-ativação do sistema.

A SEPT4 possui uma região N-terminal composta por 124 aminoácidos que não possui similaridade com nenhuma outra septina. O domínio N-terminal é único para a SEPT4, e como nenhuma outra septina apresentou auto-ativação, uma possibilidade é que esse domínio a mais poderia estar envolvido com a auto-ativação. Esse domínio também apresenta a característica de não possuir estruturas secundárias preditas por experimentos de dicroísmo circular ou métodos teóricos, sendo uma região intrinsecamente não estruturada. Dentro desse domínio uma característica interessante observada é a presença de muitas prolinas. Regiões ricas em prolinas sugerem um possível papel em interações proteína-proteína, como acontece, por exemplo, com os domínios de ligação SH-3 (KAY et al., 2000). Por todas as características identificadas para o N-terminal, ela foi a primeira região da proteína deletada para que se pudesse prosseguir com os ensaios de duplo híbrido.

4.5 Duplo híbrido da SEPT4GC

O domínio GTPase e C-terminal “SEPT4GC” (124-478) foi amplificado com oligonucleotídeos específicos e clonados no vetor pBTM fusionados ao Lex-A (figura 4.10a). Após confirmação da seqüência e que se encontrava dentro do correto quadro de leitura, o próximo passo foi a realização dos testes de auto-ativação. Os ensaios realizados para análise da auto-ativação dos genes repórteres mostraram que esta não ocorreu, portanto seria possível dar continuidade ao ensaio de duplo híbrido com o rastreamento de interações das proteínas presentes na biblioteca (Figura 4.10c).

Como já dito anteriormente, a expressão de SEPT4 é proeminente em tecidos do sistema nervoso central. Por isso escolheu-se a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano da empresa Clontech como fonte de nossas presas. Nesta biblioteca de cDNA os genes estão fusionados ao domínio de ativação da transcrição GAL4.



Figura 4.10. A- Esquema da SEPT4(1-478) e a regiãoGC4 (124-478) que foram fusionados ao domínio de ligação ao DNA Lex-A para realização do ensaio de duplo híbrido. B- Teste de autoativação do pBTMSept4(1-478). A cor azul das colônias indica a ativação do Lac Z. C - O mesmo teste de autoativação, mas agora realizado com o pBTMGC4 (124-478) não mais é visto a atividade do gene repórter, indicando que não houve ativação.

As leveduras foram transformadas com o plasmídeo pBTMGC4 e a biblioteca de cérebro fetal humano. Os transformantes foram selecionados por crescimento em meio auxotrófico necessário. Ao final de cinco dias de incubação na estufa a 30 °C foram obtidos 83 transformantes. Os transformantes foram transferidos para meio sólido YNB sem leucina, histidina e triptofano com 5mM 3-AT para confirmação da ativação dos genes repórteres (figura 4.11a).

As colônias positivas no teste da β -galactosidase (4.11b) foram crescidas para que o DNA plasmidial, no caso o pACT2 fosse isolado. Após, amplificado em bactéria o plasmídeo purificado foi seqüenciado para identificação da presa. As seqüências obtidas foram analisadas quanto a fase de leitura usando o programa Chomas2 e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo uso do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Devido à baixa qualidade de muitos dos seqüenciamentos obtidos, algumas seqüências ou a fase em que os clones estavam, não puderam ser identificadas. A tabela 4.1 foi construída com as presas que puderam ter sua seqüência analisada.

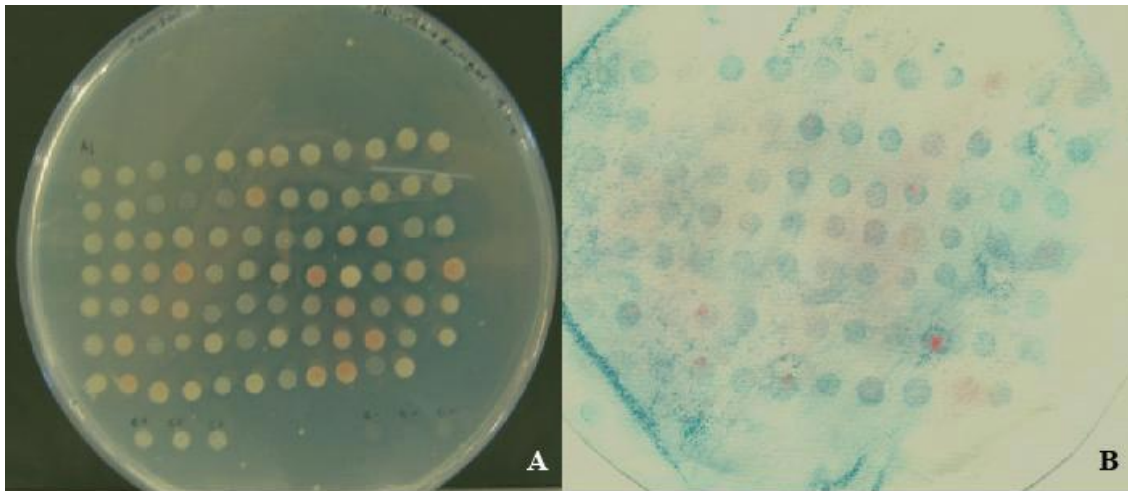


Figura 4.11. A - Triagem das interações da biblioteca de cérebro fetal humano. Placa das colônias recuperadas da transformação do pBTMGC4 com a biblioteca, as colônias foram crescidas em SD-WLH mais 5mM de 3-AT. B- Teste da β -galactosidase para confirmar a ativação do gene reporter nas colônias recuperadas da transformação, mostrando que a maioria delas ativou o gene reporter.

Os plasmídeos pACT2 que continham o cDNA das interações identificadas foram isolados das colônias e os vetores das colônias 1, 5, 7, 25, 26, 50, 57 e 76 foram escolhidos por representarem cada uma das interações identificadas e assim validar se essas ativavam os genes repórteres. Estes plasmídios foram então co-transformados com os plasmídios pBTMGC4 ou pBTM116. Posteriormente três colônias de cada placa foram transferidas para uma nova placa (figura 4.12a). Com essas colônias foi realizado o teste da β -galactosidase. Nas colônias que possuíam os plasmídeos pBTMGC4 e o pACT2 com os cDNAs identificados foi observado que as colônias ficaram azuis quando em contato com o substrato X-gal presente no tampão com exceção da colônia 50, enquanto as que possuíam o vetor pBTM116 vazio e os respectivos pACT2 não ficaram azuis quando incubadas com o mesmo tampão (figura 4.12b). Isso indica que ocorreu uma interação entre a proteína SEPT4GC e a proteína fusionada ao domínio de ativação no pACT2 e isso promoveu a ativação do gene repórter da β -galactosidase.

Como pode ser observado na tabela 4.1, muitas das interações observadas são entre septinas. Esse resultado vem confirmar algo que já havia sido comentado na literatura (KINOSHITA, 2003), que prevê que septinas do mesmo grupo (figura 1.3) são substituíveis. Quando se observa os componentes do heterofilamento de septinas mais estudado até o momento, composto pelas SEPT2-SEPT6-SEPT7, se percebe que ele é formado por uma septina de três grupos diferentes. No heterofilamento, a SEPT2 interage diretamente apenas com a SEPT6 e com ela mesma. Portanto, como a SEPT4

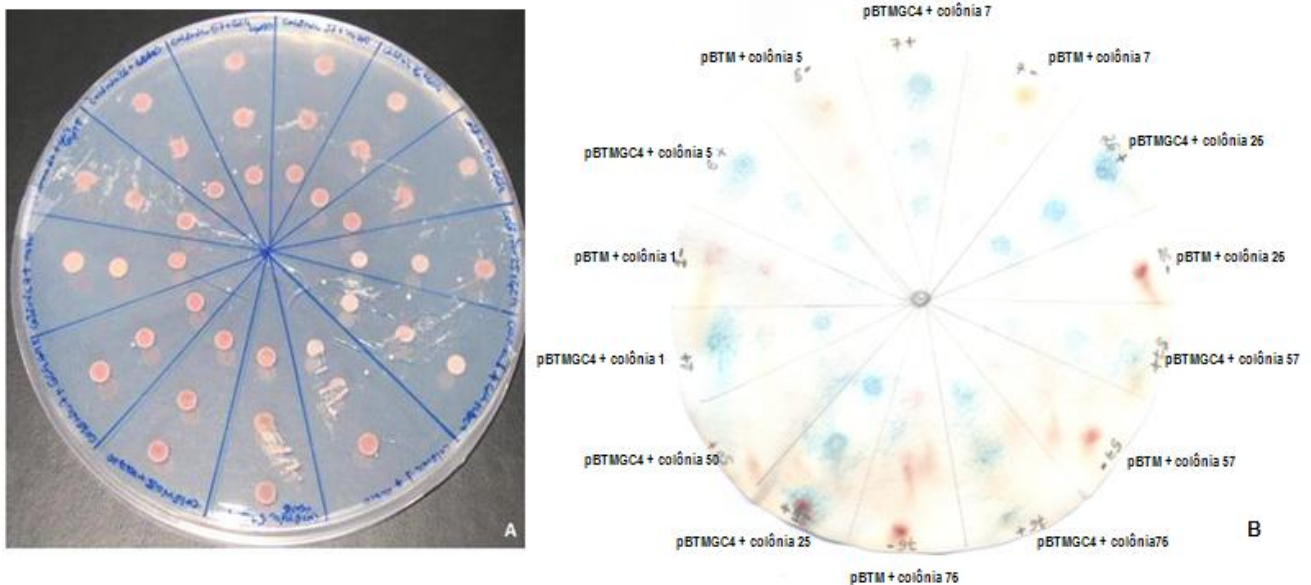


Figura 4.12. A - Cotransformação da SEPT4GC e os clones obtidos no screen do duplo-híbrido. B – Ensaio da β galactosidase das colônias cotransformadas. As colônias azuis indicam que o gene da β -galactosidase foi ativado, nas colônias que foram transformadas sem o SEPT4GC não é possível observar a formação de colônias azuis.

faz parte do mesmo grupo da SEPT2 (Grupo III) a interação com as septinas que fazem parte do grupo da SEPT6 (Grupo II) seria esperada. Isto foi verificado no ensaio, sendo que todas as septinas do grupo da SEPT6 foram identificadas: SEPT6, SEPT8, SEPT10 e SEPT11. Mais notável ainda é o fato de nenhuma outra septina ter sido encontrada. Estes dados apóiam fortemente a proposta do Kinoshita e sugerem que a SEPT4 faz parte de filamentos análogos ao modelo 2-6-7, onde ocuparia a posição central do hexâmero e não interagiria diretamente com a SEPT7 (figura 4.13). Não foi identificada nenhuma interação da SEPT4 com ela mesma, possivelmente porque não se detecta a expressão da SEPT4 em tecidos fetais tanto em ratos como em humanos, pelo menos para a isoforma 1 em humanos (MAIMAITIYIMING et al., 2008); (TANAKA et al., 2001).

A interação com a SEPT8 já havia sido descrita e confirmada na literatura em um trabalho onde se utilizou a SEPT8 como isca (BLASER et al., 2004). Em outro trabalho o mesmo autor afirma que a SEPT4 também interage com a SEPT11, porém os dados que confirmam essa interação não foram mostrados (BLASER et al., 2006). Tais dados ajudaram a validar o ensaio de duplo híbrido aqui apresentado, uma vez que interações esperadas foram encontradas.

Tabela 4.1 - Proteínas identificadas pela triagem de interações da Sept4GC com proteínas expressas na biblioteca de cérebro fetal humano pela técnica de duplo híbrido

<i>CLONE</i>	<i>PROTEÍNA IDENTIFICADA</i>	EM FASE:
1	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
2	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
5	Septina 6	sim
6	CASC3 - cancer susceptibility candidate 3	não (fase +3)
7	Septina 11	não (fase +2 e +3)
17	Septina 10	sim
18	Septina 11	não possível determinar
25	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
26	Septina 8	não possível determinar
29	Septina 6	não
31	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
35	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
38	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	não possível determinar
40	Septina 11	não possível determinar
42	Septina 11	sim
44	Septina 11	sim
46	FMS-related tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)	sim
49	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	sim
50	FMS-related tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)	não (fase +2 e +3)
51	Glyoxalase domain containing 4 (GLOD 4)	não (fase +3)
57	Septina 10	sim
63	Septina 11	não possível determinar
65	Septina 11	não
76	FMS-related tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)	sim
78	Glyoxalase domain containing 4 (GLOD 4)	não (fase +2)
80	Septina 10	sim
83	UBC9 - SUMO-1-protein ligase	não possível determinar

Outras interações foram identificadas através dos estudos de duplo híbrido. A proteína que mais foi encontrada nesse ensaio foi uma SUMO E2-ligase, ao total 8 vezes. Trata-se da Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9), que é responsável pela sumoilação de resíduos de

lisinas em proteínas sumoiladas. Apesar de não ter sido uma interação confirmada por outras técnicas existem alguns motivos para acreditar que se trata de uma interação verdadeira e específica.



Figura 4.13. Esquema dos possíveis filamentos formados pela SEPT4. Baseado no heterofilamento formado pelas Septinas 2-6-7 e nos dados do duplo híbrido, estes seriam os filamentos que a SEPT4 poderia realizar. Em verde SEPT4, em lilás as septinas do grupoII e em azul SEPT7.

A proteína SUMO (small ubiquitin-related modifier) apresenta grande semelhança em sua estrutura com a proteína ubiquitina, apesar de possuírem baixa identidade de seqüência. As vias de conjugação das duas são distintas, mas apresentam suas similaridades. A ubiquitina está diretamente envolvida com a marcação para proteólise de proteínas celulares, via a sua ligação em resíduos de lisinas, que as direciona para degradação no proteassoma. Esse processo de degradação de proteínas envolve consumo de energia, possui grande especificidade e está envolvido em diversos processos celulares.

Por outro lado, os resultados obtidos até agora nada sugerem que a via de sumoilação esteja envolvida com a via de degradação de proteínas. Na verdade, se trata de uma modificação pós-traducional no qual a SUMO é covalentemente ligada a outras proteínas e assim modifica as suas funções. O primeiro papel relatado para a SUMO foi que a sua ligação alterava a localização celular. Quando a SUMO era ligada a proteína citosólica RanGAP1 causava sua movimentação para o poro nuclear por promover a ligação da RanGAP1 com as proteínas Nup38/RanBP2 (MATUNIS et al., 1996). No caso de uma proteína κ Ba ela parece ligar-se aos sítios onde haveria ubiquitinação prevenindo assim a degradação da proteína pelo proteassoma (DESTERRO et al., 1998).

Um trabalho publicado em 1999 por Johnson e Blobel mostra resultados interessantes sobre o papel da proteína SUMO na dinâmica das septinas de levedura, inclusive mostrando que as septinas estão entre as proteínas mais sumoiladas durante a divisão celular. Neste trabalho eles mostram que a SUMO é ligada as septinas Cdc3, Cdc11 e Shs/Sep 7 especificamente durante a mitose, e que a conjugação da proteína SUMO acontece um pouco antes no início da anáfase e desaparece rapidamente após a citocinese. Outro dado interessante é que a sumoilação parece ocorrer apenas no anel de septinas formado no septo do brotamento do lado da célula mãe e não no da célula filha (JOHNSON; BLOBEL, 1999). Ainda não é muito claro como a dinâmica de sumoilação altera a organização das septinas no septo de brotamento, mas mutantes que alteravam o sítio de sumoilação apresentavam defeitos no processo de desmontagem do anel formado pelas septinas. Portanto, é possível que os eventos de sumoilação estejam envolvidos com a dinâmica de desmontagem do anel de septinas em leveduras (JOHNSON; BLOBEL, 1999) ; (TAKAHASHI et al., 1999).

