

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOCI NEUBY ALVES MACEDO

**Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise
de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e
SEPT7**

São Carlos

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JOCI NEUBY ALVES MACEDO

Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7

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

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

São Carlos

2010

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Macedo, Joci Neuby Alves

Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7./ Joci Neuby Alves Macedo; orientadora Ana Paula Ulian de Araujo.-- São Carlos, 2010.
160 p.

Tese (Doutorado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Septinas. 2. Atividade GTPásica. 3. Sistema do duplo híbrido em leveduras. I.Título.

MACEDO, J.N.A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7.** 2010. 160p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
80	29	homologia	similaridade
94	4	endocitose	exocitose
118	7	20%	40%
122	22	Nas temperaturas de 37 e 45 °C	Na temperatura de 37 °C
122	24	Diferentemente é observado a 55 °C	Diferentemente são observados a 45 e 55 °C
33	Figura 3A	NC	G
33	Figura 3A	G	NC

FOLHA DE APROVAÇÃO

Joci Neuby Alves Macêdo

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular

Aprovado(a) em: 24.09.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Richard Charles Garratt

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Maria Celia Bertolini

Instituição: UNESP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Ricardo De Marco

Instituição: IFSC/USP

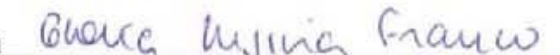
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Gloria Regina Franco

Instituição: UFMG

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Jörg Kobarg

Instituição: ABTLuS

Assinatura



A minha mãe Nina, meus irmãos Joilson e Ana Rita pelo apoio, confiança, incentivo e amor,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida;

À Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, pela orientação, confiança e amizade;

Ao Dr. Jörg Kobarg e ao doutorando Marcel Nakahira pelos ensinamentos e discussões referente aos experimentos do duplo híbrido;

Aos queridos técnicos e amigos do Grupo de Biofísica do IFSC: Bel, Andressa e João Possato, que são nosso braço direito;

Aos técnicos da cristalografia Suzana, Maria, Bianca e Kelven que sempre nos socorrem em momentos de sufoco;

Aos alunos de iniciação científica, Ricardo, Heloize e Atílio que co-orientei e com os quais muito aprendi;

Aos meus iniciadores na vida científica, Dra. Elizabeth Pacheco Batista e Dr. Carlos Priminho Pirovani;

Aos amigos do Grupo de Biofísica e da vida, pelo apoio e, em especial, pela amizade;

Aos docentes, pela participação na minha formação profissional;

A todas as pessoas, que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade;

A CAPES e FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado.

“The real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes, but in having new eyes.”

Marcel Proust

RESUMO

MACEDO, J.N.A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7.** 2010. 160p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Septinas são proteínas que pertencem a super família das GTPases e que foram inicialmente identificadas em *Saccharomyces cerevisiae*, mas logo em seguida, também em eucariotos superiores, exceto em plantas. Estas proteínas estão envolvidas em uma variedade de processos celulares tais como segregação de cromossomos, polaridade celular, dinâmica da membrana, tráfego de vesículas, exocitose, apoptose, entre outros. Mutações ou alterações no padrão de expressão de septinas são associadas com vários cânceres e doenças neurológicas. Objetivando contribuir com informações funcionais sobre tais proteínas, as septinas humanas 1, 5 e 7 foram usadas como iscas em ensaios de duplo híbrido em leveduras visando à identificação de seus parceiros protéicos. Após a varredura de bibliotecas de cDNA de leucócitos e cérebro fetal humano, os parceiros protéicos predominantemente encontrados foram outras septinas de grupos diferentes aos das iscas. As interações septina-septina envolveram o domínio de ligação a GTP. Ainda, outros parceiros, diferentes de septinas, foram também identificados nas bibliotecas e estes se mostraram funcionalmente relacionados à endocitose, à regulação da atividade de GTPases, ao tráfego intracelular, aos ciclos de sumoilação, à manutenção da placa metafásica e à maturação do centróssomo. Algumas destas funções são inéditas e foram pela primeira vez relacionadas às septinas. Este trabalho também esteve voltado à caracterização biofísica das septinas 3 e 5 (SEPT3 e SEPT5). Muitos protocolos diferentes foram desenvolvidos na tentativa de obter amostras homogêneas de SEPT5, mas não foram bem sucedidos. Por outro lado, SEPT3 recombinante, destituída do domínio amino-terminal (SEPT3GC) foi eficientemente produzida em *E. coli*. O estado monomérico de SEPT3GC em solução foi confirmado por cromatografia de exclusão molecular e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). SEPT3GC mostrou-se ativa e capaz de hidrolizar GTP *in vitro*. A afinidade de SEPT3GC por GTP γ S e GDP foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC), sendo que o K_D de SEPT3GC para GTP γ S foi de 5,43 μ M e a ligação para este nucleotídeo foi dependente de Mg²⁺. A ligação para GDP não foi detectável. Agregados de SEPT3GC induzidos por temperatura foram capazes de ligar a sonda fluorescente tioflavina-T, sugerindo uma natureza amilóide para tais estruturas.

Palavras-chave: Septinas. Atividade GTPásica. Sistema do duplo híbrido em leveduras.

ABSTRACT

MACEDO, J.N.A. **Functional and structural studies of human septins: GTP hydrolyse and binding, and screening of functional partners to SEPT1, SEPT5 e SEPT7.** 2010. 160p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Septins are proteins that belong to the superfamily of GTPases, which were initially identified in *Saccharomyces cerevisiae*, and then in higher eukaryotes, except plants. These proteins are involved in a variety of cellular processes such as chromosome segregation, cell polarity, membrane dynamics, vesicle trafficking, exocytosis, apoptosis, among others. Mutations or changes in the expression of septins have been associated with various cancers and neurological diseases. Aiming to provide functional information about these proteins, the human septins 1, 5 and 7 were used as baits in yeast two-hybrid assay in order to identify their protein partners. After screening cDNA libraries from human leukocytes and fetal brain, the protein partners predominantly found were septins from others groups. The septin-septin interactions involved the GTP binding domain. Others non-septins interactors have also been identified in the libraries and were functionally related to endocytosis, the regulation of the GTPase activity, intracellular trafficking, sumoylation, maintenance of metaphase plate and centrosome maturation. Some of these functions are new and were related to the septins for the first time. This work also focused on the biophysical characterization of the septins 3 and 5 (SEPT3 and SEPT5). Many different protocols were developed aiming to obtain homogeneous samples of SEPT5, but were not successful. On the other hand, recombinant SEPT3, without the amino-terminal domain (SEPT3GC), was produced in a homogeneous form in *E. coli*. SEPT3GC is monomeric in solution as confirmed by size exclusion chromatography and small-angle X-ray scattering (SAXS). Also, SEPT3GC has shown to be active and able to hydrolyze GTP in vitro. The SEPT3GC affinity by GTP γ S and GDP were evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC). The K_D for GTP γ S was about 5,43 μ M and it was observed to be Mg²⁺ dependent. The binding to GDP was not detectable. SEPT3GC aggregates induced by temperature were able to bind the thioflavin-T fluorescent probe, suggesting an amyloid nature for such structures.

Keywords: Septins. GTPase activity. Yeast two hybrid system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Localização das septinas no ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , visualizado por microscopia de fluorescência	27
Figura 2-	Classificação e organização estrutural das septinas humanas	30
Figura 3-	Estrutura do complexo formado pelas septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7 e de três monômeros de SEPT2G	33
Figura 4-	Fluxograma das etapas do ensaio do duplo híbrido em leveduras baseado no sistema Gal4 com os genes repórteres lacZ e HIS3	46
Figura 5-	Confirmação da clonagem de SEPT5 em pBTM116kan	78
Figura 6-	Teste de autoativação de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 fusionadas ao domínio de ligação ao DNA LexA expressas em <i>S. cerevisiae</i>	79
Figura 7-	Representação gráfica dos parceiros protéicos de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 identificados através do duplo híbrido	85
Figura 8-	Esquema ilustrativo de possíveis hexâmeros de septinas dos grupos II, III e IV formados por SEPT1 e SEPT5 com suas parceiras identificadas através do duplo híbrido.	88
Figura 9-	Esquema ilustrativo de possíveis distribuições das septina nos complexos SEPT7-SEPT9-SEPT11 e SEPT3-SEPT5-SEPT7 baseado no hexâmero 7-6-2-2-6-7	88
Figura 10-	Análise qualitativa da força das interações	98
Figura 11-	Análise do padrão de restrição dos clones da septina 3	100
Figura 12-	Esquema ilustrativo das proteínas recombinantes após expressão em <i>E. coli</i>	100
Figura 13-	Perfil cromatográfico e eletroforético em gel nativo de SEPT3NGC	102
Figura 14-	Perfil cromatográfico e eletroforético em gel nativo de SEPT3GC após 2º teste de purificação.	103
Figura 15-	Análise da expressão e purificação da SEPT3GC	105
Figura 16-	Calibração da coluna Superdex 200	107
Figura 17-	Espectro de CD de SEPT3GC	108
Figura 18-	Influência do pH na composição de estrutura secundária da SEPT3GC avaliada por CD	110

Figura 19-	Perfil cromatográfico do GDP e GTP em uma coluna de troca aniônica	112
Figura 20-	Análise do teor de nucleotídeo de SEPT3GC	113
Figura 21-	Análise da atividade GTPásica de SEPT3GC	114
Figura 22-	Calorimetria de titulação isotérmica de SEPT3GC com GTP γ S	115
Figura 23-	Termograma da titulação de SEPT3GC com GTP γ S na ausência de íons magnésio	117
Figura 24-	Calorimetria de titulação isotérmica de SEPT3GC com GDP	118
Figura 25-	Análise da interação de SEPT3GC com mant-GTP e mant-GDP	119
Figura 26-	Análise da influência de nucleotídeo no estado oligomérico de SEPT3GC	121
Figura 27-	Alterações conformacionais em SEPT3GC em função da temperatura	123
Figura 28-	Perfil eletroforético de SEPT3GC após tratamento com a protease trombina	125
Figura 29-	Cristais de SEPT3GC e seu padrão de difração	126
Figura 30-	Alinhamento de sequências primárias da SEPT3 de <i>Homo sapiens</i> e da SEPT2 de <i>Mus musculus</i>	128
Figura 31-	Projeção esterescópica da sobreposição do modelo final de modelagem molecular da septina-3 (azul) e da estrutura cristalográfica 3FTQ (laranja).	129
Figura 32-	Análises dos dados de SAXS coletados no LNLS com amostras de SEPT3GC	130
Figura 33-	Comparação entre os dados de modelagem molecular e de espalhamento de raios-X a baixos ângulos	131
Figura 34-	Confirmação da clonagem de SEPT5 e seus domínios em pET28a(+)	133
Figura 35-	Análise da expressão e purificação de SEPT5G e SEPT5GC.	135
Figura 36-	Eletroforese de SEPT5G em condição nativa	136
Figura 37-	Análise da expressão e purificação de SEPT5NG e SEPT5NGC	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Interações de septinas de mamíferos e possíveis funções	36
Tabela 2-	Perfil de expressão das septinas humanas e suas associações com doenças	38
Tabela 3-	Características dos vetores utilizados no sistema do duplo híbrido em leveduras	48
Tabela 4-	Combinação dos plasmídeos e seus respectivos meios de cultura seletivos	51
Tabela 5-	Composição dos meios de cultura seletivos para leveduras	52
Tabela 6-	Soluções utilizadas no procedimento de transformação de leveduras em grande escala	54
Tabela 7-	Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de SEPT3	59
Tabela 8-	Composição dos tampões A e B utilizados na purificação das proteínas recombinantes, SEPT3NGC e SEPT3GC	61
Tabela 9-	Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca aniônica	66
Tabela 10-	Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de SEPT5	70
Tabela 11-	Combinação dos oligonucleotídeos para amplificar SEPT5 e coordenadas dos aminoácidos que flanqueiam cada versão truncada de SEPT5	71
Tabela 12-	Alterações realizadas na purificação de SEPT5GC e SEPT5G	73
Tabela 13-	Perfil das triagens das bibliotecas de cDNAs com SEPT1, SEPT5 e SEPT7	81
Tabela 14-	Proteínas que interagiram com SEPT1 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras	82
Tabela 15-	Proteínas que interagiram com SEPT5 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras	83
Tabela 16-	Proteínas que interagiram com SEPT7 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras	84
Tabela 17-	Perfil das interações de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 com cada grupo de septinas humanas	86
Tabela 18-	Identificação de possíveis sítios de sumoilação em SEPT1 e SEPT5 por meio do programa SUMOplot™ Prediction	93
Tabela 19-	Características físico-químicas de SEPT3NGC e SEPT3GC recombinantes	101

Tabela 20-	Conteúdo de estrutura secundária de SEPT3GC sob a influência de diferentes pHs	110
Tabela 21-	Parâmetros termodinâmicos referente a titulação de SEPT3GC com GTPS obtidos por meio de calorimetria de titulação isotérmica	115
Tabela 22-	Parâmetros físico-químicos de SEPT5NGC, SEPT5NG, SEPT5GC e SEPT5G	133

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Domínio de ativação da transcrição
AD-presca	Domínio de ativação da transcrição fundido a uma proteína recuperada por meio do ensaio do duplo híbrido
ADGAL4	Domínio de ativação da transcrição GAL4
BD	Domínio de ligação ao DNA
BD-isca	Domínio de ligação ao DNA fusionado a uma proteína utilizada como isca no ensaio do duplo híbrido
BDLexA	Domínio de ligação ao DNA LexA
cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
GDP	Guanosina-5-difosfato
GTP	Guanosina-5-trifosfato
GTP γ S	Guanosina 5'-[γ -tio]trifosfato
HPLC	<i>High-performance liquid chromatograph</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
K _a	Constante de ligação
K _D	Constante de dissociação
LB	Meio de cultura Luria Bertani
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ORF	<i>Open reading frame</i> , janela aberta de leitura
PI(4,5)P2	fosfatidilinositol (4,5) bifosfato
PI(3, 4, 5)P3	fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
PtdInsPs	fosfato de fosfatidilinositol
PEG	polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
U	Unidades
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

3-AT

3-amino-1, 2, 4-triazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 SEPTINAS EM <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>: O ÍNICIO.....	27
1.2 SEPTINAS EM OUTROS ORGANISMOS.....	28
1.3 SEPTINAS HUMANAS.....	29
1.4 O COMPLEXO DAS SEPTINAS HUMANAS: SEPT2, SEPT6 E SEPT7.....	33
1.5 SEPTINAS DE MAMÍFEROS: PADRÃO DE INTERAÇÕES E FUNÇÕES.....	35
1.6 SEPTINAS 1, 3, 5 E 7 DE MAMÍFEROS.....	39
1.7 OBJETIVO.....	41
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1 DUPLO HÍBRIDO.....	45
2.1.1 Cepa de leveduras e vetores utilizados no ensaio do duplo híbrido.....	47
2.1.2 Bibliotecas utilizadas na varredura no duplo híbrido.....	48
2.1.3 Clonagem da sequência codificadora de SEPT5 no vetor pBTM116kan.....	48
2.1.4 Transformação de células de E. coli por choque térmico.....	50
2.1.5 Transformação de levedura em pequena escala.....	51
2.1.6 Ensaio da β -galactosidase em papel de filtro.....	52
2.1.7 Varredura das bibliotecas – Transformação de L40 em grande escala.....	53
2.1.8 Extração de DNA plasmidial de levedura.....	54
2.1.9 Extração de DNA plasmidial de bactéria.....	55
2.1.10 Sequenciamento de DNA e análise de sequências.....	56
2.1.11 Teste em leveduras para confirmação das possíveis interações selecionadas.....	57
2.1.12 Análise qualitativa da força das interações previamente selecionadas.....	57
2.2 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA SEPTINA 3 HUMANA.....	58
2.2.1 Linhagens de bactérias e plasmídeos utilizados para expressão das proteínas.....	58
2.2.2 Clonagem de SEPT3 e domínios em plasmídeo de expressão em bactéria.....	58
2.2.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes SEPT3NGC e SEPT3GC.....	60
2.2.4 Determinação da massa molecular aparente de SEPT3GC.....	62
2.2.5 Análises de bioinformática.....	63
2.2.6 Quantificação de SEPT3GC.....	63
2.2.7 Análises da estabilidade de SEPT3GC em função do pH.....	64
2.2.8 Espalhamento de Raios X a Baixo ângulo (SAXS).....	65
2.2.9 Análise do teor de nucleotídeo de SEPT3GC.....	65
2.2.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	66
2.2.11 Espectroscopia de fluorescência com mant-GDP e mant-GTP.....	67
2.2.12 Teste de atividade.....	67
2.2.13 Espectroscopia de fluorescência com Tioflavina T (ThT).....	68
2.2.14 Influência da temperatura na composição de estrutura secundária de SEPT3GC.....	68

2.2.15 Ensaio de cristalização.....	69
2.2.16 Digestão de SEPT3GC com trombina bovina.....	69
2.3 SEPT5 E DOMÍNIOS: TESTES DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO.....	70
2.3.1 Clonagem de SEPT5 e seus domínios em plasmídeo de expressão em bactéria.....	70
2.3.2 Expressão e purificação de SEPT5NGC, SEPT5GC, SEPT5NG e SEPT5G recombinantes.....	71
2.3.3 Alterações realizadas no procedimento de purificação de SEPT5G e SEPT5GC.....	72
<u>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</u>	77
3.1 DUPLO HÍBRIDO DE SEPT1, SEPT5 E SEPT7.....	77
3.1.1 Clonagem da sequência codificadora de SEPT5 fusionada ao domínio de ligação ao DNA LexA.....	77
3.1.2. Testes de autoativação do gene repórter LacZ por BD-SEPT1, BD-SEPT5 e BD-SEPT7 em L40.....	78
3.1.3 Varredura das bibliotecas.....	80
3.1.4 Interações entre septinas.....	85
3.1.5 Parceiros protéicos diferentes de septinas.....	89
3.1.6 Análise qualitativa da força das interações.....	96
3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA SEPTINA 3 HUMANA.....	99
3.2.1 Clonagem de SEPT3, SEPT5 e seus domínios em plasmídeo de expressão em bactéria.....	99
3.2.2 Expressão e purificação de SEPT3NGC e SEPT3GC.....	101
3.2.3 Determinação da massa molecular de SEPT3GC.....	106
3.2.4 Análises de dicroísmo circular de SEPT3GC.....	108
3.2.5 Análises do comportamento estrutural frente a diferentes pHs.....	109
3.2.6 Atividade GTPásica.....	111
3.2.7 Análise da propensão para forma fibras do tipo amilóide.....	122
3.2.8 Ensaio de cristalização.....	124
3.2.9 Modelagem Molecular e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	127
3.3 SEPT5 E VERSÕES TRUNCADAS: TESTES DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO.....	132
3.3.1 Clonagem de SEPT5 e seus domínios em vetor de expressão em bactéria.....	132
3.3.2 Expressão e purificação SEPT5G e SEPT5GC.....	134
3.3.3 SEPT5NGC e SEPT5NG: expressão e purificação.....	136
<u>4 CONCLUSÕES.....</u>	141
<u>REFERÊNCIAS.....</u>	145

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas em *Saccharomyces cerevisiae*: o início

Em 1971, Hartweel realizando varredura genética em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis a temperatura e que apresentavam deficiência em completar o ciclo celular, isolou quatro mutantes no processo de septação durante o brotamento da levedura, dando assim, início a história das septinas (1-3). Estes mutantes possuíam mutações nos genes *CDC3* ou *CDC10* ou *CDC11* ou *CDC12* e não apresentavam as estruturas filamentosas de 10 nm, presentes no septo que separa a célula-mãe da célula-filha, identificadas por Byers e Goetsch, através de microscopia eletrônica (4). Mais tarde, em células selvagens, os produtos destes genes foram identificados por imunofluorescência nas estruturas filamentosas de 10 nm, formando um colar de proteínas no septo e promovendo a separação das células-mãe e filha (Figura 1) (5-9).

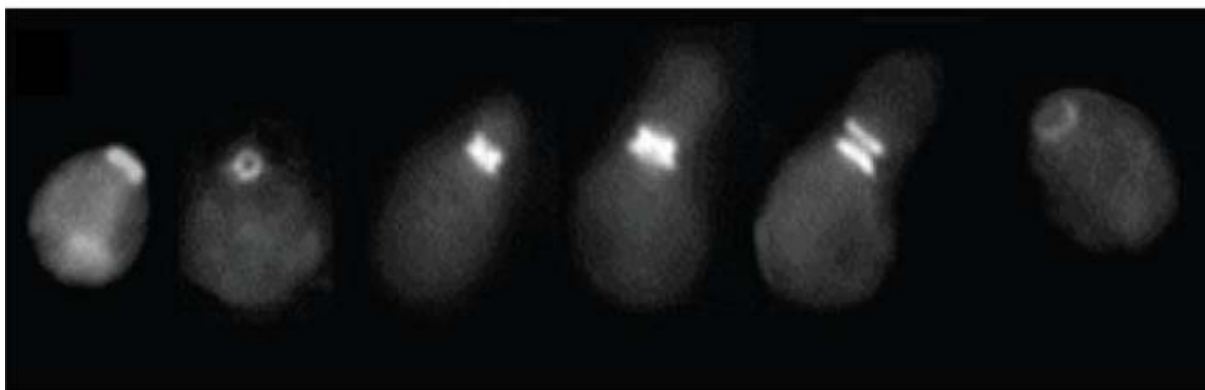


Figura 1 - Localização das septinas no ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, visualizado por microscopia de fluorescência. Nos estágios finais da etapa G1 as cinco septinas formam um anel que circula o sítio de brotamento indicando que a célula sofrerá divisão celular. Com a formação do broto o anel de septina organiza-se saindo da forma plana para uma forma cilíndrica (ou ampulheta) e finalmente se separa em dois anéis planos nas etapas finais do ciclo, ocorrendo a separação da célula-mãe e célula-filha. Figura adaptada da referência 9.

Experimentos de purificação das quatro proteínas nativas por cromatografia de imuno afinidade, sugerem que *CDC3*, *CDC10*, *CDC11* e *CDC12* são os principais componentes destes filamentos de 10 nm (10-12). O complexo destas septinas foi capaz de formar estruturas filamentosas *in vitro* que possuem massa molecular aparente consistente com a estequiometria de 2:2:2:2, e os filamentos possuem um diâmetro na faixa de 7 a 9 nm com

tamanho variando entre 32 – 100 nm. Além das quatro septinas já citadas uma quinta está presente neste complexo, Shs1/Sept7. A coexpressão de CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 em células de *Escherichia coli*, resultou na purificação de um complexo protéico que também foi capaz de se automontar em filamentos similares aos observados para as proteínas nativas. Este filamento correspondeu a um octâmero em que as proteínas encontravam-se dispostas da seguinte maneira CDC11–CDC12–CDC3–CDC10–CDC10–CDC3–CDC12–CDC11 (13-16). Em células de leveduras mitóticas, várias funções são atribuídas a CDC3, CDC10, CDC11, CDC12 e Shs1/Sept7 entre elas: o anel protéico por elas formado serviria como um andaime para muitas proteínas envolvidas na seleção do sítio de brotamento, na determinação e manutenção da polaridade celular, na deposição de quitina e na citocinese, além de formarem uma barreira que separa as proteínas de membrana da célula-mãe e da célula-filha (16, 17). *Saccharomyces* possui mais duas septinas Spr23 e Spr28, específicas de células meióticas, totalizando assim sete septinas (18, 19). O nome septina faz alusão à participação destas proteínas na citocinese e formação do septo em leveduras.

1.2 Septinas em outros organismos

As septinas pertencem a uma grande família de proteínas que conservam um domínio de ligação a nucleotídeo de guanina. Além de *S. cerevisiae*, estas proteínas já foram identificadas em vários eucariotos superiores, embora estejam ausentes em plantas.

Septinas foram identificadas em outros fungos como *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e *Aspergillus nidulans*, os quais possuem em comum com *S. cerevisiae* a formação do anel de septinas, mas apresentam grandes divergências na morfologia e na forma de reprodução. Estas divergências abrem um grande campo de aprendizado sobre as septinas em relação à função dessas proteínas no processo de fissão em *S. pombe*, na formação de clamidósporos em *C. albicans* e de conídios em *A. nidulans* (8, 20). *S. pombe* e *C. albicans* possuem 7 septinas como *S. cerevisiae*, já *A. nidulans* possui somente 5 septinas.

Em 1994, foi descoberta a primeira septina em eucariotos superiores por Neufeld e Rubin, quando identificaram em *Drosophila melanogaster* a proteína Pnut, que inicialmente localizava-se no córtex celular na intérfase e deslocava-se para o sulco de clivagem durante a anáfase (21). Eles observaram também, que mutações no gene *Pnut* bloqueavam a citocinese resultando no fenótipo de letalidade com células multinucleadas. Um complexo de septinas

purificada de embriões de *Drosophila* foi composto pelas septinas Pnut, SEP2 e SEP1, com a estequiometria de 1:1:1. Este complexo formou filamentos *in vitro* com diâmetro de 7 – 9 nm e tamanho variável com periodicidade de 26 nm; que ligava e hidrolisava GTP (22). A atividade GTPase foi caracterizada pela rápida conversão GTP-GDP, mas por baixa taxa de troca de nucleotídeos. Além das três septinas já citadas, *Drosophila* possui mais outras duas, SEP4 e SEP5.

Dos organismos cujo genoma foi completamente seqüenciado, o que possui o menor número de septinas é o nematóide *Caenorhabditis elegans*, com apenas duas septinas, UNC-59 e UNC-61. Mutantes de *C. elegans* mostraram que estes genes parecem ser dispensáveis para a citocinese durante a embriogênese, mas alterações na morfogênese pós-embriogênese foram observadas, como extrusão da gônada, defeitos na postura dos ovos, deformidades nos neurônios sensoriais e na cauda dos machos (23, 24). UNC-59 e UNC-61 representam um modelo com o mínimo de subunidades de septinas e cuja função é totalmente dependente de ambas as unidades, pois mutação em qualquer dos genes gera as alterações supracitadas. A coexpressão de UNC-59 e UNC61 resultou na purificação de uma mistura de heterodímeros e heterotetrâmeros (UNC-59–UNC-61–UNC-61–UNC-59), os quais possuem quantidades equimolares de cada septina e não apresentaram nucleotídeos ligados (25). O heterotetrâmero possui um arranjo linear com diâmetro similar ao observado para os filamentos de *S. cerevisiae*, mas estruturalmente não tão organizado. O filamento formado por UNC-59 e UNC-61 é apolar e os domínios carboxi-terminal das septinas estão estendidos lateralmente para fora do *core* tetramérico.

1.3 Septinas humanas

As septinas já foram identificadas em alguns mamíferos como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* (8). O número de septinas em humanos é 14, podendo ser maior devido à existência de *splicing* alternativo, que pode aumentar consideravelmente o número de isoformas expressas, algumas das quais são tecido-específica (26, 27). No caso da septina 9, há sete transcritos e seis isoformas. Houve um consenso para uniformizar a nomenclatura de septinas para mamíferos, de acordo com a *Human Genome Organization* (HUGO) e *Mouse Genomic Nomenclature* (MGN), pois até então era muito diversificada (28, 29). Algumas septinas chegaram a ter sete nomes alternativos. De acordo com a nova regra, o produto

gênico de cada septina humana recebeu a nomenclatura SEPT1 - SEPT14 e os respectivos genes receberam o mesmo nome, em itálico. Para as isoformas, adicionou-se a letra *v* e o número da isoforma.