A ligação da proteína SUMO acontece em um resíduo de lisina que geralmente está em um motivo conservado do tipo Ψ KXD/E (onde Ψ representa um resíduo hidrofóbico qualquer, X qualquer resíduos e na quarta posição um ácido glutâmico ou aspártico). Como nem todas as seqüências com essas características em uma proteína são sumoiladas deve existir um mecanismo de regulação. Ao se realizar uma busca por proteínas que são sumoiladas, em suas seqüências logo depois desse motivo aparece uma serina que poderia ser fosforilada ou em outros casos há resíduos carregados negativamente (ANCKAR; SISTONEN, 2007); (HIETAKANGAS et al., 2006). Na maioria das seqüências parece que uma carga negativa na posição +3 a +6 logo após o motivo é necessária para a ligação da Ubc9 ao seu substrato. Também existem casos de lisinas sumoiladas que não obedecem a esse motivo. Nesses casos o reconhecimento do sítio de sumoilação pela Ubc9 está relacionado aos resíduos próximos estruturalmente da lisina a ser sumoilada (ANCKAR; SISTONEN, 2007).

O SUMOplot™ Analysis Program (<http://www.abgent.com/tools/sumoplot>) é um programa presente no servidor ExPASy que visa identificar possíveis sítios de sumoilação em uma dada seqüência de aminoácidos. Quando submetemos a seqüência da SEPT4 ao programa ele nos sugere alguns sítios de sumoilação. Na figura 4.14 os resíduos destacados em vermelho são os sítios de maior probabilidade e em azul os de menor probabilidade identificados pelo programa SUMOplot™ Analysis. Em verde foram destacados resíduos negativamente carregados ou resíduos que possam ser fosforilados. Na seqüência AKAD, a lisina 290 aparece como um sítio de alta probabilidade a ser sumoilado, contudo essa lisina

faz parte do motivo G4, o qual interage com o nucleotídeo. Ao se observar esse resíduo na estrutura da SEPT2, que possui alta identidade com a SEPT4, a lisina 290 encontra-se na região de interface G e possivelmente não acessível se ela estiver dentro do filamento. Talvez o processo de sumoilação não ocorra nesse sítio ou se ocorrer ele possa estar envolvido com algum processo de regulação da SEPT4 antes de fazer parte do filamento. A lisina 140, também identificada com um sítio de alta probabilidade, se encontra estruturalmente no final de uma α -hélice em uma posição mais acessível e de mais fácil acesso a sumoilação. O interessante é observar que precisamente essa lisina está justamente na hélice que forma a interface N/C do filamento da SEPT2.

Outro dado que corrobora nossos resultados é que a Ubc9 e uma outra proteína envolvida no processo de sumoilação, a PIAS 3, foram identificadas na triagem realizada pelo duplo híbrido com a SEPT6 como isca (NAKAHIRA et al., resultados não publicados). Isso indica que a sumoilação provavelmente acontece de fato em septinas humanas e pode exercer algum papel regulatório nessas proteínas. Porém, a interação direta entre Ubc9 e SEPT4 ainda precisa ser confirmada experimentalmente juntos com estudos do seu papel fisiológico nos processos celulares envolvendo septinas.

```

1   MDRSLGWQGN  SVPEDRTEAG  IKRFLEDTTD  DGELSKFVKD  FSGNASCHPP  EAKTWASRPQ
61  VPEPRPQAPD  LYDDDLFRP  PSRPQSSDNQ  QYFCAPAPLS  PSARPRSPWG  KLDPYDSSSED
121 DKEYVGFATL  PNQVHRKSVK KGFDFTLMVA  GESGLGKSTL  VNSLFLTDLY  RDRKLLGAEE
181 RIMQTVEITK HAVDIEEKGV RLRLTIVDTP  GFGDAVNNT  CWKPVAEYID  QQFEQYFRDE
241 SGLNRKNIQD NRVHCCLYFI SPFGHGLRPL  DVEFMKALHQ  RVNIVPILAK  ADTLTPPEVD
301 HKKRKIREEI EHFGIKIYQF PDCDSDEDED  FKLQDQALKE  SIPFAVIGSN  TVVEARGRRV
361 RGRLYPWGIV EVENPGHCDF VKLRTMLVRT  HMQDLKDVTR  ETHYENYRAQ  CIQSMTRLVV
421 KERNRNKLTR ESGTDFPIPA  VPPGTDPETE  KLIREKDEEL  RRMQEMLHKI  QKQMKENY

```

Figura 4.14. Possíveis sítios de sumoilação identificados na sequência da SEPT4 pelo programa SUMOplot™. Os resíduos em negrito representam a região da proteína correspondente ao GC4 utilizado como isca no ensaio de duplo-híbrido. Em vermelho sublinhado estão os motivos identificados com a maior probabilidade de sumoilação; em azul os com menor probabilidade. Em verde sublinhado estão destacados resíduos negativamente carregados ou resíduos que podem ser fosforilados.

Outra nova interação detectada pelo duplo híbrido é algo que precisa ser confirmado por outras metodologias, pois sem isso sempre há possibilidade de ser um falso-positivo. Três clones com o cDNA codificando a proteína fms-like tyrosine kinase ou vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) foram recuperados na triagem da biblioteca, sendo que dois dos clones estão na correta fase de leitura. O VEGFR-1 pertence à subfamília dos receptores tirosina kinase (RTK) e sua função está diretamente ligada a angiogênese, sendo que a deleção desse gene apresentou o fenótipo de letalidade na fase embrionária e anormal

crescimento dos vasos sanguíneos (RAHIMI, 2006). Trabalhos mostraram o envolvimento da via controlada pelos fatores de crescimento vasculares endoteliais nos processos ligados a isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas (CARMELIET; STORKEBAUM, 2002). Se essa interação for confirmada trata-se de uma interação interessante a ser estudada em maiores detalhes. Para as outras duas interações recuperadas (CASC3 e GLOD4) pouca informação é sabida e nada se pode falar sobre elas até que haja uma confirmação da interação.

Esses dados nos mostram que a SEPT4 pode estar envolvida em vários processos com distintas funções. Há a possibilidade de que a adição de SUMO a SEPT4 altere seu comportamento, sugerindo que essa modificação pós-traducional seja um elemento de regulação. Além disso, se a auto-ativação observada para a SEPT4 é mesmo causada pelo domínio N-terminal isso pode indicar mais uma função exercida pela SEPT4, o que abre o campo para maiores estudos.

PARTE III – ESTUDO DA INTERAÇÃO SEPT4 e α -ALFA SINUCLÉINA

4.6 SEPT4 e α -sinucléina

O envolvimento da SEPT4 com doenças neurodegenerativas começa com sua identificação em placas senis de pacientes com a doença de Alzheimer (KINOSHITA et al., 1998). Nesses agregados também puderam ser detectadas SEPT2 e SEPT1. Já em um trabalho (IHARA et al., 2003) mostrou que a SEPT4 também se encontrava depositada em agregados conhecidos como “Lewy bodies”, que são agregados característicos encontrados no cérebro de pacientes afetados pela doença de Parkinson. No entanto, nesses agregados não foram encontradas a presença de outras septinas, sendo que foram analisadas SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT7 e SEPT8. Outro trabalho foi mostrado que a expressão da SEPT4 é reduzida na região caudo-putamen de pacientes com Parkinson e que a SEPT4 realiza um importante papel facilitando a transmissão da dopamina dos terminais sinápticos para a via nigro-striatum (IHARA et al., 2007).

Um importante componente encontrado nos corpos de Lewy é a proteína α -sinucléina, sendo sua presença nestes agregados um dos fatores utilizados para o diagnóstico da doença

de Parkinson (MORAN et al., 2007; UVERSKY, 2007). Quando realizado imunomarcação dos corpos de Lewy com anticorpos anti- α -sinucleína e anti-SEPT4 observou-se que havia uma colocalização e coimunoprecipitação de ambas as proteínas (IHARA et al., 2003). Os resultados já obtidos dessa interação indicam que seja fisiológica, contudo como isto ocorre não é bem compreendido. Particularmente interessante é a observação da possível associação das duas proteínas tanto em condições fisiológicas quanto patológicas.

Uma característica importante para ser destacada da α -sinucleína é que se trata de uma proteína intrinsecamente desovelada que interage com fosfolipídios negativamente carregados da membrana plasmática e ao interagir assume a estrutura de uma α -hélice em seus cem aminoácidos do N-terminal (CHANDRA et al., 2003). Um trabalho publicado em 2007 mostra proteínas que interagem com a α -sinucleína identificadas por “phage-display”. Nesse trabalho buscou-se selecionar as interações que ocorrem somente quando a α -sinucleína tem a conformação de α -hélice (WOODS et al., 2007). Uma das proteínas identificadas nessa triagem foi a SEPT4. Por estas informações presentes na literatura uma hipótese que passou a ser considerada é que a interação entre SEPT4 e α -sinucleína possa ser dependente da conformação desta última. Por isso alguns experimentos foram realizados com SDS em concentrações acima da concentração crítica micelar, para promover a mudança conformacional da α -sinucleína.

Um dos objetivos de estudar essa interação era confirmar a interação direta entre as duas proteínas e tentar mapear qual região da SEPT4 estaria envolvida na interação. Para isso foram testadas construções da SEPT4 com os diferentes domínios: SEPT4(1-478), SEPT4GC(144-478), SEPT4G(144-416) e SEPT4C(420-478).

4.7 Medidas de Dicroísmo Circular

Em muitos casos quando duas proteínas interagem ocorrem alterações em suas conformações causadas por rearranjos de elementos de estrutura secundária e terciária. Com o intuito de obter informações estruturais sobre o possível complexo formado por essas duas proteínas foram realizadas medidas de dicroísmo circular (CD). Acreditava-se que a interação poderia levar a uma estruturação da α -sinucleína ou a mudanças na conformação da SEPT4. Foram realizadas medidas da SEPT4 inteira (figura 4.15), domínio GC (figura 4.16), domínio

G (figura 4.17) e domínio C-terminal (figura 4.18 a 4.19). Nesses experimentos foram medidos espectros de cada proteína separada, e depois delas juntas. O espectro medido experimentalmente com as proteínas juntas foi comparado com a curva resultante da soma teórica dos espectros coletados com as proteínas separadas. Em todos os casos foi possível detectar apenas sutis mudanças entre o espectro medido e o calculado, o que indica que nesta interação não estaria ocorrendo grande mudança na organização da estrutura secundária de ambas as proteínas. Mesmo com a adição de SDS acima da concentração crítica micelar o resultado foi o mesmo, apesar de a α -sinucleína apresentar um espectro muito diferente e característico de α -hélice nestas condições.

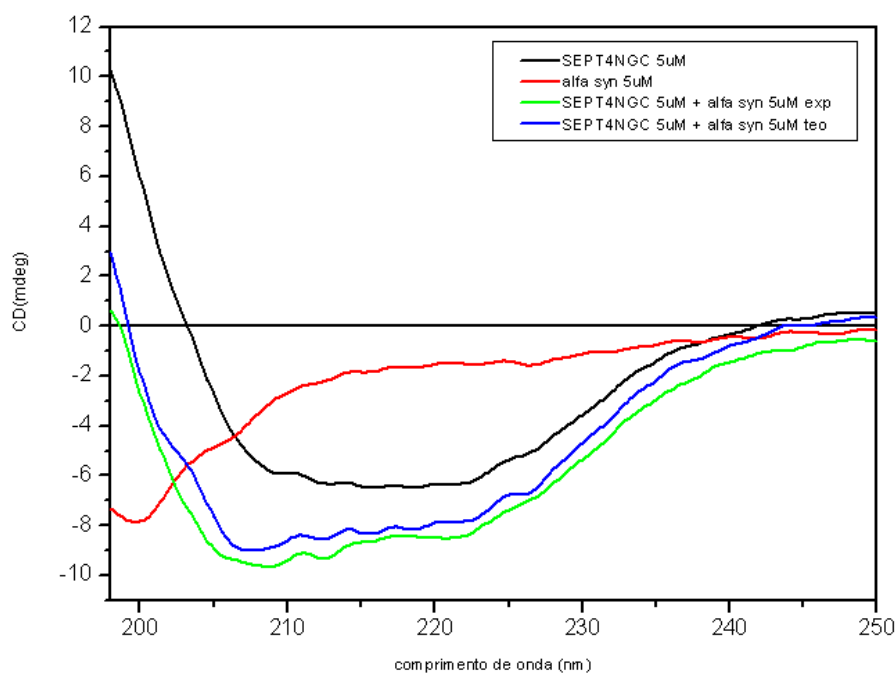


Figura 4.15. Espectro de CD da SEPT4 e da α -sinucleína . Medidas realizadas com 5µM de cada proteína em 50mM tris pH7,5;100mM NaCl e 10% glicerol a 15°C.

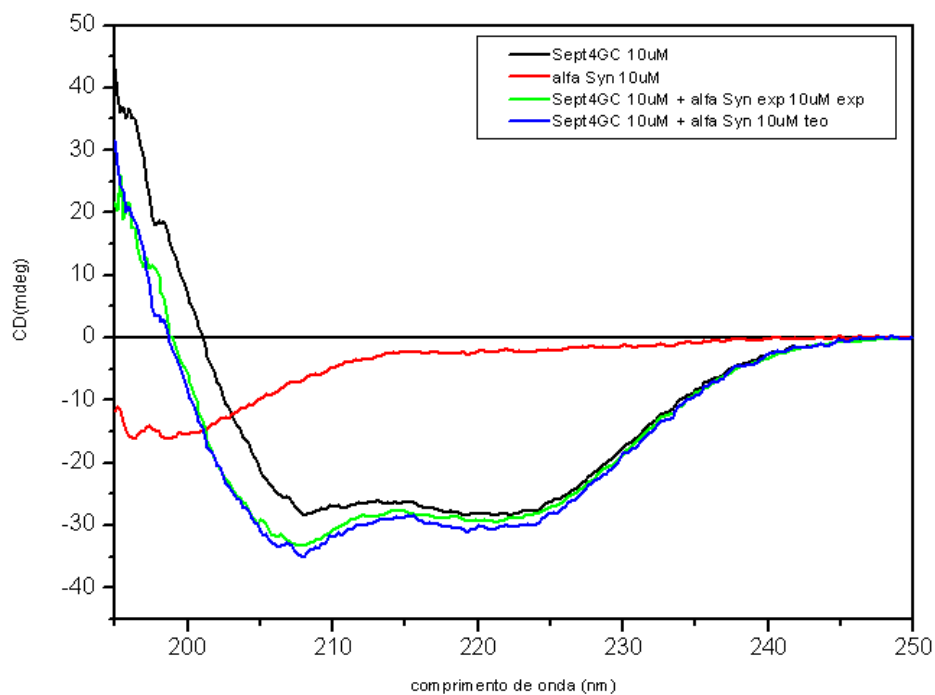


Figura 4.16. Espectro de CD da SEPT4GC e da α -sinucleína . Medidas realizadas com $10\mu\text{M}$ de cada proteína em 50mM tris pH7,5; 100mM NaCl e 10% glicerol a 15°C .