As quatorze septinas humanas são caracterizadas por homologia de sequência e composição de domínios, possuem entre 330 a 500 resíduos de aminoácidos e são classificadas em quatro grupos quanto à similaridade de sequência primária nos domínios carboxi-terminal (Figura 2). SEPT14, a mais nova integrante desta família foi enquadrada no grupo II por meio de análises *in silico* de modelagem que prediz um domínio carboxi-terminal *coiled-coil* característico deste grupo, e pela alta similaridade seqüencial com SEPT10 (30).

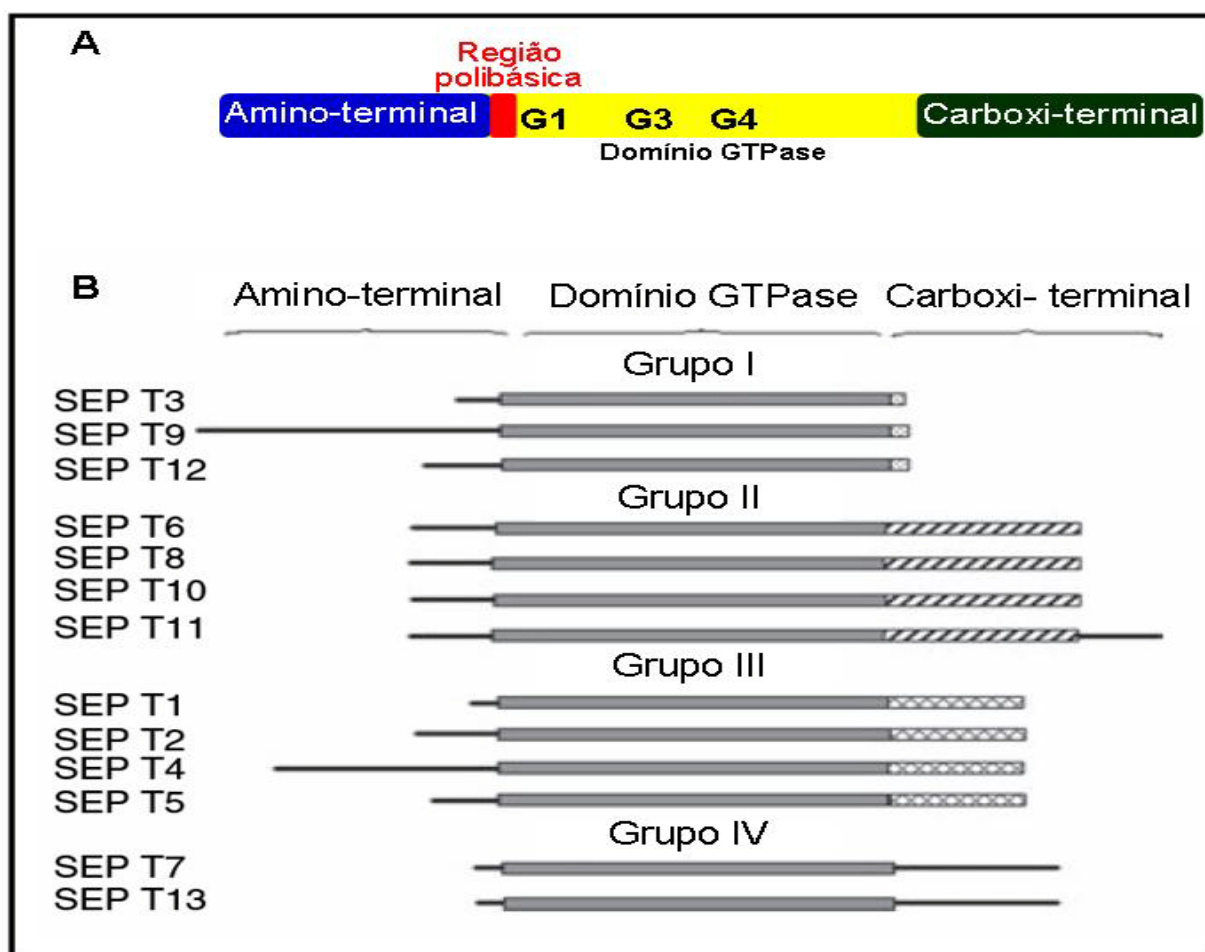


Figura 2 - Classificação e organização estrutural das septinas humanas. Em A, Organização dos domínios estruturais das septinas, em azul o domínio amino-terminal bastante variável entre as septinas; em amarelo o domínio GTPase que é o mais conservado entre as septinas e em verde o domínio carboxi-terminal que também é chamado de domínio *coiled-coil*. Destacado em vermelho está a região polibásica; G1, G2 e G3 são motivos presentes em GTPases. Em B, classificação das septinas em quatro grupos, baseados na similaridade da sequência primária no domínio carboxi-terminal. Figura adaptada da referência (31).

Todas as septinas compartilham de três domínios: um domínio central de ligação a GTP (G) e os domínios flanqueadores amino-terminal (N) e carboxi-terminal (C). Entre o domínio amino-terminal e o GTPase geralmente há uma pequena região polibásica que diferencia-se entre as septinas quanto a basicidade, sendo que no grupo II estão os representantes que apresentam menor basicidade. Acredita-se que este domínio pode conferir associação com membranas celulares visto que, a SEPT4 foi capaz de ligar-se especificamente aos fosfolípidos de membrana, fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato [PI(4,5)P₂] e fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato [PI(3, 4, 5)P₃], porém esta interação foi abolida quando a região polibásica foi mutada (32).

O domínio amino-terminal, assim como o domínio carboxi-terminal, são os que mais divergem quanto à composição de aminoácidos e tamanho. O primeiro varia de poucos resíduos de aminoácidos em SEPT1 e SEPT7 (10 e 16, respectivamente) chegando a quase 300 em SEPT4, SEPT8 e SEPT9 (33).

O domínio carboxi-terminal, na maioria das septinas, possui uma região predita de α -hélice *coiled-coil*, exceto nas septinas do grupo I, que possuem um curtíssimo domínio carboxi-terminal. Já as septinas 6, 8, 10 e 11 (grupo II) possuem um extenso *coiled-coil* em contraste com as septinas do grupo III (1, 2, 4 e 5) que possuem uma pequena região predita *coiled-coil*. Dentro dos grupos esta região possui considerável homologia, mas entre os grupos não (33, 34). O domínio *coiled-coil* pode estar envolvido na interação proteína-proteína como é observado para outras proteínas.

Entre os domínios das septinas, o domínio de ligação a GTP é o mais conservado com um mínimo de 75% de similaridade entre septinas da mesma espécie (35). Este domínio possui os motivos GTPase G1, G3 e G4 encontrados nos membros da superfamília das *P-loop* GTPases. Estes motivos nas septinas estão mais relacionados aos das Ras GTPases do que de outros membros da superfamília das GTPases. O motivo G1 definido pelo consenso GxxxxGK[S/T] é bem conservado sendo o consenso para as septinas **GESGLGKSTLINTLF** (em negrito e sublinhado os resíduos totalmente conservado). G1 forma um *loop* flexível que interage com o grupo fosfato dos nucleotídeos. O motivo G3 (DxxG) é moderadamente conservado sendo o consenso entre as septinas **DTPG**. Esta região liga a Mg²⁺ e pode interagir com os fosfatos β e γ do GTP. O motivo G4 (xKxD) que é completamente conservado em septinas e tem como equivalente **AKAD**, está relacionado com a especificidade de ligação a GTP (36-41). Os motivos G2 e G5 não estão presentes em septinas como ocorre com outras *P-loop* GTPases.

Um dos maiores mistérios sobre estas proteínas é o papel da ligação a nucleotídeo e hidrólise na função das septinas. A influência dos nucleotídeos de guanina para a ligação de SEPT4 com fosfolípidos de membrana foi analisada, e observou-se que esta associação é influenciada pelo nucleotídeo na qual a septina está ligada (32). Sumarizando os resultados obtidos por Zhang e colaboradores, a associação de SEPT4 à membrana foi favorecida pelo estado conformacional de SEPT4 ligada a GDP; e a hidrólise de GTP resultou em acentuada dissociação da membrana. Estes resultados indicam que a ligação ao nucleotídeo pode modular a associação de septina à membrana, implicando que esta possa ser uma relação funcional.

Apesar dos poucos trabalhos que exploram a importância do nucleotídeo na função da septina, um possível modelo é observado nas interações de SEPT2 com o transportador de glutamato em astrócitos, GLAST, e de SEPT5 com syntaxina (proteína SNARE). Neste modelo a ligação ou hidrólise de GTP pode regular interações de septinas com outras proteínas e desta forma regular a função do parceiro protéico (42). SEPT2 interage com GLAST de uma forma dependente de GDP e a expressão de um mutante de SEPT2 incapaz de ligar a nucleotídeo reduziu a atividade de absorção de glutamato de GLAST, sugerindo que SEPT2 pode ser um regulador da absorção de glutamato por meio da interação com GLAST. Beites e colaboradores buscando identificar novas proteínas que interagissem com vesículas, imunoprecipitaram SEPT5 com syntaxina. Na análise do fenótipo para secreção em células HIT-T15 (sistema modelo de regulação da secreção) transfectadas com SEPT5 ou com um mutante ineficiente na ligação a nucleotídeo observaram a inibição e o aumento na secreção, respectivamente. Estes dados sugerem que o estado conformacional de SEPT5 (ligado ou não ligado a nucleotídeo) pode regular a dinâmica de vesículas através da ligação com syntaxina (43). Outro modelo para o papel da ligação a nucleotídeo é a regulação da montagem e desmontagem de filamentos como ocorre com a tubulina, visto que alguns dos complexos de septinas purificados até o momento estavam saturados com GDP e GTP, com uma estequiometria de um nucleotídeo por polipeptídeo. Por exemplo, nos complexos de *Drosophyla* (Pnut-SEP2-SEP1) e das septinas humanas (SEPT2-SEPT6-SEPT7) a relação foi de 2:1 para GDP:GTP (22, 44).

1.4 O complexo das septinas humanas: SEPT2, SEPT6 e SEPT7

O complexo de septina humana que foi melhor caracterizado é composto pelas septinas 2, 6 e 7, que inicialmente foi isolado de células NIH3T3 pela interação com Borg3. Mais tarde foi reconstituído com proteínas recombinantes e a estrutura cristalográfica resolvida a uma resolução de 4,0 Å (Figura 3A) (45, 46).

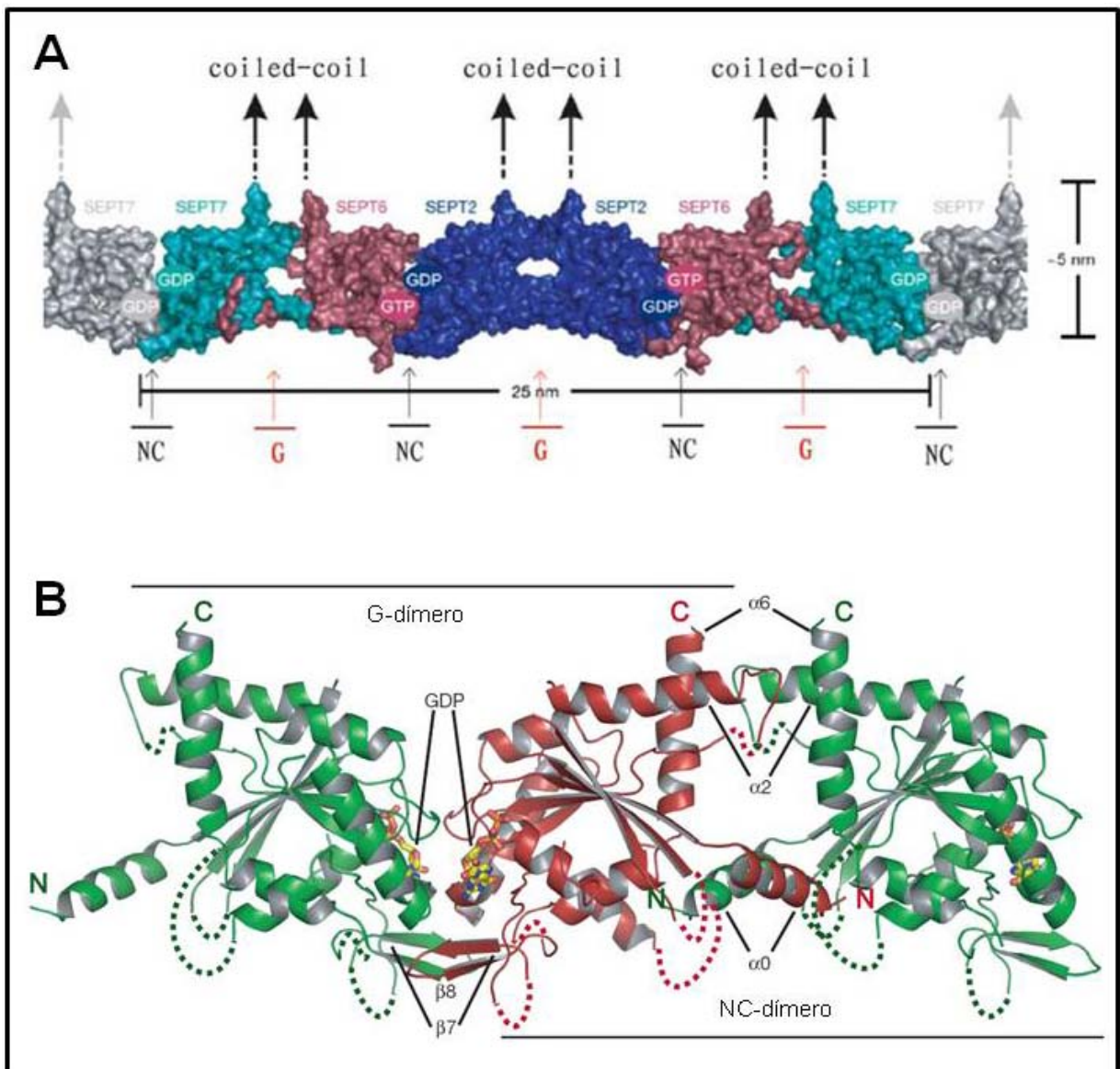


Figura 3 – Estrutura do complexo formado pelas septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7 e de três monômeros de SEPT2G. Em A, as interfaces de interação entre as proteínas estão indicadas por NC e G. A septina 7 em cinza nas extremidades indica as possibilidades de extensão do filamento com a adição de outros hexâmeros. As setas pretas na parte superior da figura indicam as posições e orientações dos domínios *coiled-coil*. Os nucleotídeos associados a cada molécula também estão representados. Em B, estrutura do trímero do domínio GTPase de SEPT2 (SEPT2G) com duas interfaces de interação, G-dímero e NC-dímero. Figura adaptada das referências (46, 47).

O complexo hexamérico linear formado a altas concentrações salinas apresentou a seguinte disposição: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. A estrutura revelou que a formação do filamento envolve interações conservadas entre sítios de ligação a nucleotídeo (interface G) e suas extensões N e C-terminais (interface NC). As interações entre SEPT2-SEPT2 e entre SEPT7-SEPT6 favorecem a interface NC ao contrário do observado na estrutura para a interação entre SEPT6-SEPT2 que ocorre via interface G. Em ambas as extremidades do hexâmero há uma subunidade de SEPT7, com a interface G disponível para associação com outra SEPT7 de outro hexâmero, promovendo assim o crescimento do filamento. Outro ponto interessante a ser observado é que as septinas 2 e 7 estão associadas à GDP e SEPT6 à GTP sugerindo que a natureza do nucleotídeo pode influenciar na formação do oligômero e do filamento. Na estrutura cristalográfica observa-se que nas interações heterotípicas (SEPT6-SEPT2, SEPT7-SEPT6) ambos os nucleotídeos estão presentes. Contudo, na interação homotípica (SEPT2-SEPT2) tanto quanto na interação das SEPT7 terminais, responsável pela polimerização do hexâmero dentro do filamento, encontra-se apenas GDP ligado. Outras evidências corroboram com a hipótese de que o tipo de nucleotídeo tem influência na formação do filamento. As interações entre SEPT2(GDP) e SEPT6(GTP), por exemplo, foram mais resistentes à alta concentração salina do que SEPT7(GDP)-SEPT7(GDP) a qual é requerida para a polimerização. Quanto a natureza do nucleotídeo ligado, pode-se fazer algumas interpretações, SEPT2 e SEPT7 ligam-se preferencialmente a GDP e SEPT6 é seletiva para GTP, ou as três septinas ligam a GTP, mas somente SEPT2 e SEPT7 são capazes de hidrolisar, enquanto em SEPT6 a atividade GTPásica é ineficiente.

No mesmo trabalho, Sirajjuddin e colaboradores compararam as interfaces de interação da septina 2 em solução, com as interfaces de interação de SEPT2 no complexo hexamérico (Figura 3A) e no trímero de domínios GTPase de SEPT2 (Figura 3B). As análises por cromatografia de exclusão molecular analítica de mutantes na interface NC de SEPT2 mostrou a eluição de SEPT2 como dímero e monômero. Entretanto, para mutantes na interface G, houve a eluição apenas de monômeros, indicando que em solução a interface G é preferencial na formação do dímero, diferente do que foi observado na estrutura cristalográfica hexamérica, na qual a interface NC foi favorecida (Figura 3A). Comparando estes resultados com a estrutura cristalográfica apenas do domínio GTPase de SEPT2, observa-se que não há preferência por nenhuma interface (Figura 3B). Ambas estão presentes nesta estrutura, mostrando que SEPT2 pode formar homofilamentos através de associações via as interfaces NC e G.

Estes resultados conduzem ao conceito de promiscuidade existente entre os estudiosos de septinas, em que septinas obedecem a um padrão de interação desde que seus parceiros protéicos estejam presentes, caso contrário interações promíscuas podem ocorrer (48, 49). Nas regras estabelecidas por Kinoshita para a formação de heterofilamentos, baseada no complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, as septinas deste complexo poderiam ser substituídas por outras pertencentes ao mesmo grupo (48). Desta forma a septina 2 poderia ser substituída pelas septinas 1, 4 e 5, já a septina 6 aceitaria substituições pelas septinas 8, 10 e 11, pertencentes ao seu grupo II. A septina 7 foi considerada uma septina chave, insubstituível, até a identificação da septina 13 que, por similaridade de sequência, foi classificada no grupo IV. O complexo das septinas 2, 6 e 7 deixava claro que as septinas preferem interagir com septinas de outros grupos para a montagem de heterofilamentos. Mas as observações em relação a este complexo não elucidavam como o grupo I, das septinas 3, 9 e 12, faria parte dos heterofilamentos. Porém a complexidade do mundo das septinas conduziu a purificação dos complexos SEPT3-SEPT5-SEPT7 e SEPT7-SEPT9-SEPT11 de cérebro e fibroblastos de ratos (50-52), que obedecem a regra de Kinoshita no que diz a respeito a interação entre septinas de grupo diferentes, mas observou-se que necessariamente estas interações não estão restritas as septinas dos grupos II, III e IV.

1.5 Septinas de mamíferos: padrão de interações e funções

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de entender o papel destas proteínas nas células e observou-se que septinas recrutam várias proteínas para assim, poderem desempenhar suas funções. Vários complexos protéicos contendo septinas já foram identificados, relacionando essas proteínas com processos fundamentais para o funcionamento da célula (Tabela 1). Por exemplo, as SEPT2 e SEPT7 podem formar um “andaime” mitótico para CENP-E (proteína E do centrômero) e outras proteínas efetoras para coordenar a citocinese com a congregação e segregação dos cromossomos (53, 54). Já SEPT2 e SEPT8 são associadas com a liberação de neurotransmissores devido suas interações com o transportador de glutamato (GLAST) e com a proteína de vesículas sinápticas, sinaptobrevina 2 (Vamp2), respectivamente (42, 55). As septinas 2, 4, 5 e 7 estão envolvidas na dinâmica de membranas e tráfego de vesículas através de interações com o complexo sec6/8, que regula o recrutamento específico de vesículas para a membrana, e com proteínas syntaxinas que fazem

parte do complexo SNARE, que é essencial para a fusão de vesículas com a membrana plasmática (43, 56-58).

Tabela 1 - Interações de septinas de mamíferos e possíveis funções. Tabela adaptada da referência (59)

Complexos	Possíveis funções	Domínio da Septina envolvido
SEPT1/Aurora B	Segregação de cromossomos Citocinese	Não determinado
SEPT2/F-actina	Citocinese	Ligação a GTP
SEPT2/5/6/anilina	Citocinese	Não determinado
SEPT2/6/7	Formação de filamento	N e C terminal
SEPT2/GLAST	Liberação de neurotransmissor	Não determinado
SEPT2/miosina II	Citocinese	Não determinado
SEPT2/6/CENP-E	Segregação de cromossomo	Não determinado
SEPT2/6/7MAP4	Estabilidade do microtúbulo	Não determinado
SEPT2/4/7Sec6/8	Tráfego de vesícula	Não determinado
SEPT3/5/7	Biologia dos neurônios	Não determinado
SEPT4/5/8	Exocitose/endereçamento de vesículas	N e C terminal
SEPT4/8	Biologia das plaquetas	Não determinado
SEPT5/Parkin	Patogênese de Parkinson	Não determinado
SEPT5/11	Exocitose em células endotelial	Ligação a GTP e C-terminal
SEPT5/complexo SNARE	Exocitose/ endereçamento de vesículas	Ligação a GTP e C-terminal
SEPT6/12	Formação de filamento	Não determinado
SEPT7/9/11/actina	Formação de filamento	N-terminal
SEPT7/CENP-E	Segregação de cromossomo	Não determinado
SEPT8/Vamp2	Formação do complexo SNARE/ Liberação de neurotransmissor	Não determinado
SEPT9/actina	<i>Stress fiber</i>	Não determinado
SEPT9/AS-RhoGEF/ actina	Sinalização Rho	N-terminal
SEPT9/HIF-1	Proliferação celular/angiogênese /câncer de próstata	Ligação a GTP e N-terminal
SEPT9/JNK	Proliferação celular/ câncer de mama	Ligação a GTP
SEPT9/tubulina	Formação de filamento/ microtúbulos /formação do fuso	Ligação a GTP
SEPT11/12	Formação de filamento	Não determinado
SEPT14/SEPT1- 7/9/11-12	Biologia testicular	Não determinado

Atualmente há evidências para duas funções das septinas na exocitose, a primeira como potencial regulador de interações de proteínas SNARE, como é observado pela ligação de SEPT5 a syntaxina 1, que pode determinar a disponibilidade de syntaxina para formação do complexo SNARE e conseqüentemente para a fusão da membrana. E a segunda como proteína alvo que interage com o complexo exocítico durante o transporte de vesículas para sítios de fusão de membrana na membrana plasmática. As septinas também estão envolvidas na dinâmica dos cromossomos como é observado pela interação de SEPT2 e SEPT9 com filamentos de actina (60-62). SEPT4, SEPT5 e SEPT8 foram identificadas próximas a grânulos α de plaquetas sugerindo que estas proteínas estejam envolvidas na biologia das plaquetas (63). Interessantemente, podemos dizer que um elo foi estabelecido entre a função de septinas na divisão celular e na morte celular (apoptose) quando ARTS, um transcrito alternativo de SEPT4 que se localiza na mitocôndria, foi translocado para o núcleo no começo da apoptose, quando exposto ao agente apoptótico TGF- β , sugerindo que SEPT4 tem algum envolvimento com a via de ativação da morte celular programada por TGF- β (64, 65).

Além das funções já citadas para as septinas é importante mencionar que estas proteínas parecem estar relacionadas com várias doenças humanas, sendo as principais, cânceres e desordens neurológicas (Tabela 2) (59). Algumas septinas são associadas com neuropatologias, como é o caso de SEPT5 que interage com Parkin, uma proteína patogênica em mal de Parkinson (66) e das septinas, SEPT1, SEPT2 e SEPT4 que são acumuladas dentro de estruturas citoplasmáticas patológicas comuns em doenças humanas neurodegenerativas, tais como, neurofibrilas em mal de Alzheimer e corpos de inclusão no mal de Parkinson (67, 68). Em muitos casos a associação de septinas com neoplasias está relacionada com alterações no padrão de expressão destas proteínas (69-73).

Tabela 2 - Perfil de expressão das septinas humanas e suas associações com doenças. Tabela adaptada da referência (59)

Septina Humana	Perfil de expressão	Doenças
SEPT1	Cérebro, linfócitos e outros	Doença de Alzheimer, leucemia e linfoma
SEPT2	Cérebro, linfócitos e outros	Cânceres de cérebro, fígado e renal, Doença de Alzheimer, síndrome de Von Hippel-Lindau e infecções de <i>Listeria</i> .
SEPT3	Específica de cérebro	Câncer de cérebro e Doença de Alzheimer
SEPT4	Cérebro, testículo e olhos	Doença de Alzheimer, cânceres de pele, urogenital e de colon; leucemia e infertilidade masculina
SEPT5	Cérebro, olhos e plaquetas	Leucemia, mal de Parkinson, esquizofrenia e câncer pancreático
SEPT6	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, leucemia e hepatite C
SEPT7	Cérebro e testículo	Cânceres do sistema nervoso e infertilidade masculina
SEPT8	Cérebro, retina e outros	Degeneração da retina
SEPT9	Expressa ubiquamente	Amiotrofia neurálgica hereditária, leucemia, cânceres de mama, ovário, coloretal, cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i> .
SEPT10	Expressa ubiquamente	-----
SEPT11	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, desordem bipolar, leucemia e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i>
SEPT12	Linfócitos e testículos	Infertilidade masculina
SEPT13	Expressa ubiquamente	-----
SEPT14	Testículos	-----

1.6 Septinas 1, 3, 5 e 7 de mamíferos

A septina 1 (SEPT1) também conhecida como Diff6 ou Pnut13 é classificada no grupo III, juntamente com as septinas 2, 4 e 5, o qual é caracterizado por uma curta região predita *coiled-coil* no domínio carboxi-terminal. SEPT1 foi identificada em neurofibrilas específicas de mal de Alzheimer permitindo a associação desta proteína com a neuropatologia (67). A análise do padrão de expressão desta proteína em 33 tecidos diferentes mostrou que a mesma apresenta um perfil de expressão bastante diversificado, pois foi identificada na maioria dos tecidos, sendo a expressão mais acentuada em linfócitos (74). SEPT1 é superexpressa em linhagens de células derivadas de células escamosas de carcinoma oral (OSCCs), sugerindo que esta proteína contribua para a progressão e/ou proliferação do câncer oral, podendo ser um potencial marcador de câncer e um alvo terapêutico em células OSCCs (75). A septina 1 é fosforilada em vários sítios pela quinase Aurora-B, que é uma importante serina/treonina quinase requerida para a segregação de cromossomo e citocinese (76). SEPT1 como substrato de Aurora B pode estar atuando na regulação da citocinese.