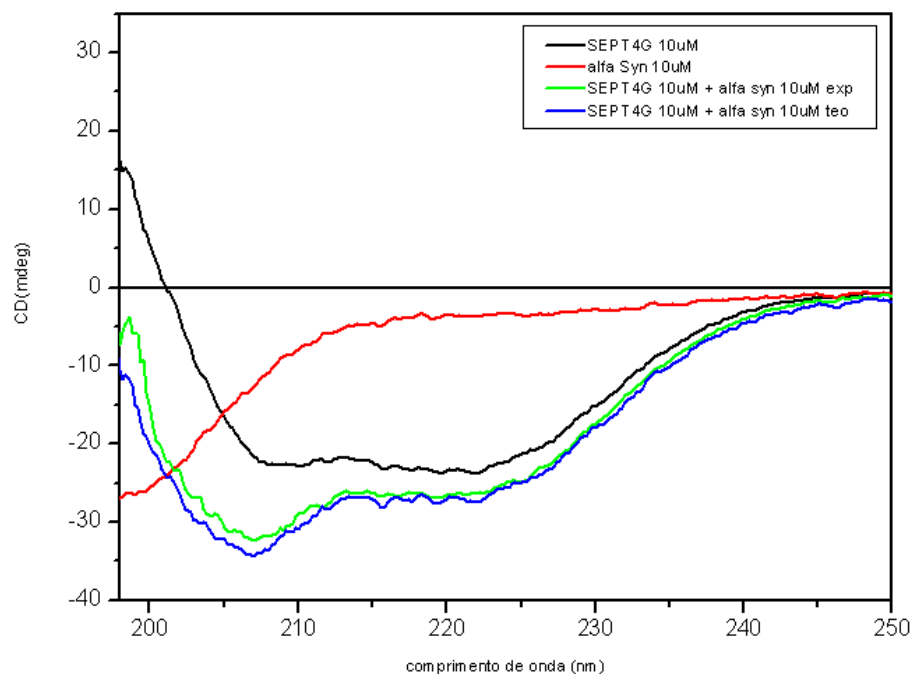


Figura 4.17. Espectro de CD da SEPT4G e da α -sinucleína . Medidas realizadas com $10\mu\text{M}$ de cada proteína em 50mM tris pH7,5; 100mM NaCl e 10% glicerol a 15°C .

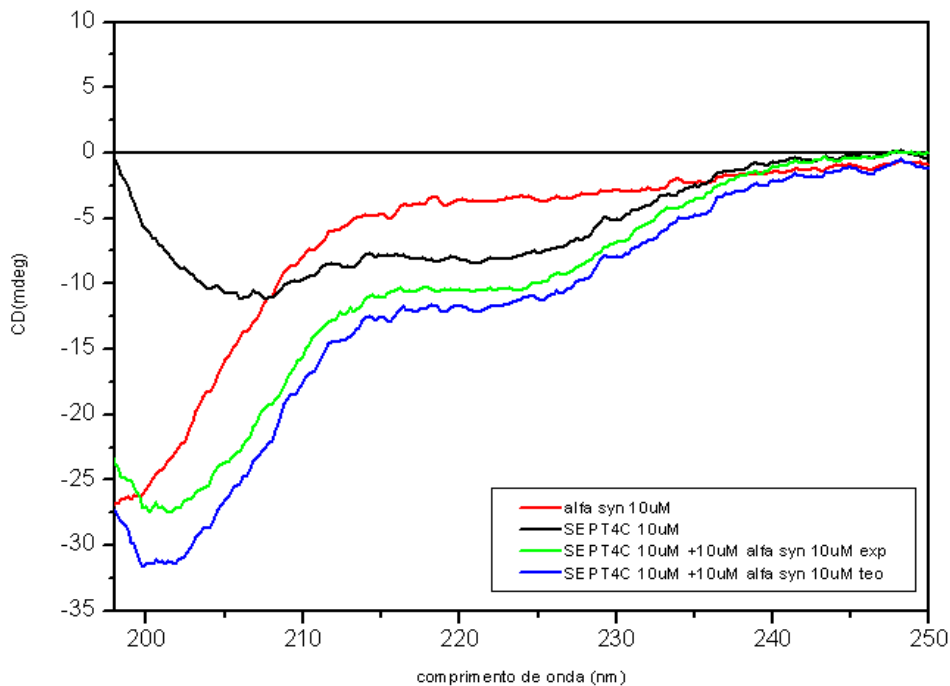


Figura 4.18. Espectro de CD da SEPT4C e da α -sinucleína . Medidas realizadas com $10\mu\text{M}$ de cada proteína em 50mM tampão fosfato de potássio pH 7,4; 30mM NaCl a 10°C .

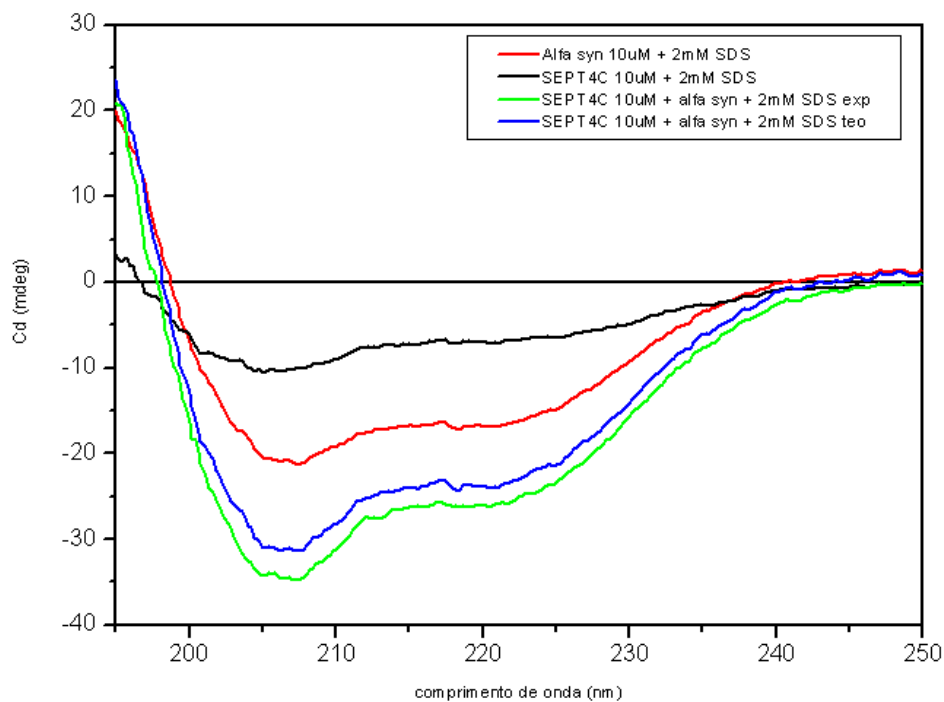


Figura 4.19. Espectro de CD da SEPT4C e a α -sinucleína com SDS. Medidas realizadas com $15\mu\text{M}$ de cada proteína diluídas em 50mM tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 150mM NaCl com 2mM de SDS a 25°C .

Como a técnica de dicroísmo circular não é capaz de detectar pequenas mudanças conformacionais, uma vez que é sensível apenas ao conteúdo total das estruturas secundárias

presentes na proteína, talvez as mudanças ocorridas sejam sutis demais para serem detectadas ou mesmo nem ocorram. Por este motivo, outras técnicas espectroscópicas foram utilizadas para observar se havia uma interação direta entre as duas. Para isso foi acoplado uma sonda fluorescente a α -sinucleína e monitorado a eventual interação por anisotropia de fluorescência. Neste caso os experimentos foram conduzidos apenas com o domínio C-terminal.

4.8 Medidas de anisotropia de fluorescência.

Se a luz plano polarizada é usada para excitar um sistema fluorescente e a emissão dos componentes da luz linearmente polarizada são medidas, estas podem ser usados para obter informações sobre a forma, tamanho e flexibilidade das macromoléculas (CANTOR; SCHIMMEL, 1980). A técnica de anisotropia de fluorescência foi utilizada para monitorar a α -sinucleína marcada com rodamina e o que a adição do domínio C-terminal da SEPT4 causava ao sistema.

Como pode ser visto na figura 4.22 com esse sistema foi possível observar um aumento de anisotropia conforme aumentavam as concentrações do C-terminal da SEPT4. Próximo a concentração de 2 μ M do domínio C-terminal parece ocorrer uma saturação, o que evidencia uma estequiometria de 1:1 entre α -sinucleína e o domínio C-terminal da SEPT4, uma vez que a concentração de 2 μ M para a α -sinucleína foi usada.

Outra importante informação obtida é que a formação do complexo é evidente apenas na presença de SDS, pois não há aumento de anisotropia quando na ausência de SDS. Esse resultado indica que a interação α -sinucleína e SEPT4 pode ser realmente dependente da conformação da α -sinucleína, ou pelo menos que a afinidade da interação é maior quando a α -sinucleína está na conformação de hélice.

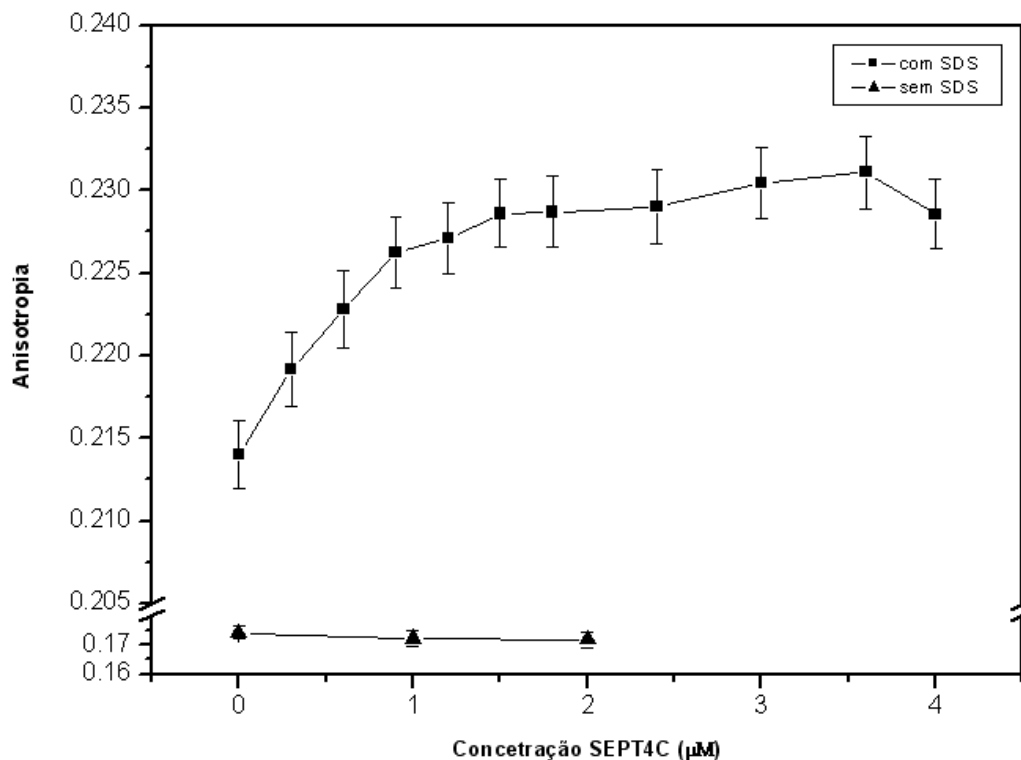


Figura 4.20. Titulação da SEPT4C na alfa sinucleína marcada com rodamina. Medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas com 2µM de alfa sinucleína marcada com rodamina em diferentes concentrações da SEPT4C (■) com SDS e (▲) sem SDS. As medidas foram realizadas em tampão fosfato de sódio pH 7.5 com 0,4mM de SDS.

4.9 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear

Os resultados obtidos com a anisotropia de fluorescência indicam que uma interação está ocorrendo, mas não há informações sobre qual região das duas moléculas está envolvida na interação, por isso a técnica de ressonância magnética nuclear foi utilizada para tentar estudar em mais detalhes a possível interação entre a α -sinucleína e os domínios da SEPT4. Trata-se de uma técnica muito útil para estudar interações entre proteínas, uma vez que é possível monitorar uma molécula isotopicamente marcada e se a adição de outra molécula não marcada provoca mudanças no comportamento da proteína marcada, isto pode ser observado por alterações na intensidade e posição dos picos no espectro e ser atribuído a resíduos específicos.

Pelos resultados obtidos com a fluorescência e como o domínio C-terminal é mais estável que o domínio GTPase, o primeiro foi selecionado para os experimentos iniciais de ressonância magnética nuclear. A α -sinucleína marcada foi monitorada sem e com crescentes concentrações do C-terminal da SEPT4 a 25 °C em 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 150 mM NaCl. Quando o espectro da α -sinucleína é comparado com o espectro após a adição da SEPT4C não foram detectadas mudanças nas frequências dos picos e nem diferenças significativas na intensidade (figura 4.21). O deslocamento químico composto ($\delta = (\{(0,15)\delta N\}^2 + \delta H^2)^{1/2}$) foi calculado entre os picos correspondentes nos dois espectros e as mudanças observadas encontravam-se dentro do erro experimental (figura 4.25a).

A α -sinucleína assume uma conformação de uma hélice anfipática no N-terminal quando interage com a membrana plasmática. Uma das hipóteses considerada aqui era que a interação entre a α -sinucleína e a SEPT4 poderia ser dependente da conformação em hélice da α -sinucleína. Nessas condições a SEPT4 teria maior afinidade pela α -sinucleína quando esta se encontrasse na conformação de hélice. Para testar tal hipótese medidas da α -sinucleína com SDS acima da concentração crítica micelar foram realizadas. Como pode ser visto na figuras 4.23 na comparação entre os espectros da α -sinucleína com SDS e após a adição de SEPT4C na presença de SDS foi observado que as mudanças foram mais significativas do que na ausência de SDS. O deslocamento químico composto calculado para os espectros com SDS a 25 °C podem ser visto na figura 4.25b, no qual vários resíduos apresentaram variação no deslocamento químico significativa, o que é indicativo de uma interação.

Na figura 4.25c está apresentada a relação entre as intensidades dos picos do espectro da α -sinucleína mais a SEPT4C com SDS sobre os picos da α -sinucleína com SDS sem SEPT4C. Ao se analisar a figuras 4.25b e 4.25c é possível notar que os resíduos que sofrem o maior deslocamento químico estão no N-terminal da α -sinucleína, que são os primeiros 100 resíduos, e são justamente a região que ganham a estrutura de hélice. Também são neles observadas a mais proeminente queda na relação de intensidade (figura 4.25c), o que pode indicar que essa região da proteína está tombando mais devagar devido a uma interação direta com a SEPT4C. Portanto, somente quando a α -sinucleína estivesse nessa conformação a SEPT4 estaria ligada a ela.