SEPT5, também conhecida como CDCrel-1, e diferentemente de SEPT1, é expressa quase que exclusivamente no cérebro, podendo ser encontrada também em plaquetas e tecidos oculares (59, 74). Foi proposto por Beites e colaboradores uma função inibitória na secreção para SEPT5, quando caracterizavam células HIT-T15 transfectadas com SEPT5 (43, 77). Neste trabalho a transfecção de células HIT-T15 com SEPT5 inibiu a secreção do hormônio de crescimento humano (hGH). Entretanto, o fenótipo foi oposto quando as células foram transfectadas com um mutante de SEPT5, ineficiente na ligação a GTP, ocorrendo então a potencialização da secreção do hormônio. Esta proposta de que SEPT5 pode regular a liberação de neurotransmissores é fundamentada também pela capacidade de SEPT5 interagir diretamente com várias isoformas de syntaxina, proteínas que fazem parte do complexo SNARE que atua no mecanismo de regulação de fusão de membranas (56, 78). Outro trabalho tem reforçado o papel de SEPT5 em eventos de secreção, agora na regulação da resposta de secreção em plaquetas. Dent e colaboradores analisando o fenótipo de plaquetas de camundongos deficientes na expressão de SEPT5 (SEPT5^{nulla}) observaram que elas agregaram e liberaram mais serotoninas do que plaquetas normais. Várias evidências sustentam a importância de SEPT5 nos processos de secreção em plaquetas como, a identificação de SEPT5 em plaquetas; a demonstração da interação de SEPT5 com syntaxina 4, a imunolocalização de SEPT5 ao redor de áreas membranosas de α -granulos; a fosforilação de

SEPT5 em resposta para agonistas de plaquetas e a caracterização de camundongos com nocaute em *SEPT5* onde ocorreu um aumento a resposta de secreção em plaquetas (79). Estes trabalhos sugerem que SEPT5 é um componente regulatório em exocitose, entretanto a função executada por ela neste contexto, ainda não foi elucidada. A SEPT5 tem sido relacionada à neuropatologia baseado em estudo que apresenta SEPT5 como substrato de Parkin, uma ubiquitina ligase na qual mutações estão ligadas ao mal de Parkinson hereditário (66). Parkin ubiquitina SEPT5 para a degradação, mas ainda não se sabe se deficiências na degradação de SEPT5 dependente de ubiquitina estão relacionadas ao mal de Parkinson (80). Outra patologia na qual SEPT5 pode ter alguma função é a leucemia mielóide aguda, devido às observações da presença de um transcrito de fusão MLL-SEPT5 em células leucêmicas de um paciente adulto, e pela alta taxa de expressão de SEPT5 em várias linhagens de células de leucemia mielóide aguda quando comparadas com células de leucemia linfoblástica aguda (81).

O grupo I das septinas, do qual faz parte SEPT3, é caracterizado pela ausência de domínios *coiled-coil*. A expressão de SEPT3 é restrita a tecidos cerebrais em humanos e camundongos (74, 82). Seu nível de expressão em cérebros de camundongos foi dependente do estágio de desenvolvimento do embrião, sendo que em estágios iniciais de desenvolvimento a expressão não foi detectada, já em estágios avançados a expressão foi baixa e aumentou após o nascimento. SEPT3 mostrou-se especificamente enriquecida em sinaptosomos como a dinamina I, quando comparado com o cérebro inteiro (83). A dinamina I é uma grande GTPase, assim chamada para diferenciá-la das GTPase tipo Ras, que participam da formação de vesículas tanto na membrana celular como no complexo de golgi, e como as proteínas SNAREs são essenciais no tráfego de vesículas (84). A fosforilação de SEPT3 na serina 91 (Ser-91) por PKG (proteína quinase dependente de cGMP) em terminais nervosos parece contribuir para a regulação de sua localização subcelular em neurônios, pois SEPT3 foi localizada em extratos de membranas periféricas, enquanto SEPT3 fosforilada só foi detectada no citosol de terminais nervosos (85). As septinas humanas 2 e 3 foram expressas em vários tumores cerebrais e linhagens de células tumorais sugerindo que estas proteínas são potenciais oncogenes (70). Além da relação com cânceres SEPT3 também tem sido associada com mal de Alzheimer por Takenashi e colaboradores em análises de polimorfismo de *SEPT3* em cérebros humano fetal e adulto; sadios e acometidos do mal de Alzheimer (86).

Os complexos de septinas de mamíferos SEPT2-SEPT6-SEPT7, SEPT3-SEPT5-SEPT7, SEPT7-SEPT9-SEP11 e SEPT5-SEPT7-SEPT11 confirmam a importância da SEPT7 na formação de hetero-oligômeros de septina, visto a constante presença desta proteína (46,

51, 52, 87). Estes complexos deixam em aberto se a septina 7 poderia ser substituída pela sua companheira de grupo, a SEPT13, na formação dos oligômeros. A SEPT7 estruturalmente possui um domínio amino-terminal bastante pequeno sendo quase que exclusivamente representada pelos domínios GTPase e carboxi-terminal (Figura 2). A SEPT7 juntamente com a SEPT4 foi relacionada com a espermatogênese, podendo ser usada como marcador de astenospermia (mobilidade reduzida do espermatozoide) em homens, visto que em indivíduos saudáveis foi identificada a expressão destas proteínas na cauda dos espermatozoides estando ausente em pacientes inférteis (88).

1.7 Objetivo

Com o objetivo geral de contribuir com informações bioquímicas, biofísicas e funcionais de septinas humanas, este trabalho objetivou caracterizar a ligação e hidrólise de GTP das septinas 3 e 5 e buscar parceiros protéicos funcionais para as septinas 1, 5 e 7.

De acordo com o objetivo geral do trabalho os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- ✓ Estabelecer um sistema de expressão e purificação para as septinas 3 e 5;
- ✓ Avaliar estruturalmente a septina 3 utilizando técnicas de difração de raios X a Baixo ângulo e Espalhamento de Raios X a Baixo ângulo;
- ✓ Caracterizar a ligação a nucleotídeo de septina 3 por experimentos de calorimetria de titulação isotérmica e espectroscopia de fluorescência;
- ✓ Avaliar a atividade GTPásica da septina 3;
- ✓ Investigar a propensão da septina 3 à formar fibras do tipo amilóide;
- ✓ Buscar parceiros protéicos de interação com as septinas humanas 1, 5 e 7 por meio de ensaios do duplo híbrido em duas bibliotecas de cDNAs humano.

MATERIAIS E MÉTODOS



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Duplo Híbrido

Na Figura 4 é mostrado um diagrama de fluxo das etapas de uma varredura de biblioteca no ensaio do duplo híbrido, baseado no sistema Gal4 com os genes repórteres *lacZ* e *HIS3*. O método se inicia com a clonagem da sequência codificadora da proteína “isca” fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) em um plasmídeo de expressão em leveduras. Após a confirmação por sequenciamento que a isca está na mesma fase aberta de leitura do domínio de ligação ao DNA, procede-se a transformação em cepa de levedura adequada para o ensaio do duplo híbrido. Neste momento torna-se necessária a realização dos testes de autoativação do sistema, analisando a expressão dos genes repórteres. Se a atividade destes genes repórteres for observada mesmo em condições de alta estrigência, descarta-se esta construção de DNA e iniciam-se outras clonagens usando construções parciais da isca, a fim de obter um domínio que não autoative o sistema.

Caso a proteína isca não autoative o sistema, então a construção poderá ser usada como isca na varredura da biblioteca de cDNA na qual as sequências que codificam proteínas encontram-se fundidas ao domínio de ativação da transcrição (AD). Tal procedimento é realizado com a transformação da levedura expressando BD-isca com a biblioteca de cDNA (AD-presas) em meio seletivo. Os clones que proliferarem serão submetidos aos primeiros testes para eliminação de falso-positivos e mais uma vez, os ensaios para analisar atividade dos genes repórteres é realizado. Em seguida isola-se o plasmídeo, AD-presas, dos clones em que a atividade dos genes *lacZ* e *HIS3* forem detectadas. Os plasmídeos AD-presas e BD-isca serão então utilizados para cotransformação de levedura com o propósito de mais uma vez submeter os clones obtidos aos testes de expressão dos genes repórteres e desta forma eliminar interações falso-positivas. Após estas exaustivas etapas para eliminação dos falso-positivos, as interações que foram positivas no ensaio do duplo híbrido deverão agora ser confirmadas por técnicas *in vitro*, como *pull-down* ou coimunoprecipitação.

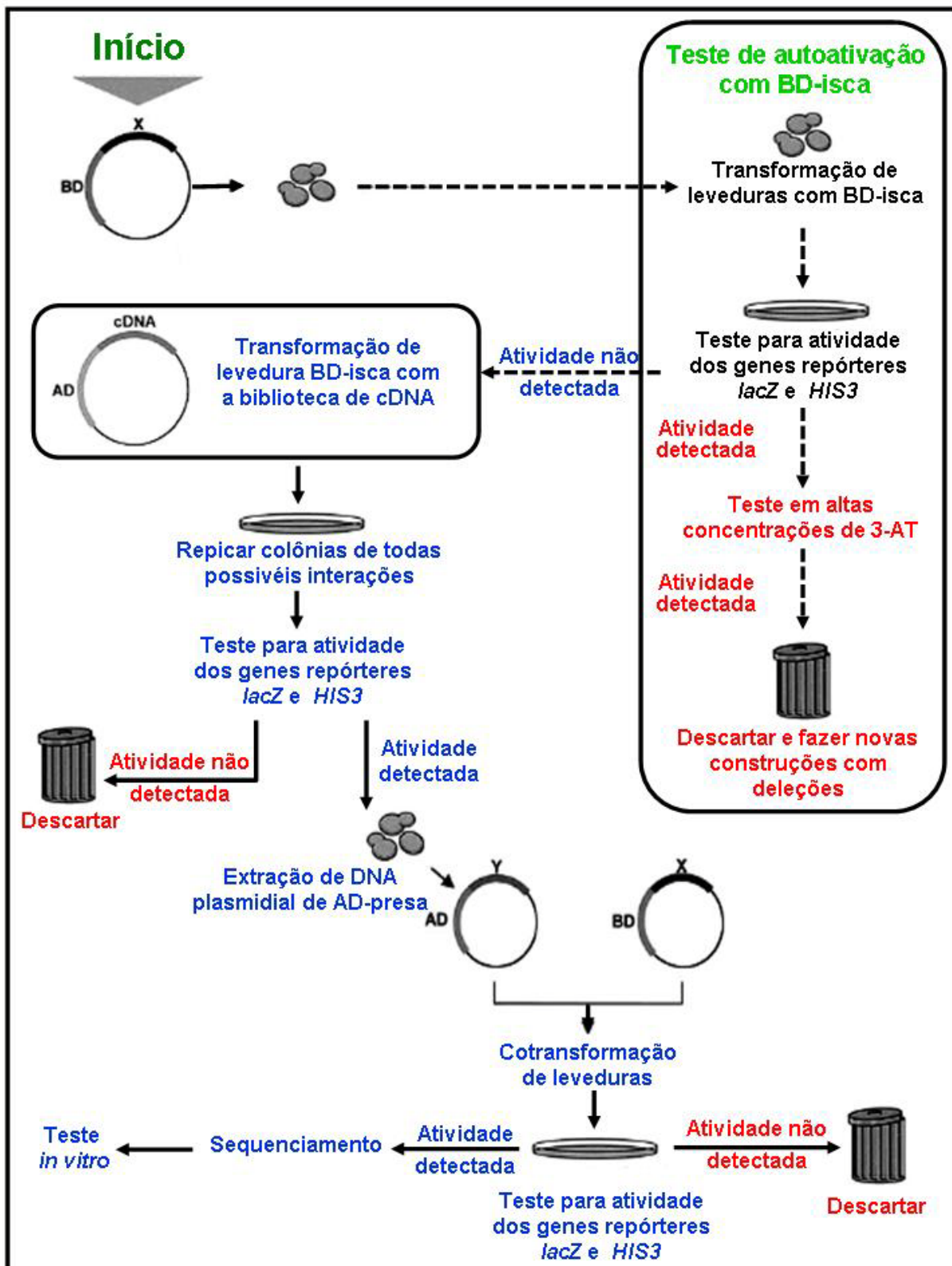


Figura 4 - Fluxograma das etapas do ensaio do duplo híbrido em leveduras baseado no sistema Gal4 com os genes repórteres *lacZ* e *HIS3*. Todas as etapas estão representadas desde a obtenção do plasmídeo contendo a isca (BD-x), seguida pelos ensaios de autoativação, varredura da biblioteca de cDNA (AD-cDNA) até a eliminação dos falso-positivos resultando na identificação da proteína presa (AD-y) e ensaios *in vitro* para confirmação das interações. Figura adaptada da referência (89)

Inicialmente foi proposta a realização do duplo híbrido com a SEPT5 como isca utilizando-se as bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano e de leucócitos (Clontech). Este seria parte de um projeto em colaboração, proposto pelo Dr Jörg Kobarg (LNLS), que tinha como objetivo montar um “interactoma” das septinas 1 a 10, com a participação de alunos dos Grupos de Biofísica Molecular do IFSC e do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). Assim, foi uma excelente oportunidade de aprender todas as etapas da técnica sob a orientação do Dr. Jörg, e com o auxílio direto do estudante de doutorado Marcel Nakahira, no LNLS, em Campinas. Durante a execução do projeto, porém tornou-se necessária a realização do duplo híbrido com as SEPT1 e SEPT7 para o bom andamento do projeto de interactoma e estas foram incorporadas a este trabalho.

2.1.1. Cepa de leveduras e vetores utilizados no ensaio do duplo híbrido

A cepa de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada neste trabalho foi a L40 (trp1-901, his3_200, leu2-3, ade2 LYS2:::(lexAop)4-HIS3 URA3:::(lexAop)8-lac), que possui os marcadores genéticos *trp1*, *leu2*, *ade2*. L40 possui uma cópia cromossomal dos genes repórteres *HIS3* e *LacZ*, cuja a atividade é controlada pelo promotor LexA.

O plasmídeo pBTM116kan, construído no laboratório do Dr Nilson Zanchin (LNLS), corresponde ao plasmídeo pBTM116 (90), no qual a marca de seleção em bactéria que confere resistência a ampicilina foi substituída por resistência a canamicina. Este vetor possui o gene *TRP1* que é o marcador nutricional para seleção em leveduras Trp^- e o domínio de ligação ao DNA LexA (BDLexA). O pBTM116kan foi utilizado para a clonagem das sequências codificadoras das “iscas” (SEPT1, SEPT5 e SEPT7) fusionadas ao domínio de ligação ao DNA (BD-isca), sendo a expressão das BD-iscas orientada pelo promotor truncado ADH1.

O vetor pGAD424 (Clontech) foi utilizado como controle para cotransformações com BD-isca em L40. O pGAD424 possui o domínio de ativação da transcrição GAL4 (ADGAL4) e, como o pBTM116, possui o promotor truncado ADH1. Em bactérias confere resistência a ampicilina, e auxotrofia a leucina para leveduras Leu^- .

O plasmídeo pACT2, corresponde ao vetor sobre o qual as bibliotecas comerciais de cDNA (Clontech) foram construídas. Da mesma forma que o pGAD424, possui o ADGAL4 e as mesmas marcas seletivas (Tabela 3).

Finalizando, o plasmídeo pTZ57R/T (Fermentas) foi utilizado para clonagem dos produtos de PCR (reação em cadeia da polimerase) correspondentes as sequências codificadoras das iscas, a fim de propagá-los em bactéria. Este plasmídeo confere resistência a ampicilina para bactérias.

Tabela 3 - Características dos vetores utilizados no sistema do duplo híbrido em leveduras

Vetor	Domínio	Promotor	Marcar de seleção em levedura	Marca de seleção em bactéria
pBTM116kan	BDLexA	<i>ADHI</i> [*]	<i>TRP1</i>	<i>kan</i> ^R
pGAD424	ADGAL4	<i>ADHI</i> [*]	<i>LEU2</i>	<i>Amp</i> ^R
pACT2	ADGAL4	<i>ADHI</i> [*]	<i>LEU2</i>	<i>Amp</i> ^R

^{*}promotor ADHI truncado

2.1.2 Bibliotecas utilizadas na varredura no duplo híbrido

As bibliotecas de cDNA de cérebro fetal e de leucócitos humano foram adquiridas da empresa *Clontech laboratories*. Estas bibliotecas possuem título maior ou igual a 10^8 cfu e 3×10^6 clones independentes contendo cDNAs com tamanhos de 500 a 4000 pares de bases (pb). As bibliotecas foram construídas no plasmídeo pACT2 utilizando os sítios para as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI*. A Biblioteca de cérebro fetal humano teve como fonte de RNA mensageiro (mRNA) um conjunto de 9 cérebros de fetos caucasianos que foram abortados espontaneamente com idades entre 20 a 25 semanas. Já a biblioteca de cDNA de leucócitos, os mRNAs foram obtidos de leucócitos de sangue periférico de um grupo de 550 adultos caucasianos com idades entre 18 a 40 anos, sendo as amostras negativas para HIV-I, HIV-II, hepatite B e sífilis.

2.1.3 Clonagem da sequência codificadora de SEPT5 no vetor pBTM116kan

Neste tópico segue uma descrição detalhada do procedimento de clonagem da sequência codificadora de SEPT5 em pBTM116kan, o qual foi similar para as clonagens de SEPT7 e SEPT1, que foram realizadas doutorandos Luis Fernando Reyes e Marcel Nakahira,

respectivamente. As sequências codificadoras utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos estão depositadas no banco de dados público, GenBank, sob os números de acesso NM_052838 (SEPT1), NM_002688 (SEPT5) e NM_001788 (SEPT7).

Com a finalidade de expressar em leveduras SEPT5 fusionada ao BDLexA, a fim de ser utilizado como isca no ensaio do duplo híbrido, foram sintetizados dois oligonucleotídeos SEPT5-Fow-Y2H-EcoRI (GAATTCATGAGCACAGGCCTGCGG) coordenadas 1 a 18, que gera um sítio para a enzima de restrição *EcoRI* (sublinhado) e o oligonucleotídeo SEPT5-Rev-Y2H-SalI (GTCGACGTCACTGGTCCTGCATCTGC) coordenadas 1092 a 1110 que cria um sítio para enzima de restrição *SalI* (sublinhado) adjacente ao códon de parada. Inicialmente, amplificou-se SEPT5 utilizando-se 20 ng do plasmídeo recombinante pET28-SEPT5NGC (NGC- corresponde a sequência inteira) como molde para PCR, juntamente com 0,2 µM dos oligonucleotídeos flanqueadores, 0,2 mM de dNTPs, 0,3 unidade de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de 10X *High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂* (Fermentas) e água para completar o volume para 50 µL. A reação foi realizada no termociclador (*Mastercycler[®] gradient Eppendorf*) sob as seguintes condições: 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C) finalizando com 20 minutos a 72 °C. O produto amplificado foi fracionado em gel de ágarose 1%, seguido de purificação com o *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a purificação, o fragmento de DNA de aproximadamente 1110 pb foi inserido no plasmídeo pTZ57R/T (*InsT/Aclone[™] PCR Product Cloning Kit*- Fermentas) por reação de ligação. Esta foi composta de 150 ng de produto de PCR, 6 µL de tampão de ligação 5X (Fermentas), 165 ng do plasmídeo pTZ57R/T, 5 unidades de T₄ DNA Ligase (Fermentas) e água o suficiente para completar o volume para 30 µL. A mistura de reação foi incubada por 16 horas a 4 °C e em seguida utilizada para transformar células de *Escherichia coli* linhagem DH5α, competentes por CaCl₂ (91). Colônias transformantes foram selecionadas em meio de cultura LB (Luria Bertani) ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 0,2 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,04 mg/mL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo). Colônias brancas foram inoculadas em 5 mL de LB líquido com 50 µg/mL de ampicilina seguida de incubação a 37 °C, 200 rpm por 16 horas, para posterior extração de DNA plasmidial com o *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os clones positivos, bem como a fidelidade das sequências, foram confirmados por sequenciamento automático do DNA utilizando-se os oligonucleotídeos universais para sequenciamento, M13/pUC.

Após a confirmação das clonagens, 2 µg de DNA plasmidial pTZ57R/T-SEPT5NGC foi digerido com 5 unidades (U) das enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI* (Fermentas) na presença 12 µL de tampão TangoTM (Fermentas) e água para o volume final de 60 µL. O fragmento de DNA de aproximadamente 1100 pb liberado foi purificado com o *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), após eletroforese em gel de ágarose 1%. O mesmo procedimento foi realizado para linearizar 1 µg do vetor pBTM116kan com as mesmas endonucleases. Os DNAs purificados foram então submetidos a uma reação de ligação obedecendo a proporção de 1:3 (plasmídeo: fragmento). Aproximadamente 50 ng de pBTM116kan linearizado e 150 ng do fragmento de DNA foram misturados com 2 µL de tampão de ligação 10X (Fermentas), 1 U de T₄ DNA ligase (Fermentas) e água para o volume final de 20 µL. A mistura de reação foi incubada a 4 °C, por 16 horas. A reação de ligação foi usada para transformar a linhagem DH5α de *E. coli*, e as possíveis colônias positivas foram selecionadas em meio de cultura LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina. Os clones positivos foram confirmados após extração do DNA plasmidial das colônias seguida de análise de restrição em eletroforese em gel de ágarose 1%. Aproximadamente 300 ng dos DNAs plasmidiais foram digeridos com 0,3 U das endonucleases supracitadas, 2 µL tampão TangoTM (Fermentas) e água para volume final de 10 µL. Os DNAs foram sequenciados, com um oligonucleotídeo específico para o domínio de ligação ao DNA LexA, para confirmar se os insertos estavam em fase aberta de leitura com o vetor. Todo o procedimento de clonagem foi conduzido de acordo com as técnicas padrão de clonagem molecular descritas por Sambrook (91).

2.1.4 Transformação de células de *E. coli* por choque térmico

Células de *Escherichia coli* competentes, linhagens DH5α ou Rosetta, para transformação por choque térmico foram preparadas segundo Sambrook (91).

As reações de ligação ou 30 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados em uma alíquota de células competentes. A suspensão foi mantida no gelo por 20 minutos e em seguida conduziu-se o choque térmico por 1 minuto a 42 °C. Após adição de 500 µL de meio LB, as células foram incubadas por 1 hora, a 37 °C e agitação de 200 rpm. As células foram concentradas por centrifugação a 6000 x g por 1 minuto, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas de petri contendo LB ágar mais agentes seletivos.

2.1.5 Transformação de levedura em pequena escala

A transformação de levedura em pequena escala foi realizada durante o ensaio do duplo híbrido duas vezes com finalidades distintas. No primeiro momento em que este procedimento foi realizado a finalidade era obter células de levedura, L40, expressando as proteínas iscas (SEPT1 ou SEPT5 ou SEPT7) fundidas ao BDLexA. Em etapa mais tardia do ensaio, células de L40 foram cotransformadas com os plasmídeos recombinantes contendo a BD-isca e AD-presca, com o propósito de realizar testes para confirmação das possíveis interações.

Uma colônia isolada da cepa L40 de *Saccharomyces cerevisiae* foi inoculada em 50 mL de meio de cultura YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % peptona e 2 % de glicose) por aproximadamente 24 horas, a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, até atingir densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) de 1,5. Aliquotas de 1 mL do inóculo foram distribuídas em microtubos e centrifugadas a temperatura ambiente por 3 minutos a 2.300 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão de transformação (34,5 % de PEG 3350, 0,2 M de acetato de lítio, TE 1X, 0,1 M de DTT). À suspensão foram adicionados 100 μ g de DNA de esperma de salmão desnaturado (95 °C por 10 minutos seguidos de 10 minutos em gelo) e 200 ou 500 ng de DNAs plasmidiais para transformação ou cotransformação, respectivamente. Em seguida a mistura foi incubada em banho-maria a 45 °C, por 40 minutos, a cada dez minutos a mistura foi homogeneizada por leve agitação. As células foram espalhadas em placas de petri (140 x 15 mm) com meio SD seletivo (Tabelas 4 e 5) e incubadas a 30 °C por 4 dias. Como controle negativo do procedimento foi realizada a transformação com água substituindo os DNAs plasmidiais.

Tabela 4 - Combinação dos plasmídeos e seus respectivos meios de cultura seletivos

Plasmídeos	Meio de cultura seletivo
pBTM116kan + pACT2-presca	SD-WL
pBTM116kan-isca + pACT2-presca	SD-WL ou SD-WLH
pBTM116kan-isca + pGAD424	SD-WL
pBTM116kan-isca	SD-W
pACT2-presca	SD-L

Tabela 5 – Composição dos meios de cultura seletivos para leveduras

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

¹ Ágar foi adicionado apenas em meio sólido.

2.1.6 Ensaio da β -galactosidase em papel de filtro

Este ensaio foi realizado logo após a obtenção da levedura expressando BD-isca, com o intuito de confirmar que a isca por si só não ativa o sistema, podendo neste caso ser chamado de teste de autoativação. Após a realização da varredura das bibliotecas, novamente realizou-se este procedimento, agora com o propósito de eliminar interações falso-positivas ou como teste preliminar para confirmação de possíveis interações.

Colônias isoladas de leveduras foram repicadas em meio SD ágar seletivo (Tabelas 4 e 5) e incubadas a 30 °C, por 3 dias. Posteriormente foi colocado sobre o meio de cultura um papel de filtro previamente cortado no formato da placa. O papel foi levemente pressionado com uma alça de Drigalsky para que as células aderissem nele e em seguida foi imerso em nitrogênio líquido por 5 minutos para promover a lise das células. O papel de filtro com a face contendo as células voltado para cima foi colocado sobre outro papel de filtro umedecido em 5 mL de tampão Z (16,1 g/L de Na₂HPO₄.7H₂O; 5,5 g/L NaH₂P0₄.H₂O; 0,75 g/L de KCl e 0,246 g/L de MgSO₄.7H₂O, pH 7,0) com 13,5 µL de β -mercaptoetanol e 83,5 µL de X-Gal a 20 mg/mL, em uma placa de petri. O papel de filtro foi incubado a 37 °C até o surgimento de colônias azuis e depois foi colocado em uma capela para secar. O controle positivo utilizado neste teste foi L40 expressando FEZ1 (1 – 392) fusionada ao BDLexA (autoativa o sistema), o qual foi cedido pelo Dr Jörg Kobarg (92).

2.1.7 Varredura das bibliotecas – Transformação de L40 em grande escala

Após a confirmação que SEPT1, SEPT5 e SEPT7 fusionadas ao BDLexA não autoativavam o sistema do duplo híbrido, iniciou-se os procedimentos para varredura das bibliotecas de cDNA de cérebro fetal e de leucócitos humano Matchmaker™ (Clontech), cujos os cDNAs foram fundidos ao domínio de ativação da proteína GAL4 no plasmídeo pACT2. Com a SEPT7 foi realizada a varredura apenas da biblioteca de cDNA de leucócitos, sendo que a varredura da outra biblioteca foi realizada pelo aluno de doutorado Luis Fernando Reyes. As transformações de leveduras foram realizadas com o procedimento de transformação química por acetato de lítio baseado no método descrito por Ito e colaboradores (93). Antes de iniciar a varredura das bibliotecas foi necessário determinar a menor concentração de 3-AT (3-amino-1, 2, 4-triazol) na qual L40 expressando as proteínas BD-iscas mantivessem colônias com crescimento menor a 1 mm, após uma semana de incubação em meio SD-WH suprido com 5, 10, 15 ou 20 mM de 3-AT. Esta concentração de 3-AT foi a utilizada no momento do plaqueamento das células, na etapa final da transformação. A concentração por nós determinada foi de 5 mM de 3-AT.