O assinalamento da cadeia principal da α -sinucleína com SDS a 25°C foi depositado no Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) (<http://www.bmrb.wisc.edu>) com o código 5744 (CHANDRA et al., 2003). Comparando nosso espectro com a lista de

freqüências dos NHs presente no assinalamento depositado foi possível identificar a maioria das freqüências observadas. No espectro a 25°C cerca de 60% dos 140 aminoácidos foram assinalados (figura 4.22).

Motivados por estas informações as medidas com SDS foram realizadas em diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 37 °C e 40 °C. Posteriormente, o assinalamento obtido a 25 °C foi transferido para os espectros nas demais temperaturas. Com isso, foi possível mapear quais resíduos sofreram maior variação no deslocamento químico durante a interação entre as duas proteínas. Ao comparar os espectros é perceptível que a 40 °C os picos são mais intensos e bem definidos e as mudanças observadas a 25°C também foram visíveis a 40°C (figura 4.24).

Os resíduos que tiveram uma variação no deslocamento químico composto superior a 0,025 ppm são Ala19, Gly67, Ala69, Val74 e Lys80. Ao se mapear estes resíduos na estrutura da α -sinucleína (que é um grampo com duas hélices e uma cauda não estruturada), se observou que se localizam nas duas α -hélices, próximos uns aos outros. É interessante observar que a proximidade espacial destes resíduos depende da formação das α -hélices e, portanto no enovelamento da α -sinucleína (figuras 4.26 e 4.27a).

A interpretação do possível sítio de interação da α -sinucleína e a SEPT4C é complicada. Entre outros fatores limitantes, não foi possível assinalar todos os resíduos da estrutura. Contudo, um trabalho publicado por Woods em 2007 também faz uso da técnica de RMN para validar interações com a α -sinucleína dependentes da conformação em hélice. Neste trabalho foi mapeado o sítio de interação de duas proteínas; endosulfina α (ENSA) e fosfoproteína regulada por c-AMP 19 (ARPP19) com a alfa sinucleína (WOODS et al., 2007). Interessantemente o sítio encontrado neste trabalho se assemelha ao observado para a interação com a SEPT4C (figura 4.27b). Ao se analisar a seqüência de aminoácidos das duas proteínas citadas acima, observa-se que elas são pequenas e possuem grande número de resíduos básicos assim como a SEPT4C. Em relação a estrutura, tanto a ENSA como a ARPP-19 tem a predição de serem principalmente desestruturadas, com regiões formando 4 hélices

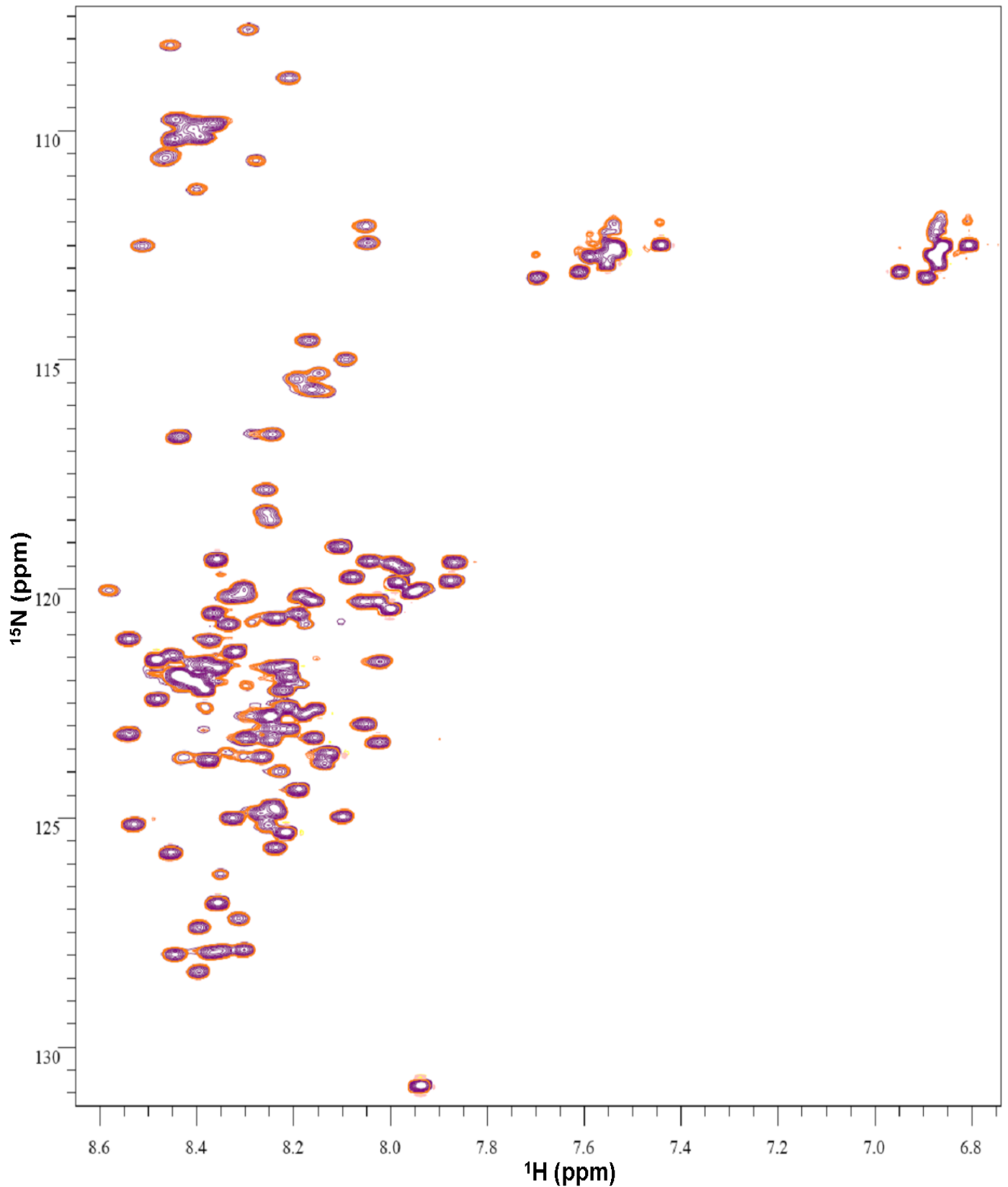


Figura 4.21. Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ de ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C sem SDS. Em laranja o espectro de $200\mu\text{M}$ de α -sinucleína. Em roxo espectro, espectro da ^{15}N - α -sinucleína após a adição da SEPT4C na razão molar 1:2, respectivamente. Ambos espectros foram medidos em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,4; 150 mM NaCl na ausência de SDS a 25°C .

no caso da primeira e 2 hélices para a segunda, algo que se assemelha com os elementos de estrutura secundária já preditos para o C-terminal da SEPT4 (BOETTCHER et al., 2008) ;(HUANG et al., 2001). Esses resultados levantam a suspeita que talvez a α -sinucleína tenha um sítio comum para diferentes ligantes que somente aparece, quando gerada a estrutura do grampo de hélices antiparalelas.

Se os resíduos com maior variação no deslocamento químico identificados na α -sinucleína são ou não o sítio de interação com a SEPT4C ainda precisa ser confirmado por outros experimentos. A realização de experimentos tridimensional de assinalamento permitirá o completo assinalamento da α -sinucleína, o que tornaria possível conhecer o deslocamento químico de todos os átomos da cadeia principal e assim determinar com maior precisão o sítio de interação da α -sinucleína com a SEPT4. Além disso, uma vez que as medidas com SDS foram realizadas apenas com o domínio C-terminal, uma possibilidade é que uma região maior que o domínio C-terminal seja necessária para a interação.

O objetivo inicial era que fossem testados diferentes domínios da SEPT4, contudo a instabilidade e a forte agregação da proteína completa, do domínio GTPase e do fragmento GTPase e C-terminal tornaram difíceis as medidas. Uma única medida foi realizada com a construção domínio GTPase e C-terminal, o SEPT4GC (144-478). A α -sinucleína marcada foi misturada em uma razão molar 1:1 com a SEPT4GC na ausência de SDS. Quando comparado esse espectro com o controle somente com a α -sinucleína observa-se que alguns resíduos ficaram mais intensos na presença da SEPT4GC (figura 4.28).

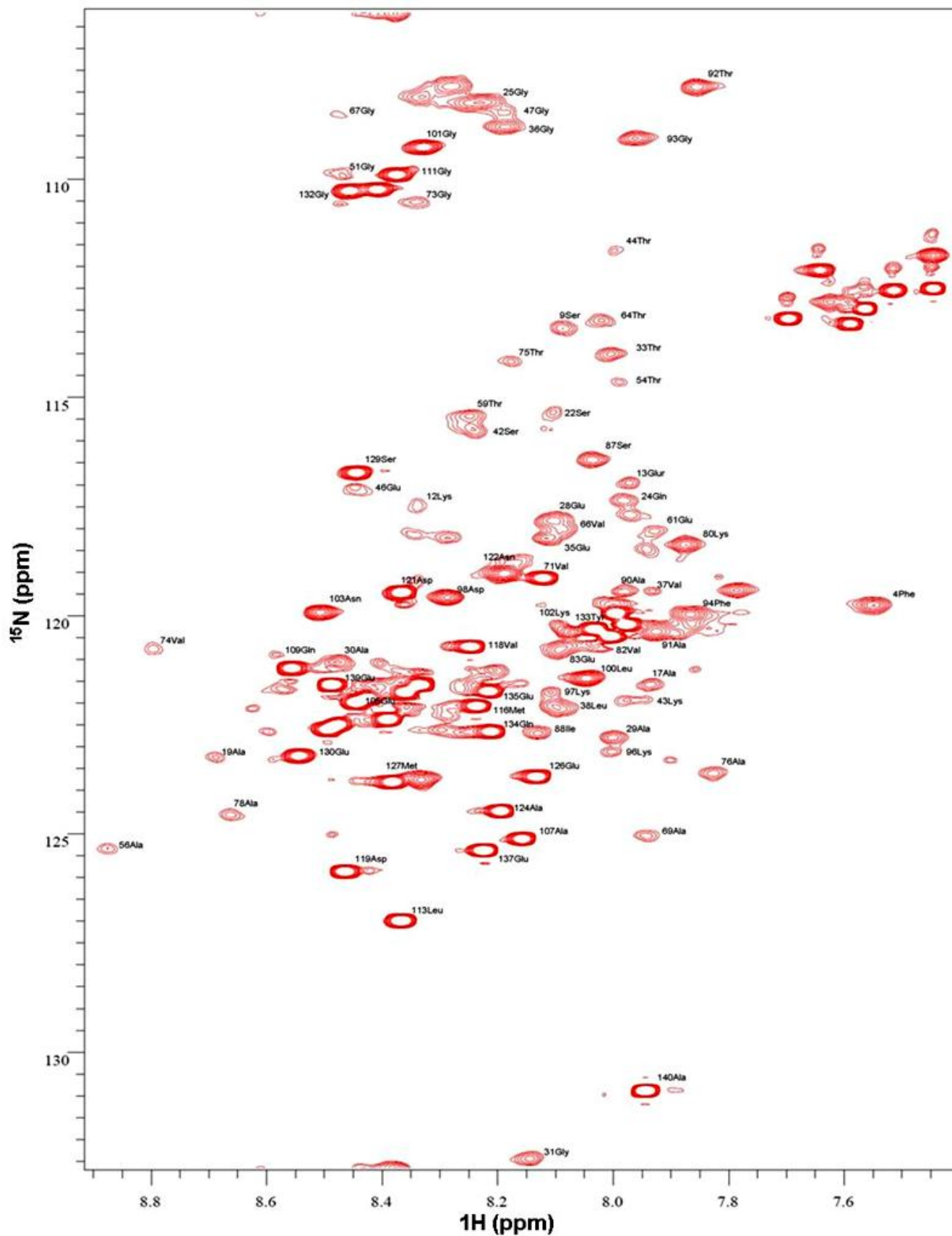


Figura 4.22. Assinalamento da α -sinucleína. Assinalamento dos picos ^1H - ^{15}N HSQC da ^{15}N - α -sinucleína a $200\mu\text{M}$ na presença de 50mM de SDS a 25°C . Esse assinalamento foi realizado com base no assinalamento da α -sinucleína depositado no banco de dados BMRB com o código de acesso 5744.

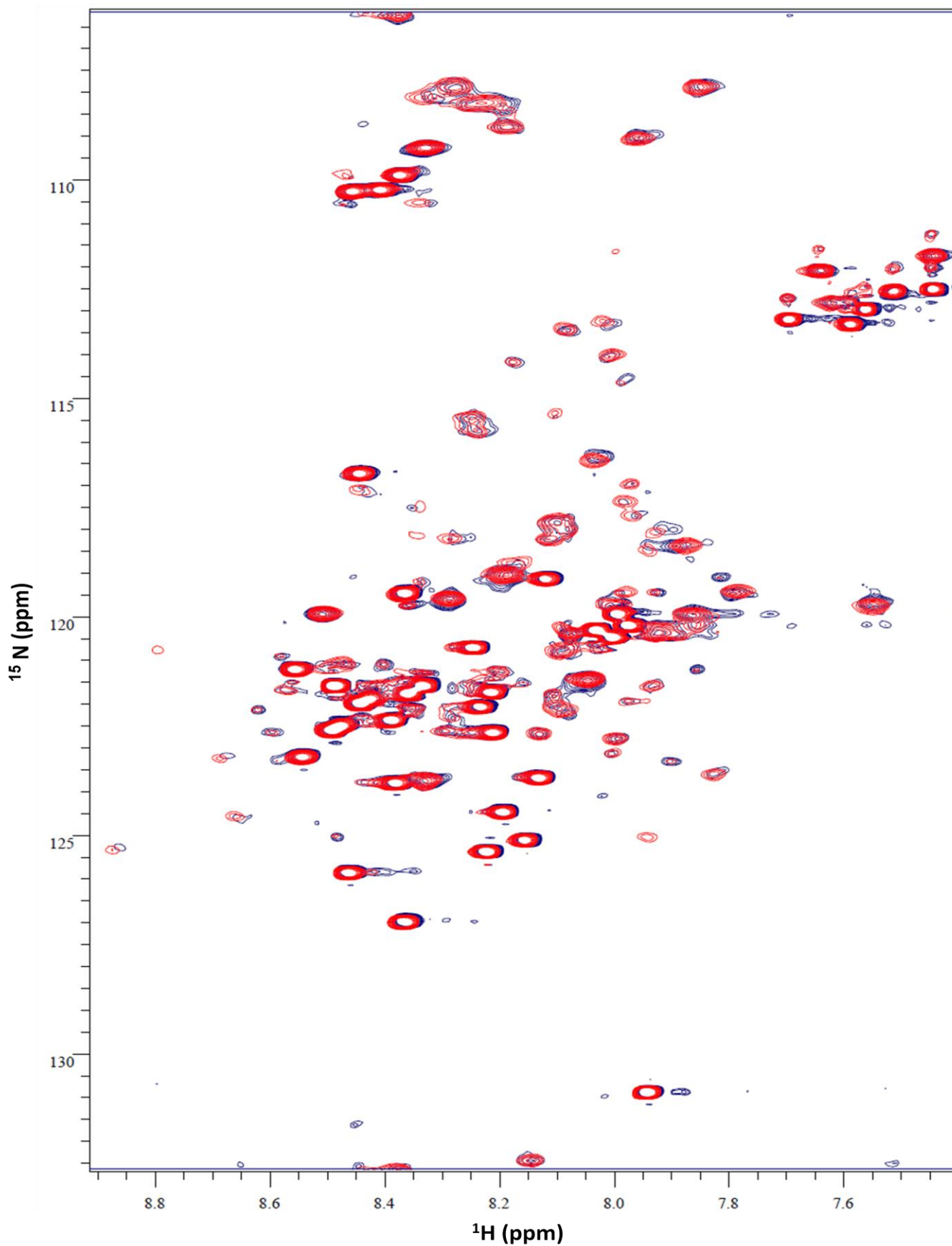


Figura 4.23. Espectro de ^{15}N HSQC da ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C com SDS. Em vermelho espectro da α -sinucleína e em azul após a adição de SEPT4C em uma razão molar 2:1. Ambos espectros foram medidos em 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 100mM NaCl com 50mM de SDS a 25 °C.

Um trabalho publicado por Eliezer et al. em 2001 mostra o assinalamento para a proteína sem SDS (ELIEZER et al., 2001), mas o assinalamento não foi depositando no banco BMRB. Mesmo assim, com o auxílio das informações contidas nesse trabalho foi possível por comparação assinalar alguns picos isolados, dentre eles algumas glicinas. Porém não foi possível assinalar todos os resíduos que sofreram mudança. Por outro lado, os picos mais intensos na presença de SEPT4GC representam uma forte evidência que uma região da α -sinucleína se tornou mais rígida. Os resíduos que puderam ser identificados encontram-se no N-terminal, região que adquire a estrutura de hélice quando na presença de SDS. Como infelizmente não foi possível realizar medidas com a SEPT4GC na presença de SDS, não se sabe se a variação dos deslocamentos químicos aconteceria nos mesmos resíduos quando na presença da SEPT4C. Esse é um dos experimentos de grande interesse a ser realizado no futuro, mas antes é necessário encontrar uma condição em que o SEPT4GC não precipite na presença de SDS ou utilizar outra substância que mimetize a membrana plasmática e promova a mudança conformacional na α -sinucleína.

Os resultados obtidos com as medidas de RMN nos mostram um interessante panorama, porém ainda com muitas incertezas. Pelo que foi observado, a interação da SEPT4 com a α -sinucleína é fortemente influenciada pela conformação desta última. Um experimento importante a ser realizado no futuro seria utilizar outros membrana-miméticos e estudar se o mesmo comportamento se repete ou se o SDS causou algumas das mudanças observadas de forma inespecífica. Talvez experimentos futuros com o SEPT4GC nos permita determinar com mais precisão o sítio de interação na α -sinucleína. Vale a pena ressaltar que os resultados observados com a ressonância caminham na mesma direção que os obtidos com a anisotropia de fluorescência, indicando que a conformação da α -sinucleína influencia a interação com o C-terminal da SEPT4.

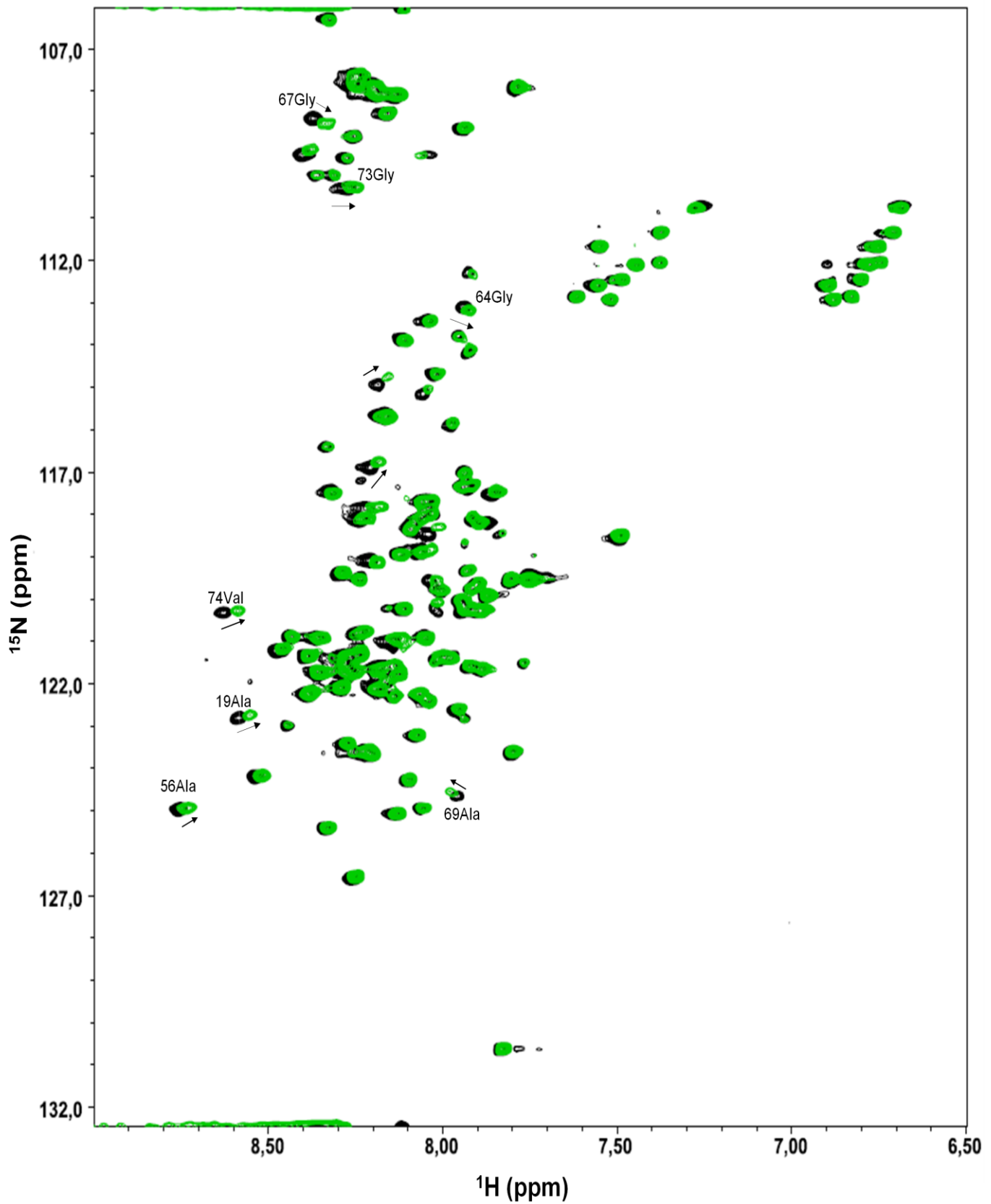


Figura 4.24. Espectro de $^{15}\text{NHSQC}$ da ^{15}N - α -sinucleína com SEPT4C a 40°C . Em preto, espectro de $200\mu\text{M}$ da α -sinucleína e em verde após a adição de SEPT4C na razão molar 2:1. Ambos espectros foram medidos em 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 150mM de NaCl com 50mM de SDS a 40°C .

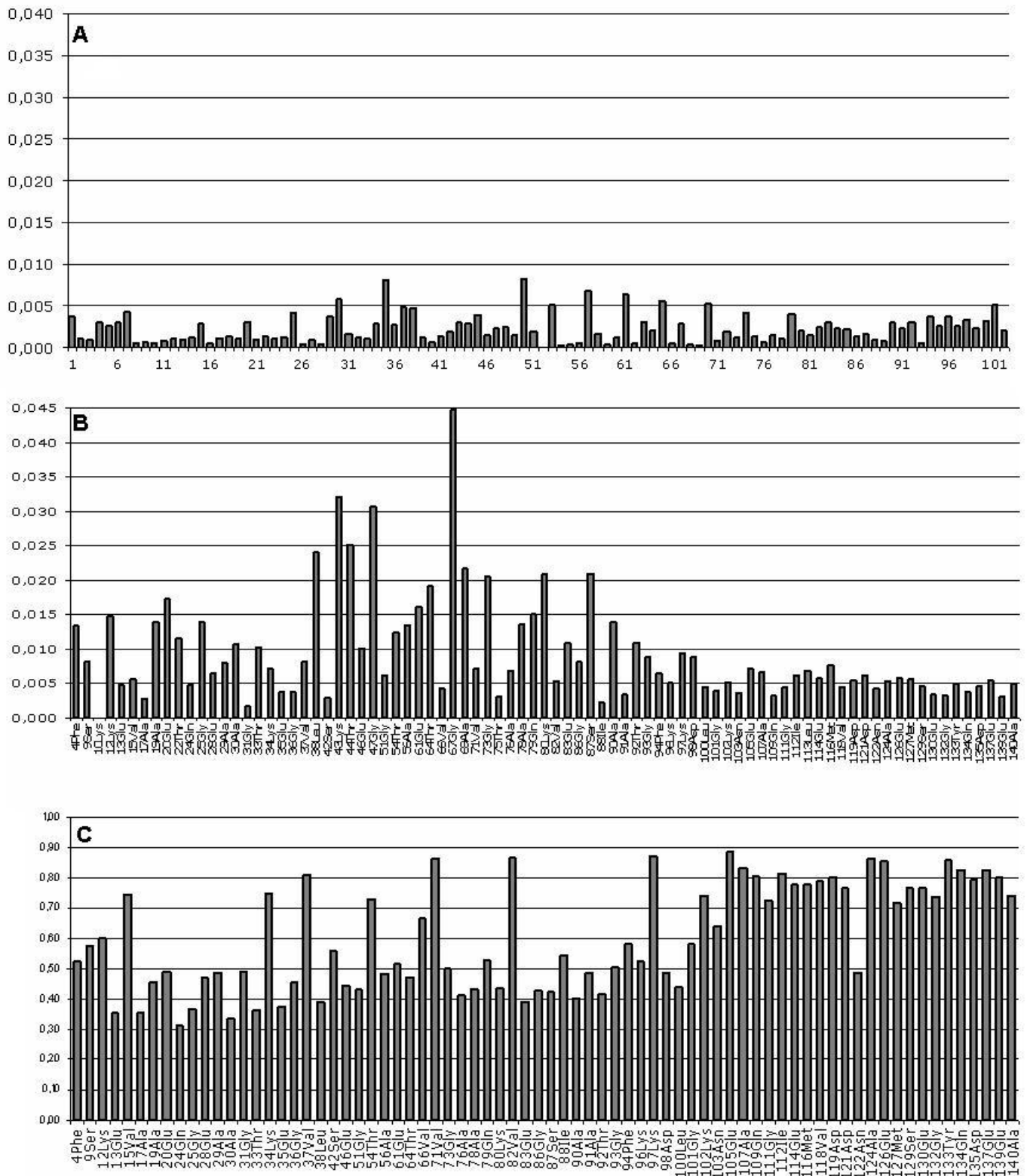


Figura 4.25. Deslocamento químico composto e razão das intensidades da α -sinucleína antes e após adição da SEPT4C. O deslocamento químico composto foi calculado com a seguinte fórmula ($\delta = \{(0,15)\delta N\}^2 + \delta H^2\}^{1/2}$). Em (A) foi calculado o deslocamento entre o espectro da α -sinucleína e o espectro α -sinucleína mais SEPT4C na ausência de SDS enquanto em (B) foi calculado na presença de SDS para os resíduos que foram assinalados ambos os casos os dados foram coletados a 25°C. Em (C) mostra-se a razão entre as intensidades (α -syn+SEPT4C/ α -syn) dos picos da α -sinucleína após e antes da adição de SEPT4C, ambos com SDS a 25°C. Nota-se que em (A) os números atribuídos aos picos são arbitrários, pois não há o assinalamento. Em (B) os picos foram assinalados.

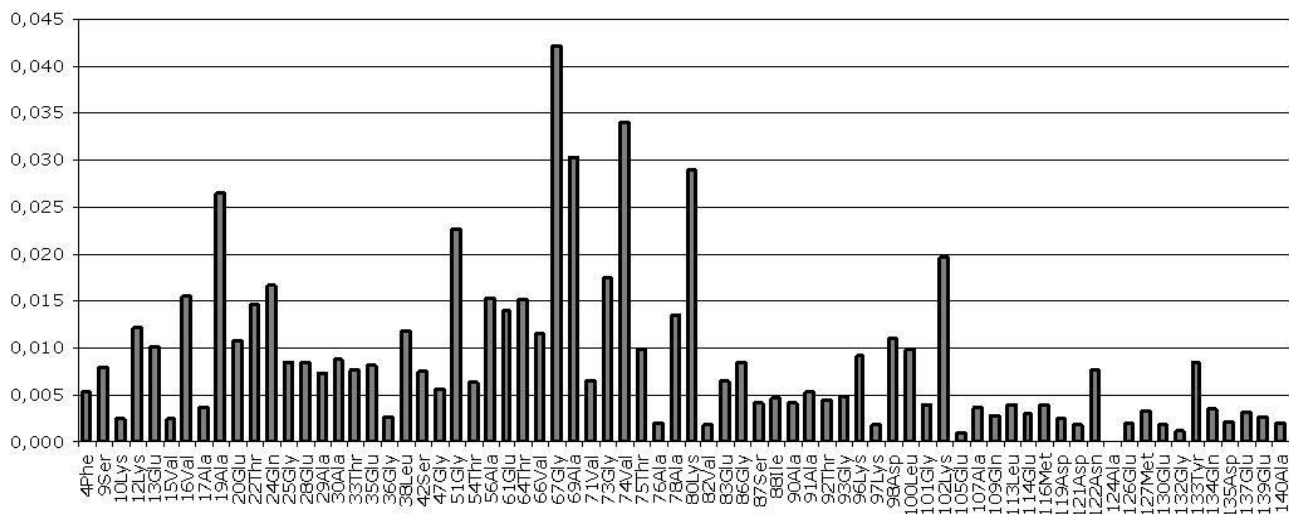


Figura 4.26. Deslocamento químico composto da α -sinucleína após adição da SEPT4C na presença de SDS a 40°C. Os deslocamentos foram calculados como já definido para os resíduos assinalados da α -sinucleína nos dois espectros $^{15}\text{NHSQC}$.