Três colônias isoladas de L40, pré-transformadas com pBTM116kan-SEPT1NGC ou pBTM116kan-SEPT5NGC ou pBTM116kan-SEPT7NGC, foram transferidas para 1 mL de meio SD-W (Tabela 5) e ressuspensas por agitação vigorosa. A suspensão celular foi inoculada em 75 mL de meio SD-W (Tabela 5) e incubada a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 24 horas, até atingir $DO_{600nm} \geq 1,5$. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000 x g, 21 °C por 5 minutos, transferidas para 500 mL de meio YPD e incubadas a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 4 horas, até atingir DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000 x g, 21 °C por 5 minutos, ressuspensas em 200 mL de TE 1X (Tabela 6) e novamente centrifugadas na mesma condição anterior. O *pellet* das células foi então ressuspenso em 4 mL de TE/LiAc 1X (Tabela 6) e duas alíquotas de 200 µL foram retiradas para as transformações controles. À suspensão celular foi adicionada 10 mg de DNA de esperma de salmão desnaturado (15 minutos a 95 °C seguido de 10 minutos em gelo), 150 µg de DNA da biblioteca de cDNA de cérebro fetal ou de leucócitos e 30 mL de PEG/LiAc (Tabela 6). Posteriormente a mistura foi incubada a 30 °C, 200 rpm durante 30 minutos e as células foram então submetidas a choque térmico a 42 °C por 15 minutos com subsequente incubação em gelo por 3 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000 x g, 21 °C por 5 minutos e ressuspensas em 5 mL de TE

1X (Tabela 6) . Alíquotas de 250 μ L foram espalhadas em aproximadamente 20 placas de petri (140 mm x 15 mm) contendo SD-WLH (Tabela 5) com 5 mM de 3-AT. Para analisar a eficiência da transformação, as seguintes titulações da suspensão celular 1:10, 1:100 e 1:1000 foram espalhadas em placas de petri contendo SD-WL (Tabela 5). As placas foram incubadas a 30 °C por 6 dias. O crescimento de colônias nas placas foi monitorado diariamente marcando-se as colônias com tamanho aproximado de 2 mm.

As transformações controles foram realizadas adicionando-se 600 μ L de PEG/LiAc (Tabela 6), 100 μ g de DNA de esperma de salmão e 10 μ L de água ou 200 ng de DNA do plasmídeo pGAD424 às alíquotas de 200 μ L de suspensão celular. O restante do procedimento foi realizado como descrito acima e as células foram ressuspendidas em 250 μ L de TE 1X (Tabela 6) e espalhadas em SD-WL (pGAD424) e SD-WH (água).

Após seis dias as colônias transformantes foram repicadas em meio SD-WLH (Tabela 5) com 5 mM de 3-AT para confirmar a presença dos dois plasmídeos e a expressão do gene repórter *HIS3*. As colônias que não se desenvolveram neste meio entre 3 a 4 dias foram eliminadas para os testes futuros. A confirmação do crescimento das colônias no meio SD-WLH com 3-AT foi o primeiro teste para eliminar clones falso-positivos, em seguida foi realizado o teste da β -galactosidase (item 2.1.6) com o mesmo propósito.

Tabela 6 - Soluções utilizadas no procedimento de transformação de leveduras em grande escala

Solução	Componentes
TE 10X	0,1 M Tris-HCl , 10 mM EDTA, pH 7,5
TE 1X	1 mL de TE 10X, 9 mL de H ₂ O milli-Q
PEG 3350 50% (p/v)	50 g de PEG 3350 em água para volume final de 100 mL
PEG/LiAc	8 mL PEG 3350 50%, 1 mL de TE 10X, 1 mL LiAc 10X
LiAc 10 X	LiAc 1 M, ajustar pH para 7,5 com ácido acético
TE /LiAc 1X	1 mL TE 10X, 1 mL LiAc 10 X, 8 mL H ₂ O milli-Q

2.1.8 Extração de DNA plasmidial de levedura

O procedimento para extração de DNA plasmidial de leveduras utilizado foi baseado no descrito por Ling e colaboradores com algumas modificações (94). Neste método utiliza-se a digestão exaustiva com liticase para quebra da parede celular, com posterior tratamento com SDS para formação dos esferoplastos.

Os clones de leveduras positivos para o teste da β -galactosidase carregam os plasmídeos pBTM116kan-isca e pACT2-presca, que conferem auxotrofia a triptofano e leucina, respectivamente. Com o propósito de isolar apenas o pACT2-presca, promovemos a perda do pBTM116kan-isca pela levedura por ausência de pressão seletiva, ou seja, adicionamos ao meio de cultura triptofano. Colônias isoladas dos clones foram inoculadas em 5 mL de meio SD-L (Tabela 5), para seleção do plasmídeo recombinante pACT2-presca, e incubadas a 30 °C, 200 rpm por 20 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e ressuspensas em 60 μ L de Tris a 50 mM, pH 8,0. Adicionou-se à suspensão celular 20 μ L de liticase a 5 mg/mL, seguida de agitação vigorosa e incubação em banho-maria a 37 °C por uma hora, com agitação a cada 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 20 μ L de SDS 20% e agitou-se vigorosamente por um minuto. As amostras foram então submetidas a 10 ciclos de 20 segundos em nitrogênio líquido intercalados com 20 segundos em banho-maria a 42 °C. Logo após adicionou-se 100 μ L de água milli-Q e 200 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), agitou-se vigorosamente a mistura por 1 minuto e centrifugou-se por 1 minuto a 16.000 x g. À fase aquosa, transferida para um novo microtubo (aproximadamente 300 μ L), adicionou-se 10 μ L de LiCl a 8 M e 300 μ L de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se a mistura sendo armazenada a -20 °C por 20 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O excesso de sal foi retirado por lavagem do DNA precipitado com 500 μ L de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação por 10 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado após secar a temperatura ambiente foi ressuspensão em 30 μ L de água milli-Q.

Células de *E. coli* DH5 α , foram transformadas com 15 μ L dos DNAs plasmidiais extraídos de leveduras pelo método de choque térmico como descrito no item 2.1.4. As células transformadas foram selecionadas em meio LB ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina.

2.1.9 Extração de DNA plasmidial de bactéria

Os DNAs plasmidiais bacterianos para seqüenciamento foram extraídos pelo método da lise alcalina seguida de precipitação com álcool (91). Colônias isoladas de bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 50 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 horas a 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e

ressuspensas em 300 μ L de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0) por agitação vigorosa. Em seguida adicionou-se 300 μ L de solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS), agitou-se a mistura por inversão e mantendo-a por 5 minutos a temperatura ambiente. Trezentos μ L de solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água) foram adicionados, seguido por homogeneização da mistura por inversão e centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtudo e 0,7 volume de isopropanol foi adicionado seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. A precipitação do DNA procedeu-se por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O excesso de sal foi retirado pela lavagem do DNA precipitado com 500 μ L de etanol 70%, seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os DNAs precipitados foram secos a temperatura ambiente e a seguir ressuspensos em 50 μ L de água e quantificados por eletroforese em gel de ágarose 1% ou em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

2.1.10 Sequenciamento de DNA e análise de seqüências

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactérias foram sequenciados em sequenciador automático no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do LNLS, em Campinas, sob coordenação do Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin. Para o sequenciamento foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o domínio de ativação GAL4 presente no pACT2.

As seqüências obtidas foram inicialmente submetidas à análise de similaridade com sequências de proteínas depositadas no banco de dados público (GenBank), no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm>. Para este fim foram utilizados os programas BLASTX e BLASTP (95), localizados no mesmo endereço eletrônico, anteriormente citado. Apenas os clones que mantiveram a fase aberta de leitura +1 (FRAME +1), com o domínio de ativação GAL4 foram utilizados em análises posteriores. O FRAME +1 com ADGAL4 foi verificado através da identificação da seqüência 5'AATTCGGGCCGTCGAC3' do adaptador utilizado na síntese da biblioteca de cDNA (Clontech), que se encontra antes da seqüência do cDNA. A tradução das seqüências de nucleotídeos foi realizada com o programa *Six Frame Translation of Sequence*, disponível no seguinte endereço eletrônico <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>; a presença de domínios conservados foi

analisada com o programa Pfam (96) localizado no *website* <http://pfam.sanger.ac.uk/>. O programa SUMOplot™ disponível no endereço eletrônico <http://www.abgent.com/tools/sumoplot>, disponibilizado pela Abgent, foi utilizado para identificar potenciais sítios de sumoilação em SEPT1 e SEPT5.

2.1.11 Teste em leveduras para confirmação das possíveis interações selecionadas

Após as análises das sequências e consequente identificação de proteínas candidatas a interagir com SEPT1, ou SEPT5 ou SEPT7, iniciaram-se os primeiros testes para confirmação das interações em leveduras. Para tal fim, L40 foi cotransformada com os clones previamente selecionados (AD-presa) e com BD-isca ou pBTM116kan, conforme descrito no item 2.1.5. Após as transformações, as células foram transferidas para meio SD-WLH (Tabela 5) com 5 mM de 3-AT afim de analisar a ativação de *HIS3* e também foram submetidas ao ensaio da β -galactosidase para verificar a expressão do gene *lacZ*, como descrito no item 2.1.6.

2.1.12 Análise qualitativa da força das interações previamente selecionadas

As interações positivas para os testes citados no item anterior foram submetidas a um ensaio para verificar sua força relativa em condições crescentes de estringência com 3-AT. Colônias isoladas de L40 expressando BD-isca e AD-presa foram inicialmente diluídas em 100 μ L de água estéril, seguindo com diluições seriadas 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. Posteriormente, 5 μ L de cada diluição foram distribuídos em placas de meio SD-WLH (Tabela 5) com 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mM de 3-AT, e incubados a 30 °C por 72 horas. L40 coexpressando BD-SEPT5NGC e AD-SEPT8NGC foi utilizada como referência para interação forte (97).

2.2 Caracterização biofísica da septina 3 humana

2.2.1 Linhagens de bactérias e plasmídeos utilizados para expressão das proteínas

A linhagem Rosetta de *E. coli* (Novagen), pode aumentar a expressão de proteínas de eucariotos que apresentam códons raros para *E. coli*. Nesta linhagem, os genes que codificam tRNAs para seis códons raros para *E. coli* estão presentes no plasmídeo pRARE, o qual confere resistência a cloranfenicol.

O plasmídeo pET28a(+) (Novagen) permite a clonagem do gene de interesse fusionada a códons para seis resíduos de histidina no amino-terminal da proteína de interesse. A cauda de histidinas permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade a metal (níquel ou cobalto). O plasmídeo também possui os códons para um sítio de reconhecimento para a protease trombina, localizado entre a cauda de histidina e o sítio múltiplo de clonagem.

2.2.2 Clonagem de SEPT3 e domínios em plasmídeo de expressão em bactéria

Com a finalidade de expressar em bactéria a septina 3 inteira (SEPT3NGC) e uma versão truncada, correspondente aos domínios GTPase e o carboxi-terminal (SEPT3GC), foram sintetizados oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) baseados na sequência codificante de SEPT3, depositadas no GenBank, sob o número de acesso NM_019106. SEPT3NGC possui 337 resíduos de aminoácidos e SEPT3GC corresponde aos aminoácidos 46 a 337. Os oligonucleotídeos, além de flanquearem as sequências de interesse, também possuíam sítios para as endonucleases de restrição, *NdeI* e *XhoI*, que permitiram a clonagem no vetor de expressão em bactéria (Tabela 7).

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de SEPT3

Nome ^a	Sequência ^a	Coordenadas ^b
Sept3-Fow- <u>NdeI</u>	GCCATATGTCAGAGCTGGTGCCTGAGCCCAGGCC	1 – 29
Sept3-Rev- <u>XhoI</u>	CCCTCGAGTTATCATGGGTTACTGTCGTGGCTTTCCTCTG	986 - 1014
Sept3- GTPase-fow- <u>NdeI</u>	CGCATATGGGTTTCGACTTCAACATCATGGTCGTTGGC	136 – 165

^a Sublinhado, nome e sítio da enzima de restrição

^b localização do oligonucleotídeo na sequência codificadora de SEPT3, em pares de bases

Inicialmente, isolou-se a sequência codificadora de SEPT3 utilizando-se como molde 1,0 µg de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Invitrogen) como molde para PCR, juntamente com 1,0 µM dos oligonucleotídeos flanqueadores, Sept3-Fow-NdeI e Sept3-Rev-XhoI (Tabela 7), 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de 10X *High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂* (Fermentas) e água para volume final de 50 µL. A reação foi realizada no termociclador (*Mastercycler gradient Eppendorf*) sob as seguintes condições: 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 64 °C e 1 minuto e 30 segundos a 68 °C) finalizando com 20 minutos a 68 °C. O produto amplificado de aproximadamente 1030 pb foi fracionado em gel de ágarose 1%, seguido de purificação com o *kit Wizard SV gel and pCR clean-up system* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. O fragmento de DNA purificado foi inserido no plasmídeo pTZ57R/T (*InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit*- Fermentas), propagado em células de *E. coli* DH5α, finalizando com a confirmação da clonagem e análise da fidelidade das sequências por sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13/pUC, como descrito no item 2.1.3. Para amplificar SEPT3GC, 20 ng do plasmídeo recombinante pTZ57R/T-SEPT3NGC foi utilizado como molde em PCR com 0,2 µM dos oligonucleotídeos Sept3-GTPase-fow-NdeI e Sept3-Rev-XhoI (Tabela 7), os demais reagentes e as condições da reação foram idênticas as descritas acima. Após a amplificação, o fragmento de 898 pb foi purificado, inserido no pTZ57R/T e a confirmação da clonagem foi realizado por sequenciamento, como descrito anteriormente. A clonagem de SEPT3NGC e SEPT3GC no plasmídeo de expressão em bactéria pET28a(+) (Novagen) foi realizada como descrito no item 2.1.3 para as clonagens das septinas iscas no plasmídeo pBTM116kan com uma exceção, as enzimas de restrição utilizadas para liberação do fragmento de DNA e linearização do

plasmídeo pET28a(+) foram *Nde*I e *Xho*I (Fermentas). A clonagem foi confirmada por análise do padrão de restrição e por sequenciamento do DNA utilizando-se os oligonucleotídeos T7 promotor e T7 terminador. Os clones positivos denominados de pET28-SEPT3NGC e pET28-SEPT3GC foram utilizados para transformar células de *E. coli* Rosetta, a fim de expressar as proteínas heterólogas. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol.