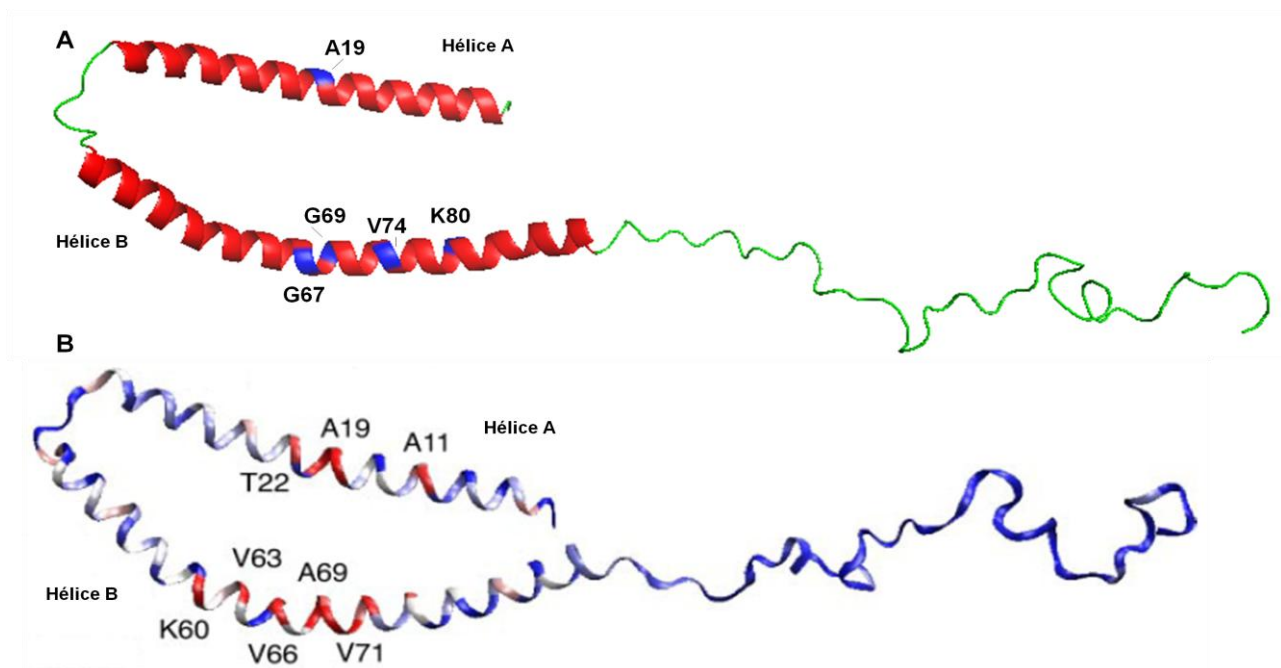


Figura 4.27. Sítio de interação da α -sinucleína com a SEPT4C. A - Os aminoácidos com maior desvio no deslocamento químico observado a 40°C estão marcados em azul na estrutura da α -sinucleína (PDB 1XQ8). B - Na mesma estrutura da α -sinucleína foi destacado em vermelho os aminoácidos de maior deslocamento químico quando interagindo com a Endosulfina α (ENSA), dados extraído de (WOODS et al., 2007). Pode-se observar que região de interação na α -sinucleína tanto para a SEPT4C como para a ENSA ocorrem na região central das duas hélices.

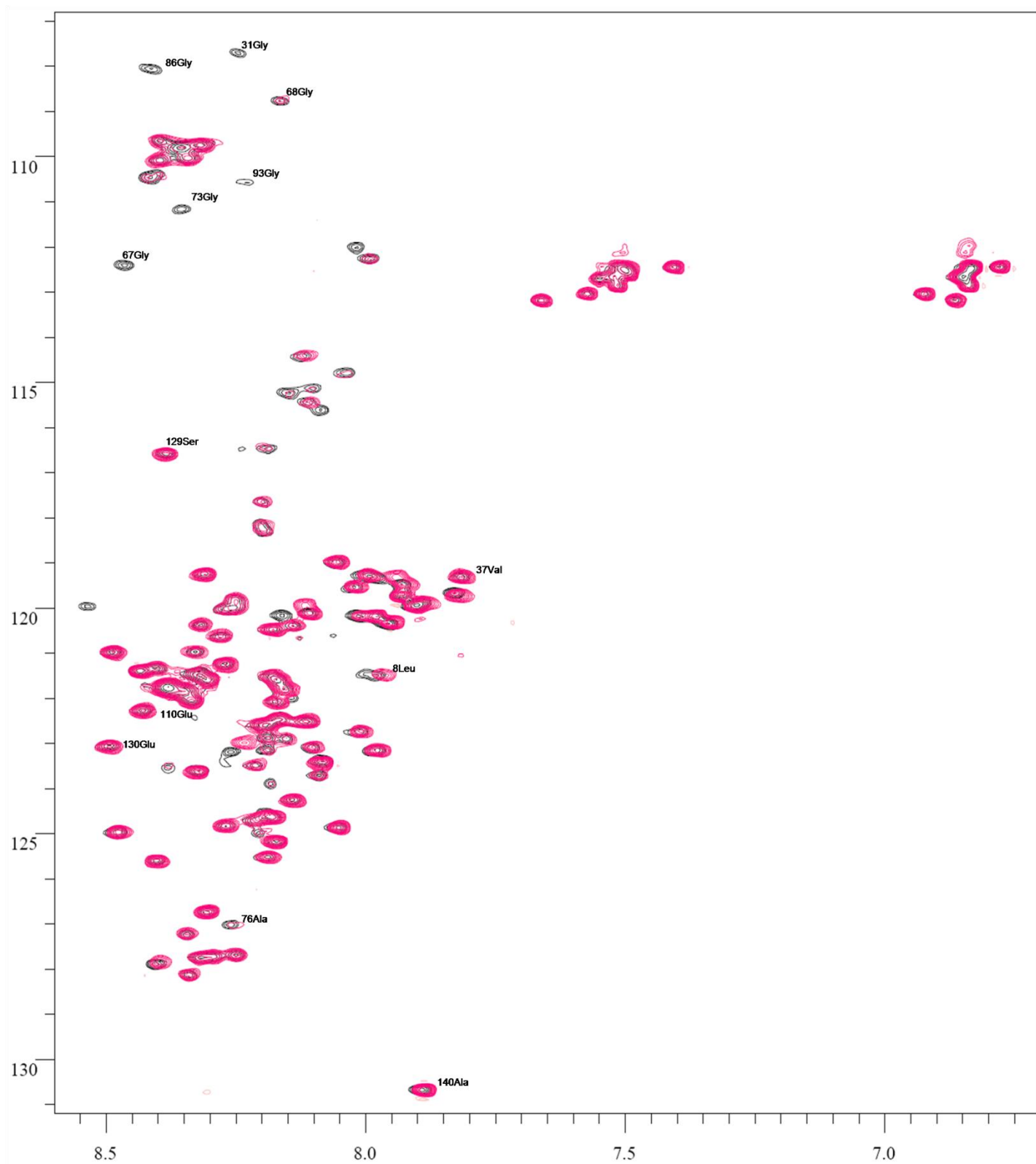


Figura 4.28 - Espectro de ^{15}N HSQC da α -sinucleína com SEPT4GC. Em rosa espectro da α -sinucleína e em preto após a adição da SEPT4GC na razão molar 1:1. Ambos foram medidos em tampão fosfato de potássio 7,4 e 100mM de NaCl com 10% glicerol a 25°C sem SDS.

4.10 Ensaios da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

O estudo de interações proteína-proteína usualmente utiliza diversas metodologias complementares, dependendo de quais informações se deseja obter sobre o sistema. Visando complementar a caracterização estrutural realizada pelas medidas de fluorescência e RMN com dados termodinâmicos, a técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) foi utilizada para determinar a afinidade dessa interação, pois permite a determinação da constante de dissociação (K_D) com precisão, com a vantagem adicional de utilizar pouca quantidade de amostra.

Para estabelecer um ensaio para a determinação da afinidade da α -sinucleína por domínios de SEPT4 foram realizados diversos experimentos utilizando vários domínios de SEPT4 como analito. Todos os ensaios de SPR utilizaram chips em que a α -sinucleína havia sido previamente acoplada, e nos ensaios preliminares foi realizada uma variação sistemática da composição do tampão e da amostra, por exemplo, variações no pH e na concentração de NaCl. Em todos os casos, na medida do possível as condições utilizadas foram idênticas para o tampão e a amostra, reduzindo assim as diferenças entre seus índices de refração.

Um exemplo desses ensaios pode ser observado na Figura 4.29, onde amostras contendo 100 μ M do domínio C-Terminal da SEPT4 foram preparadas com diferentes concentrações de NaCl. Como mostra a figura, a interação do domínio C-Terminal da SEPT4 com a α -sinucleína é influenciada pela concentração de NaCl. Nas condições desse ensaio a resposta máxima parece ocorrer em concentrações acima de 150 mM de NaCl. Concentrações menores que 150 mM de NaCl produzem respostas significativamente menores.

Fixando a concentração de NaCl em 150 mM foram realizados ensaios de variação da concentração do domínio C-terminal da SEPT4, apresentados na Figura 4.30. As etapas de associação e dissociação ocorrem de forma rápida, o que inviabiliza ensaios cinéticos. Contudo, ensaios de afinidade são factíveis nos casos em que a concentração do analito é suficientemente alta para produzir a saturação.

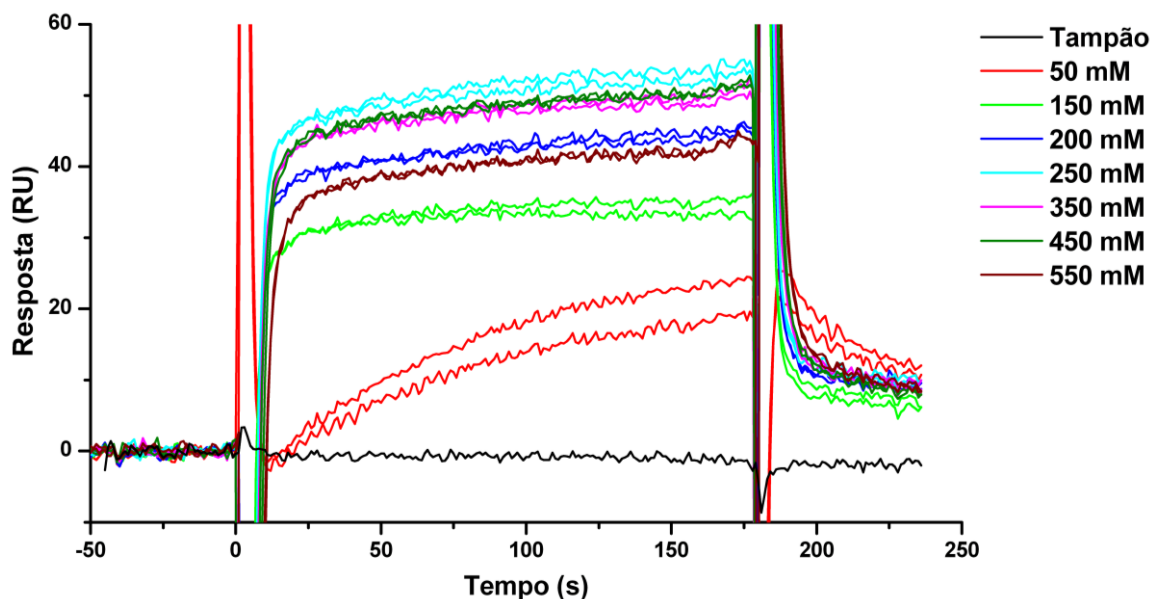


Figura 4.29. Avaliação da influência da concentração de NaCl em amostras contendo 100 μM do domínio C-Terminal da SEPT4. Foram utilizadas concentrações 50 mM a 550 mM de NaCl, e todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Com o intuito de obter a saturação o domínio C-terminal da SEPT4 foi purificado e concentrado a altas concentrações. Com esse material foram realizadas novas medidas com variação da concentração da SEPT4C até 1,1 mM, uma condição próxima a condição de saturação (figura 4.31). A curva de ajuste das respostas no equilíbrio mostrou tendência à saturação (figura 4.32), e permite o cálculo da constante de dissociação (K_D) no equilíbrio. A constante de associação (K_A) obtida pelo ajuste dos dados da curva de saturação para diferentes concentrações da SEPT4C foi $2,57 \times 10^3 \text{M}^{-1} \pm 246$, equivalente a um K_D de aproximadamente 390 μM .

Esse valor de K_D indica uma interação de baixa afinidade e, apesar das medidas apresentarem uma boa reprodutibilidade, a possibilidade de que a interação observada seja inespecífica não foi descartada. A execução de experimentos capazes de definir a especificidade dessa interação é limitada pelas altas concentrações de proteína necessárias para a obtenção da saturação. Como as duas proteínas são fortemente carregadas nesse pH a α -sinucleína carregada negativamente e o C-terminal carregado positivamente levanta a possibilidade que seja uma interação sustentada por forças eletrostáticas. Na literatura há relatos que metais ligam à α -sinucleína e causam mudanças em sua conformação, contudo o Na^+ parece não induzir mudanças estruturais (UVERSKY et al., 2001). Ensaios preliminares com 5 e 10 mM de MgCl_2 mostraram aumento na intensidade

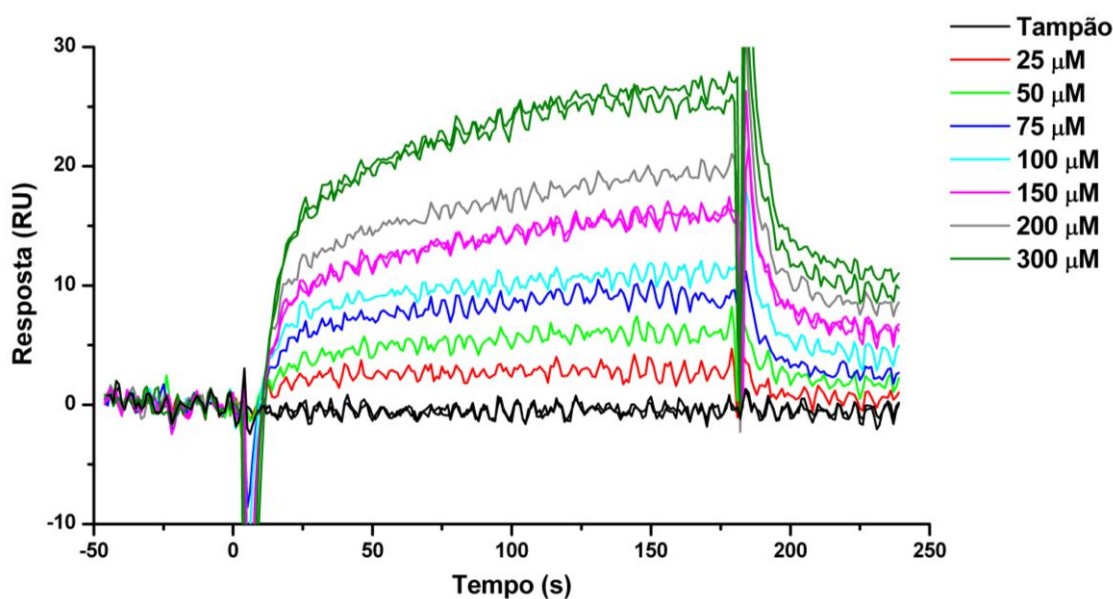


Figura 4.30. Interação do domínio C-Terminal da septina 4 com a α -sinucleína imobilizada. Concentrações de 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 μM do domínio C-Terminal da septina 4 apresentam respostas distintas. Algumas medidas são apresentadas em duplicata para demonstrar a reprodutibilidade das medidas. O tampão utilizado possui pH 7.4 e contém 50 mM de fosfato de potássio e 150 mM de NaCl.

da resposta, o que pode indicar que uma alguma mudança conformacional induzida pelo magnésio poderia ser um fator positivo para a interação ou que o metal esteja auxiliando na interação. Contudo, novas medidas precisam ser realizadas para confirmar essa hipótese. Outra possível explicação para a baixa afinidade seria a que a interação seria dependente da conformação em hélice da α -sinucleína e nessas condições o domínio C-terminal da SEPT4 teria uma interação de maior afinidade, como sugerido pelos experimentos apresentados anteriormente. Para testar essa hipótese seria necessário realizar as medidas na presença de SDS, que ainda não foi feito pelas dificuldades encontradas para introduzir o SDS no sistema. Mesmo assim é um experimento que planejamos realizar no futuro.

Medidas também foram feitas com outros domínios da SEPT4, contudo a necessidade do emprego de tampões contendo 10% de glicerol para a execução de experimentos envolvendo construções que possuem o domínio GTPase adiciona um nível a mais de complexidade às medidas e suas análises, devido ao alto índice de refração do glicerol. Por exemplo, diferenças nos índices de refração entre os tampões e as amostras tornaram as medidas realizadas com o SEPT4G difíceis de serem interpretadas.

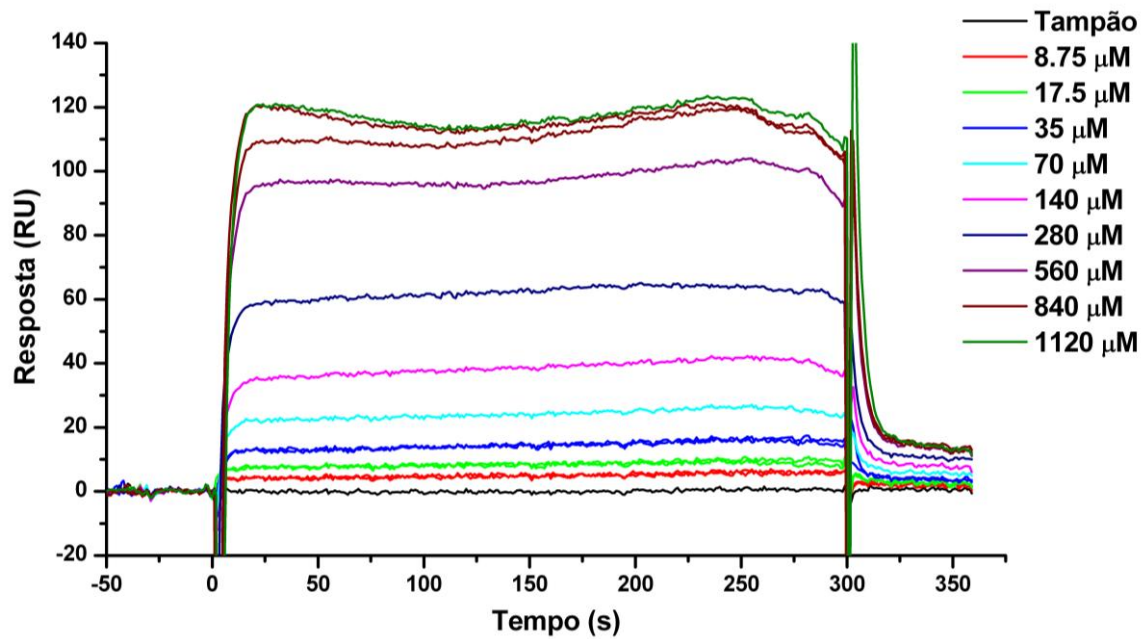


Figura 4.31. Ensaio de saturação do domínio C-Terminal da SEPT4 com a α -sinucleína imobilizada. Diferentes concentrações do domínio C-Terminal da SEPT4 foram analisadas até concentrações próximas da saturação.

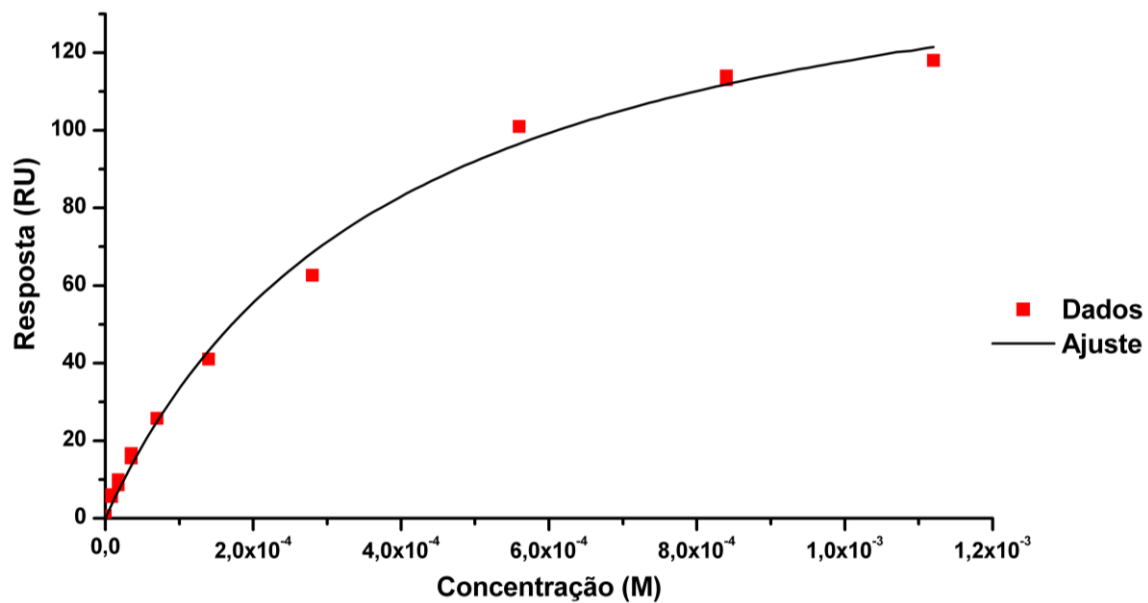


Figura 4.32. Curva de ajustes dos dados de ligação do domínio C-terminal da SEPT4 a α -sinucleína. Com base nos dados obtidos na figura X uma curva foi ajustada que forneceu um $K_D = 390 \mu\text{M}$.

A proteína inteira foi testada e o sensograma observado sugere a ocorrência da interação específica com a α -sinucleína (figura 4.33). O SEPT4GC também foi testado e os resultados apresentam claros indícios de interações inespecíficas, pois os sensogramas apresentam retas e não exponenciais, tanto na associação quanto na dissociação, indicando

que não ocorre uma saturação nas concentrações utilizadas (figura 4.34). Esse resultado sugere duas hipóteses, que se trata de uma interação inespecífica ou que a SEPT4GC está se ligando a α -sinucleína e posteriormente se polimerizando no chip. Nesses experimentos foram utilizadas baixas concentrações do analito, permitindo apenas a execução de medidas qualitativas.

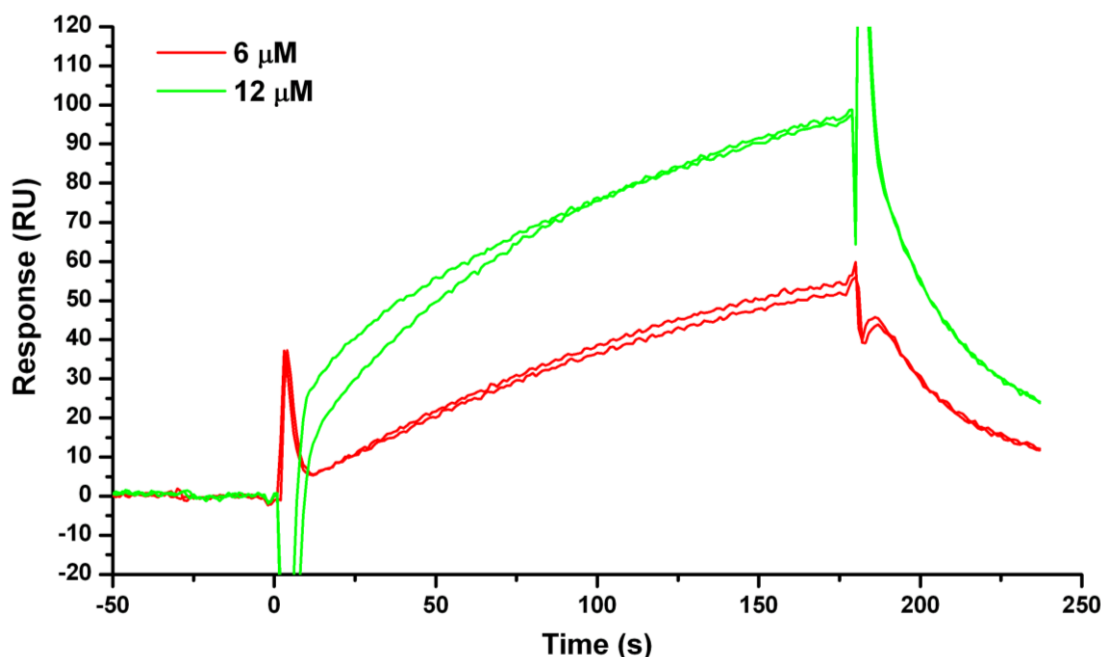


Figura 4.33. Interação da SEPT4 com a α -sinucleína . Sensograma obtido com a SEPT4 inteira em tampão 50mM tris pH7.5, 100mM NaCl e 10% de glicerol.

Essas medidas de SPR apresentam resultados preliminares que precisam ser confirmados, e a triagem de condições contendo diferentes metais e também SDS deve ser realizada para que seu impacto na afinidade de interação seja verificado. Além disso, um dos ensaios a ser realizado no futuro é utilizar medidas com o domínio C-terminal sem a cauda de seis histidinas, para que assim seja confirmado que nenhuma interação inespecífica ocorre pela cauda de histidinas. Uma vez que todas as medidas foram realizadas utilizando a α -sinucleína como ligante, ela foi a proteína imobilizada no chip, a outra abordagem a ser testada é imobilizar o C-terminal da SEPT4 e usar a α -sinucleína como analito. As medidas envolvendo outros domínios da SEPT4 também devem ser repetidas, apesar de as limitações envolvidas na obtenção de amostras de maior concentração indicar que apenas a obtenção de dados qualitativos é factível.

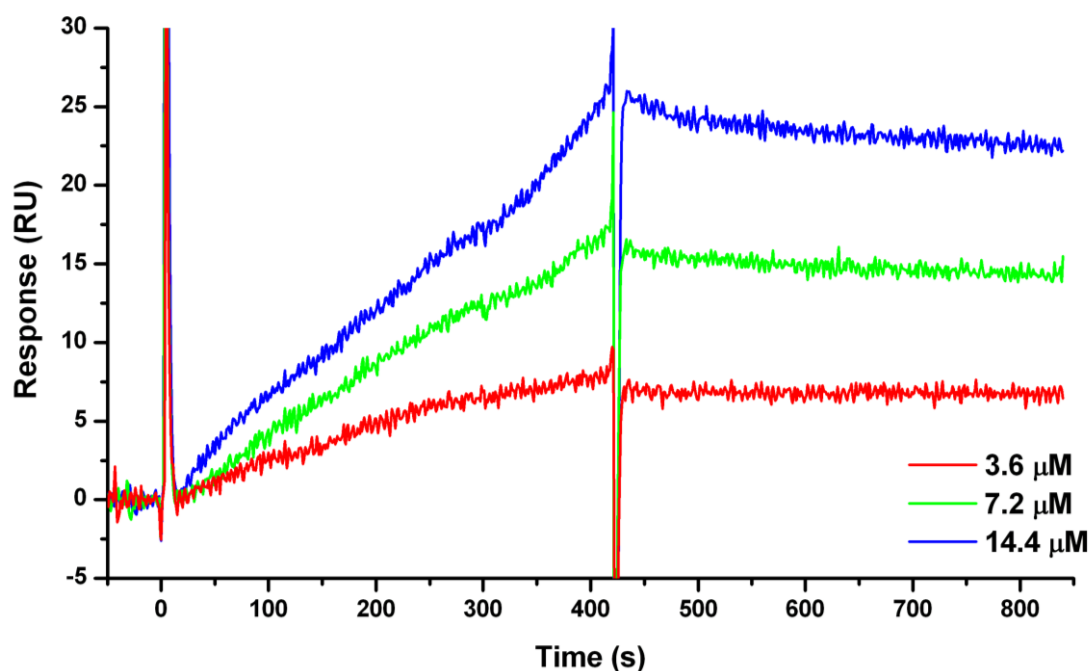


Figura 4.34. Figure 4 - Interação da SEPT4GC com a α -sinucleína . Sensograma obtido após a injeção de três concentrações diferentes da SEPT4GC em 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,4 ; 30 mM de NaCl e 10% glicerol.

As informações que foram obtidas com os dados de anisotropia de fluorescência, RMN e SPR todas indicam que a interação SEPT4 – α -sinucleína é mediada pelo domínio C-terminal, mesmo que não exclusivamente por ele, e mais ainda que a interação mostra-se dependente da conformação da α -sinucleína. Os resultados apresentados neste trabalho são as primeiras previsões físico-químicas da interação direta entre estas duas proteínas.

5 CONCLUSÕES

Septinas são proteínas conservadas desde fungos até mamíferos que parecem estar envolvidas em uma série de processos, muitos desses ainda não bem esclarecidos. Com intuito de contribuir com maiores informações sobre uma septinas, em especial a SEPT4, esta dissertação teve como foco estudos de diferentes aspectos dessa proteína, principalmente buscando entender mais sobre suas interações com proteínas parceiras.

O objetivo inicial desse trabalho era desvendar a estrutura da SEPT4 para alcançar esse objetivo foi realizado um esforço de encontrar um sistema de expressão e purificação eficiente para obtenção da SEPT4. Para isso o gene da sept4 foi clonado em um novo vetor e tentativas de expressão foram realizadas sem sucesso de obter a proteína solúvel. Outra tentativa realizada foi utilizar um sistema eucariótico. O gene da sept4 foi clonado para a expressão em células de insetos e um baculovírus recombinante – AcSept4 - foi obtido e utilizado para a expressão da sept4. A expressão em células de insetos foi realizada com sucesso, contudo sérias dificuldades foram encontradas para a purificação da proteína.

As dificuldades em obter a SEPT4 inteira nas condições ideais para ensaios de cristalização tornou necessário olhar para a necessidade de encontrar suas proteínas parceiras e com isso tentar conhecer mais sobre as funções da SEPT4 e ao mesmo tempo encontrar um parceiro que pudesse talvez contribuir para sua maior estabilidade. Convergindo com esse objetivo surgiu o projeto de estabelecermos as interações entre as septinas, o chamado “Septinoma”. Para isso a SEPT4 foi utilizada como isca em ensaios de duplo-híbrido e como a proteína inteira apresentou o inesperado comportamento de auto ativar o sistema os ensaios puderam ser realizados apenas com a região do domínio GTPase e C-terminal, que correspondem aos resíduos 124 a 478. Das proteínas recuperadas do duplo-híbrido foram identificados 27 cDNAs, em sua maioria septinas, todas elas do grupo II das septinas: SEPT6, SEPT8, SEPT10 e SEPT11. Esses resultados nos apresentam a possível rede de interação da SEPT4 entre as septinas humanas. Mais especificamente nossos resultados sugerem que a SEPT4 interage especificamente com as septinas do grupo II, e que provavelmente substitui a SEPT2 no filamento canônico 2-6-7. Isso nos abre a possibilidade de eleger os candidatos para coexpressão e construção de novos complexos de septinas humanas.

Os resultados do duplo híbrido também forneceram evidências de outra possível interessante interação. Trata-se da UBC-9 uma proteína essencial para o processo de sumoilação. Isso nos indica que a SEPT4 pode estar sendo sumoilada, e talvez essa modificação pós-traducional esteja envolvida com a regulação de funções da SEPT4, algo ainda não descrito na literatura. Contudo, todas as interações identificadas necessitam ser confirmadas por outras metodologias.

O comportamento de agregação em fibras amilóides já foi descrito para a SEPT4. Sua identificação nos corpos de Lewy presentes no cérebro de paciente com a doença de Parkinson junto com a α -sinucleína sugeriu a interação dessas duas proteínas e seu possível envolvimento no desenvolvimento da doença. Uma das propostas desse trabalho foi a caracterização estrutural dessa interação. Com a utilização de diferentes técnicas tentou-se observar o comportamentos de diferentes domínios das SEPT4 na presença da α -sinucleína e vice-versa. Essa interação parece possuir algumas particularidades, sendo que uma delas é que a interação parece ser dependente da conformação da α -sinucleína. Os resultados obtidos pelos ensaios de anisotropia de fluorescência e RMN na presença de SDS nos indicam que quando a α -sinucleína está na conformação de α -hélice parece ocorrer um aumento da afinidade pelo domínio C-terminal da SEPT4 e mais ainda os resultados de anisotropia sugerem uma estequiometria de 1:1. Cabe ressaltar que a interação de baixa afinidade observada pelos experimentos de SPR, pode indicar a necessidade da conformação da α -sinucleína para que ocorra a interação com maior afinidade. Os dados de SPR também sinalizam que o domínio de interação pode não ser apenas o C-terminal e deve envolver outra região da SEPT4, talvez algum pedaço do domínio GTPase. Outra possibilidade que deve ser considerada é que alguma modificação pós-traducional ou mesmo uma terceira proteína esteja envolvida para que essa interação tenha maior afinidade. Muitos ensaios precisam ser repetidos e redesenhados para que se possa construir todo o panorama dessa interação, mas uma parte dele começou a ser desenhado nessa dissertação.

O trabalho desenvolvido nessa dissertação enriquece o conhecimento atual de septinas em geral e, sobretudo da septina 4 humana abrindo diferentes perspectivas para um maior conhecimento das funções desempenhadas por essa proteína.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Clonar e expressar a SEPT4 fusionada a proteínas carreadoras como SUMO e MBP;
- ✓ Clonar e expressar a SEPT4 em células de insetos com uma calda de seis histidinas no C-terminal;
- ✓ Realizar a coexpressão da SEPT4 com as outras septinas identificadas no duplo-híbrido e estudar os novos heterofilamentos formados. Uma vez obtidos os novos complexos, realizar ensaios de cristalização e crio-microscopia eletrônica;
- ✓ Confirmar as novas interações identificadas no duplo híbrido;
- ✓ Realizar uma nova triagem com as presas da biblioteca de leucócitos;
- ✓ Realizar novos ensaios de ressonância magnética nuclear, anisotropia de fluorescência e SPR com a SEPT4 e α -sinucleína com novas variáveis, incluindo SPR do C-terminal na presença de SDS;
- ✓ Realizar ensaios in vivo para compreender os efeitos dessa interação na célula.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, n.3, p.403-10, Oct 5. 1990

ANCKAR, J.; SISTONEN, L. SUMO: getting it on. **Biochem Soc Trans**, n.Pt 6, p.1409-13, Dec. 2007

BARRAL, Y.; KINOSHITA, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. **Curr Opin Cell Biol**, n.1, p.12-8, Feb. 2008

BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P.; PARK, S. S.; GARCIA, G., 3RD; PATANWALA, I.; NG, H. L.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.24, p.8274-9, Jun 17. 2008

BLASER, S.; HORN, J.; WURMELL, P.; BAUER, H.; STRUMPELL, S.; NURDEN, P.; PAGENSTECHER, A.; BUSSE, A.; WUNDERLE, D.; HAINMANN, I.; ZIEGER, B. The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. **Thromb Haemost**, n.5, p.959-66, May. 2004

BLASER, S.; ROSELER, S.; REMPP, H.; BARTSCH, I.; BAUER, H.; LIEBER, M.; LESSMANN, E.; WEINGARTEN, L.; BUSSE, A.; HUBER, M.; ZIEGER, B. Human endothelial cell septins: SEPT11 is an interaction partner of SEPT5. **J Pathol**, n.1, p.103-10, Sep. 2006

BOETTCHER, J. M.; HARTMAN, K. L.; LADROR, D. T.; QI, Z.; WOODS, W. S.; GEORGE, J. M.; RIENSTRA, C. M. Membrane-induced folding of the cAMP-regulated phosphoprotein endosulfine- α . **Biochemistry**, n.47, p.12357-64, Nov 25. 2008

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry. Techniques for the study of biological structure and function** New York: W. H. Freeman, v. II. 1980

CARMELIET, P.; STORKEBAUM, E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. **Semin Cell Dev Biol**, n.1, p.39-53, Feb. 2002

CHANDRA, S.; CHEN, X.; RIZO, J.; JAHN, R.; SUDHOF, T. C. A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. **J Biol Chem**, n.17, p.15313-8, Apr 25. 2003

CONWAY, K. A.; HARPER, J. D.; LANSBURY, P. T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. **Nat Med**, n.11, p.1318-20, Nov. 1998

DELAGLIO, F.; GRZESIEK, S.; VUISTER, G. W.; ZHU, G.; PFEIFER, J.; BAX, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **J Biomol NMR**, n.3, p.277-93, Nov. 1995

DESTERRO, J. M.; RODRIGUEZ, M. S.; HAY, R. T. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. **Mol Cell**, n.2, p.233-9, Aug. 1998

ELIEZER, D.; KUTLUAY, E.; BUSSELL, R., JR.; BROWNE, G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. **J Mol Biol**, n.4, p.1061-73, Apr 6. 2001

GARCIA, W.; DE ARAUJO, A. P.; NETO MDE, O.; BALLESTERO, M. R.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry**, n.46, p.13918-31, Nov 21. 2006

GASTEIGER E., H. C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A.; **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**: John M. Walker (ed). 2005 (The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.)

GLADFELTER, A. S.; MONTAGNA, C. Seeking truth on Monte Verita. Workshop on the molecular biology and biochemistry of septins and septin function. **EMBO Rep**, n.12, p.1120-6, Dec. 2007

GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Curr Opin Microbiol**, n.6, p.681-9, Dec. 2001

GOTTFRIED, Y.; ROTEM, A.; LOTAN, R.; STELLER, H.; LARISCH, S. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. **EMBO J**, n.7, p.1627-35, Apr 7. 2004

HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. Expression profiling the human septin gene family. **J Pathol**, n.3, p.269-78, Jul. 2005

HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. **J Pathol**, n.4, p.489-505, Nov. 2004

HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Exp Cell Res**, n.2, p.265-76, Dec. 1971

HIETAKANGAS, V.; ANCKAR, J.; BLOMSTER, H. A.; FUJIMOTO, M.; PALVIMO, J. J.; NAKAI, A.; SISTONEN, L. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.1, p.45-50, Jan 3. 2006

HUANG, H. B.; CHEN, Y. C.; HORIUCHI, A.; TSAI, L. H.; LIU, H. T.; CHYAN, C. L.; HSIEH, M. J.; LIU, C. K.; LIN, F. M.; GREENGARD, P.; NAIRN, A. C.; SHIAO, M. S.; LIN, T. H. Backbone ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments of ARPP-19. **J Biomol NMR**, n.4, p.383-4, Apr. 2001

IHARA, M.; TOMIMOTO, H.; KITAYAMA, H.; MORIOKA, Y.; AKIGUCHI, I.; SHIBASAKI, H.; NODA, M.; KINOSHITA, M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **J Biol Chem**, n.26, p.24095-102, Jun 27. 2003

IHARA, M.; YAMASAKI, N.; HAGIWARA, A.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; HIKAWA, R.; TOMIMOTO, H.; NODA, M.; TAKANASHI, M.; MORI, H.; HATTORI, N.; MIYAKAWA, T.; KINOSHITA, M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity. **Neuron**, n.4, p.519-33, Feb 15. 2007

JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R.; SHEFFIELD, P. J.; KINOSHITA, M.; NODA, M.; HAYSTEAD, T.; MACARA, I. G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nat Cell Biol**, n.10, p.861-6, Oct. 2001

JOHNSON, E. S.; BLOBEL, G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. **J Cell Biol**, n.5, p.981-94, Nov 29. 1999

KAY, B. K.; WILLIAMSON, M. P.; SUDOL, M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. **FASEB J**, n.2, p.231-41, Feb. 2000

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta**, n.2, p.119-39, Aug 10. 2005

KINOSHITA, A.; KINOSHITA, M.; AKIYAMA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; KUMAR, S.; NODA, M.; KIMURA, J. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, n.5, p.1551-60, Nov. 1998

KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **J Biochem**, n.4, p.491-6, Oct. 2003

LARISCH, S.; YI, Y.; LOTAN, R.; KERNER, H.; EIMERL, S.; TONY PARKS, W.; GOTTFRIED, Y.; BIRKEY REFFEY, S.; DE CAESTECKER, M. P.; DANIELPOUR, D.; BOOK-MELAMED, N.; TIMBERG, R.; DUCKETT, C. S.; LECHLEIDER, R. J.; STELLER, H.; ORLY, J.; KIM, S. J.; ROBERTS, A. B. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. **Nat Cell Biol**, n.12, p.915-21, Dec. 2000

LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A.; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. **J Mol Biol**, n.1, p.1-7, Feb 8. 2008

MACARA, I. G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C. M.; GLOTZER, M.; HAYASHI, Y.; HSU, S. C.; KENNEDY, M. B.; KINOSHITA, M.; LONGTINE, M.; LOW, C.; MALTAIS, L. J.; MCKENZIE, L.; MITCHISON, T. J.; NISHIKAWA, T.; NODA, M.; PETTY, E. M.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R.; ROBINSON, P. J.; ROTH, D.; RUSSELL, S. E.; STUHLMANN, H.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; TRIMBLE, W. S.; WARE, J.; ZELEZNIK-LE, N. J.; ZIEGER, B. Mammalian septins nomenclature. **Mol Biol Cell**, n.12, p.4111-3, Dec. 2002

MAIMAITIYIMING, M.; KUMANOGOH, H.; NAKAMURA, S.; NAGATA, K.; SUZAKI, T.; MAEKAWA, S. Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain. **J Neurochem**, n.3, p.1175-83, Aug. 2008

MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **J Cell Biol**, n.6 Pt 1, p.1457-70, Dec. 1996

MORAN, L. B.; CROISIER, E.; DUKE, D. C.; KALAITZAKIS, M. E.; RONCAROLI, F.; DEPREZ, M.; DEXTER, D. T.; PEARCE, R. K.; GRAEBER, M. B. Analysis of alpha-synuclein, dopamine and parkin pathways in neuropathologically confirmed parkinsonian nigra. **Acta Neuropathol**, n.3, p.253-63, Mar. 2007

NAGATA, K.; ASANO, T.; NOZAWA, Y.; INAGAKI, M. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. **J Biol Chem**, n.53, p.55895-904, Dec 31. 2004

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: W. H. Freeman and Company. 1992

OLIVEIRA, J. V.; WOLFF, J. L.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; DE CASTRO, M. E.; DE SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **J Gen Virol**, n.Pt 11, p.3233-50, Nov. 2006

PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evol Biol**, p.103. 2007

RAHIMI, N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. **Front Biosci**, p.818-29. 2006

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

SHEHADEH, L.; MITSU, G.; ADI, N.; BISHOPRIC, N.; PAPAPETROPOULOS, S. Expression of Lewy body protein septin 4 in postmortem brain of Parkinson's disease and control subjects. **Mov Disord**, n.2, p.204-10, Jan 30. 2009

SILVA, W. J. G. D. **Estudos estruturais e bioquímicos das septinas humanas bradeiona 'ALFA' e 'BETA'** (Tese (Doutorado)). IFSC - INST FISICA DE SAO CARLOS, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. 136 p.

SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KUHLMANN, D.; MACARA, I. G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOFER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, n.7160, p.311-5, Sep 20. 2007

SITZ, J. H.; BAUMGARTEL, K.; HAMMERLE, B.; PAPADOPOULOS, C.; HEKERMAN, P.; TEJEDOR, F. J.; BECKER, W.; LUTZ, B. The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. **Neuroscience**, n.3, p.596-605, Dec 2. 2008

STONE, D. K.; REYNOLDS, A. D.; MOSLEY, R. L.; GENDELMAN, H. E. Innate and Adaptive Immunity for the Pathobiology of Parkinson's Disease. **Antioxid Redox Signal**, Feb 25. 2009

TAKAHASHI, Y.; IWASE, M.; KONISHI, M.; TANAKA, M.; TOH-E, A.; KIKUCHI, Y. Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, n.3, p.582-7, Jun 16. 1999

TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHI, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. **Curr Biol**, n.2, p.140-5, Jan 27. 2009

TANAKA, M.; TANAKA, T.; KIJIMA, H.; ITOH, J.; MATSUDA, T.; HORI, S.; YAMAMOTO, M. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. **Biochem Biophys Res Commun**, n.3, p.547-53, Aug 24. 2001

ULMER, T. S.; BAX, A.; COLE, N. B.; NUSSBAUM, R. L. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. **J Biol Chem**, n.10, p.9595-603, Mar 11. 2005

UVERSKY, V. N. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. **J Neurochem**, n.1, p.17-37, Oct. 2007

UVERSKY, V. N.; LI, J.; FINK, A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. **J Biol Chem**, n.47, p.44284-96, Nov 23. 2001

VAN CRIEKINGE, W.; BEYAERT, R. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. **Biol Proced Online**, p.1-38, Oct 4. 1999

VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. **Trends Cell Biol**, n.8, p.414-24, Aug. 2005

VRANKEN, W. F.; BOUCHER, W.; STEVENS, T. J.; FOGH, R. H.; PAJON, A.; LLINAS, M.; ULRICH, E. L.; MARKLEY, J. L.; IONIDES, J.; LAUE, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, n.4, p.687-96, Jun 1. 2005

WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, n.6, p.478-89, Jun. 2008

WOODS, W. S.; BOETTCHER, J. M.; ZHOU, D. H.; KLOEPPER, K. D.; HARTMAN, K. L.; LADROR, D. T.; QI, Z.; RIENSTRA, C. M.; GEORGE, J. M. Conformation-specific binding of alpha-synuclein to novel protein partners detected by phage display and NMR spectroscopy. **J Biol Chem**, n.47, p.34555-67, Nov 23. 2007

ZHANG, J.; KONG, C.; XIE, H.; MCPHERSON, P. S.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W. S. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Curr Biol**, n.24, p.1458-67, Dec 16-30. 1999

ZIEGER, B.; TRAN, H.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; ZGAGA-GRIESZ, A.; BLASER, S.; WARE, J. Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. **Gene**, n.2, p.197-203, Dec 31. 2000

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)