2.2.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes SEPT3NGC e SEPT3GC

Uma colônia isolada de *E. coli* Rosetta pET28-SEPT3NGC ou pET28-SEPT3GC foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol, em seguida, foi incubada por 14 horas a 37 °C e 250 rpm. Os inóculos foram transferidos para 500 mL de meio LB com os mesmos antibióticos e incubados a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, até atingir DO_{600nm} entre 0,5 e 0,7. As células foram incubadas a 18 °C por aproximadamente 1 hora e então induzidas por adição de 0,2 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo), seguido de incubação por 14 horas a 18°C e 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e finalmente ressuspensas em 20 ml de tampão A (Tabela 8). A suspensão celular foi armazenada a -80 °C até a realização da purificação. As células foram descongeladas, divididas em quatro alíquotas de 5 mL e foram rompidas por 15 ciclos de 25 segundos de ultrassonicação com intervalos de 35 segundos. A fração insolúvel foi então separada da fração solúvel por centrifugação a 17.000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. A fração solúvel foi transferida para um tubo falcon e adicionou-se 5 mM de imidazol. A mistura foi aplicada em coluna de cromatografia contendo 2 mL de resina Ni-NTA *super flow* (Qiagen), previamente equilibrada com 5 volumes de tampão A (Tabela 8). Em seguida a resina passou por três etapas de lavagem para retirar possíveis contaminantes. A primeira lavagem consistiu de 50 mL de tampão A com 12 mM de imidazol e 0,2% de tween 20; a segunda lavagem foi feita com 50 mL de tampão A com 12 mM de imidazol e a terceira lavagem foi realizada com 50 mL de tampão B com 12 mM de imidazol (Tabela 8). A eluição da proteína foi realizada com 10 mL de tampão B contendo 500 mM de imidazol. A composição dos tampões A e B estão descritas na Tabela 8 e variaram de acordo com a finalidade (experimento) para qual a proteína foi purificada. As primeiras purificações de SEPT3GC correspondem aos testes 1 e 2 da Tabela 8. Após o

segundo teste de purificação alteramos a quantidade de NaCl até chegarmos nas condições descritas nesta Tabela.

Tabela 8 - Composição dos tampões A e B utilizados na purificação das proteínas recombinantes, SEPT3NGC e SEPT3GC.

Experimento	Tampão A	Tampão B
1º Teste de purificação SEPT3NGC e SEPT3GC	25 mM de Tris, pH 7,8 10% de glicerol	25 mM de Tris, pH 7,8 10% de glicerol
2º Teste de purificação SEPT3NGC e SEPT3GC	25 mM de Tris, pH 7,8 10% de glicerol 20 mM de NaCl 5mM de β -mercaptoetanol	25 mM de Tris, pH 7,8 10% de glicerol 20 mM de NaCl 5mM de β -mercaptoetanol
SAXS SEPT3GC	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$
Calorimetria de Titulação Isotérmica Espectroscopia de fluorescência com mant- GDP e mant-GTP Teste de atividade GTPásica	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$	25 mM de Tris, pH 7,8 300 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$
Dicroísmo circular SEPT3GC	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$	25 mM de Tris, pH 7,8 50 mM de NaCl 5% de Glicerol 2 mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$
Análise da propensão a formação de agregados por SEPT3GC: espectroscopia de fluorescência com ThT e dicroísmo circular	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol	25 mM de Tris, pH 7,8 50 mM de NaCl 5 % de Glicerol
Cristalografia SEPT3GC	25 mM de Tris, pH 7,8 800 mM de NaCl 10% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$	25 mM de Tris, pH 7,8 400 mM de NaCl 7% de Glicerol 5mM de β -mercaptoetanol 5 mM de $MgCl_2$

A segunda etapa do processo de purificação das proteínas foi a cromatografia de exclusão molecular, a qual foi utilizada para separar os agregados protéicos e contaminantes das proteínas de interesse. Volumes de 1 mL das proteínas recém purificadas por cromatografia de afinidade foram aplicadas na coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão B (Tabela 8) e acoplada a um sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare). A cromatografia foi realizada com uma eluição isocrática de 1,3 volume total da coluna, sob uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e monitorada pela absorbância a 280 e 254 nm. Frações de 1 mL dos picos de interesse foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 15% (91) e em gel nativo gradiente 8-25 (PhastGel – GE Healthcare) utilizando-se o sistema *PhastSystem* (GE Healthcare).

2.2.4 Determinação da massa molecular aparente de SEPT3GC

A massa molecular de SEPT3GC recombinante foi inicialmente determinada por gel filtração em uma coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare) utilizando-se padrões de massa molecular disponíveis no *Gel Filtration Calibration Kits* (Ge Healthcare). Os padrões utilizados foram 3 mg/mL de aprotinina (6.500 Da), 3mg/mL de ribonuclease A (13.700 Da), 3 mg/mL de anidrase carbônica (29.000 Da), 4 mg/mL de ovalbumina (44.000 Da), 3 mg/mL de conalbumina (75.000 Da), 4 mg/mL de aldolase (158.000 Da) e 0,3 mg/mL de ferritina (440.000 Da). O Blue Dextran 2000 a 1 mg/mL foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão da coluna. Proteínas e padrões foram preparados no mesmo tampão B (Tabela 8) utilizado nos experimentos de calorimetria e SAXS. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 0,5 mL/min, com um volume total de eluição de 1,3 volume da coluna, sendo monitorada pela absorbância a 280nm e amostras de 500 µL foram aplicadas na coluna. Os volumes de eluição dos padrões e de SEPT3GC foram determinados e utilizados para o cálculo de K_{av} usando a equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

onde: V_e corresponde ao volume de e

V_0 é o volume de exclusão da coluna eg

V_c corresponde ao volume da coluna.

Os dados foram plotados em um gráfico K_{av} x Log MM (Massa Molecular).

2.2.5 Análises de bioinformática

O coeficiente de extinção teórico (ϵ) para absorvância a 280 nm, a massa molecular e o ponto isoelétrico teórico (PI) de SEPT3NGC e SEPT3GC foram calculados com o programa ProtParam disponível no endereço eletrônico <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html> (98). O programa PeptideCutter (mesmo endereço eletrônico supracitado) foi utilizado para identificar os potenciais sítios de clivagem para proteases na sequência de SEPT3. A sequência de SEPT3 depositada no GenBank, sob o número de acesso NM_019106 foi utilizada nas análises.

2.2.6 Quantificação de SEPT3GC

A concentração de SEPT3GC foi determinada pela absorvância a 280 nm determinada em espectrofotômetro U-2001 (HITACHI) com uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Os cálculos foram realizados usando as equações abaixo:

$$[\mu\text{M}] = \frac{\text{Abs}_{280\text{nm}} \times 10^6}{\epsilon \cdot l} \quad \text{ou} \quad [\text{g/L}] = \frac{\text{Abs}_{280\text{nm}} \times \text{MM}}{\epsilon \cdot l}$$

onde: $[\mu\text{M}]$ é a concentração dada em μM ,

$[\text{g/L}]$ é a concentração dada em g/L,

$\text{Abs}_{280\text{nm}}$ é a absorvância da proteína a 280 nm,

ϵ é o coeficiente de extinção molar ou de absorvidade molar teórico ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),

l é o caminho ótico (cm^{-1}) e

MM massa molar da proteína (g/mol).

As equações acima são originadas da Lei de Lambert-Beer (equação abaixo) que nos dá uma relação direta entre a concentração e absorvância da amostra.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

onde: A, é a absorbância da amostra,

ϵ é o coeficiente de extinção molar da amostra ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$),

c é a concentração da amostra (M) e

l é o caminho ótico (cm).

2.2.7 Análises da estabilidade de SEPT3GC em função do pH

Aproximadamente 8,0 μM de SEPT3GC foram incubados por 12 horas em gelo, em 20 μM de solução tampão acetato-borato-fosfato de sódio, na seguinte faixa do pH 3,0 a 12,0, intercalados de 1 unidade. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min para eliminar qualquer precipitado protéico e foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular. Os espectros de CD foram coletados em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão) com uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, a 10 °C, no intervalo de 200 a 250 nm, como uma média de 8 acumulações. Os espectros foram analisados quanto à contribuição da estrutura secundária com o pacote de programas de desconvolução CDPRO (Selcon3, Contill, CDSSTR) utilizando-se o maior banco de dados distribuído com o pacote, composto de 56 proteínas (99-102). Os espectros de CD foram transformados em elipticidade molar ($[\theta]$) através da seguinte relação:

$$\theta = \frac{\theta_{obs} \cdot M_R \cdot 100}{l \cdot c} \times 10^{-3}$$

onde: θ_{obs} é a elipticidade observada (graus),

M_R é a massa molecular média por resíduo (115 $g \cdot mol^{-1}$),

l é o caminho ótico (cm) e

c é a concentração ($mg \cdot mL^{-1}$).

SEPT3GC em solução tampão composta por 25 mM de tris, 50 mM de NaCl, 5% de glicerol, 2 mM de β -mercaptoetanol e 5 mM $MgCl_2$ foi avaliada também por CD. A contribuição das estruturas secundárias foi calculada como descrito anteriormente, e a classificação de SEPT3GC quanto à estrutura terciária foi realizada com o programa

CLUSTER. A contribuição das soluções tampões nos espectros foi subtraída em todas as análises.

2.2.8 Espalhamento de Raios X a Baixo ângulo (SAXS)

Os experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram conduzidos na linha de luz D11A-SAXS (103), do anel de armazenamento de elétrons do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, São Paulo. O tempo de feixe para coleta dos dados foi gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Frederico Moraes Ferreira do Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da FMUSP, que também realizou o processamento dos dados. Os dados foram coletados em detector bidimensional MarCCD, radiação incidente de comprimento de onda 1,488 Å e distância amostra-detector de 1028,37 mm, cobrindo a faixa de transferência de momento $0,01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,35 \text{ \AA}^{-1}$. Todos os dados foram coletados à temperatura de 4 °C para a atenuação dos efeitos de aquecimento da amostra. Em todos os experimentos, o espalhamento do tampão foi subtraído do espalhamento da amostra. As imagens foram integradas utilizando o programa FIT2D (104, 105) enquanto os dados foram analisados com programas do pacote ATSAS(106). A estimativa da massa de SEPT3GC a partir dos dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo foi realizada com o programa SAXSMOW(107).

2.2.9 Análise do teor de nucleotídeo de SEPT3GC

Amostras de proteína foram preparadas para análise do teor de nucleotídeo segundo o método descrito por Seckler e colaboradores, com algumas modificações (108). Adicionou-se 250 µL ácido hiperclórico (HClO₄) 1,5 M gelado em 500 µL de SEPT3GC a 20 µM, a mistura foi incubada no gelo durante 10 min e em seguida as proteínas desnaturadas foram removidas por centrifugação durante 10 min, a 16.000 x g e 4 °C. Com o objetivo de precipitar KClO₄ e neutralizar o pH, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo e adicionou-se 100 µL de K₂HPO₄ 1 M, 100 µL de KOH 3 M e 80 µL de ácido acético 5 M, gelados. Em seguida as amostras foram congeladas a -20°C por pelo menos 1

hora. Para realizar a análise em *High Performance/Pressure Liquide Chromatography* (HPLC) as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 10 min, 16.000 x g e 4 °C, em seguida, 200 µL do sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca aniônica *Protein Pack DEAE 5 PW*, 7,5 mm x 7,5 cm (*Waters*). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia formado por um módulo de separação *Waters 2695* e um detector de absorvância *Waters 2487*. Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão A (25 mM de Tris, pH 7,8) e tampão B (25 mM de Tris, pH 7,8 com 1 M de NaCl). As condições do gradiente de NaCl utilizado estão descritas na Tabela 9. Uma curva padrão de GDP e GTP diluídos no mesmo tampão da proteína e tratados com HClO₄ foi feita nas concentrações 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 e 40,0 µM. A solução tampão da proteína tratada com HClO₄ foi utilizada como controle. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente sendo monitorada pela absorvância a 253 nm.

Tabela 9 - Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca aniônica

Tempo (min)	Fluxo (mL)	Porcentagem de Tampão A	Porcentagem de Tampão B
0	1,0	90	10
1	1,0	90	10
10	1,0	55	45
12	1,0	0	100
13	1,0	90	10
14	1,0	90	10

2.2.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica que permite obter parâmetros termodinâmicos de interações moleculares através da medição direta do calor absorvido ou liberado durante a ligação. Em um único experimento é possível obter a constante de ligação (K_d), a entalpia (ΔH) e a estequiometria (n) do sistema. Esta técnica foi utilizada para estudar a ligação de SEPT3GC com os nucleotídeos GDP (guanosina-5-difosfato) e a um análogo não hidrolizável do GTP, GTP γ S (Guanosina 5'-[γ -thio]trifosfato).

Todo o procedimento foi realizado conforme recomendações do fabricante do equipamento, microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Na cela da amostra de 1,417 mL foram

colocados SEPT3GC a 25 μ M ou a solução tampão (Tabela 8) após serem desgaseificadas por 10 min, em um *Thermovac* (MicroCal), a 18 °C, para evitar a presença de bolhas de ar na cela. Os ligantes GDP ou GTP γ S (Qiagen) foram preparados na solução tampão da proteína para uma concentração final de 500 μ M e foram titulados na cela da amostra com uma seringa de alta precisão. Realizou-se 35 injeções de 5 μ L dos ligantes com um intervalo de 360 segundos entre as injeções. O calor de diluição foi determinado pela titulação do ligante na solução tampão, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Todo o procedimento foi realizado a 20 °C e sob agitação constante de 255 rpm. Durante os experimentos a cela de referência foi preenchida com água desgaseificada. A ligação entre a macromolécula (proteína) e o ligante (GDP ou GTP γ S) resultou na liberação ou absorção de calor ao longo do tempo que foi registrada na forma de uma curva de titulação, a qual após analisada com o programa ORIGIN para ITC (MicroCal) resultou em uma isoterma de ligação. O ligante, GDP a 1 mM também foi utilizado para titular SEPT3GC.

2.2.11 Espectroscopia de fluorescência com mant-GDP e mant-GTP

A eficiência de SEPT3GC para ligar a nucleotídeos de guanina também foi analisada por incubação de 17 μ M de SEPT3GC em solução tampão, contendo 300 mM de NaCl, 25 mM de Tris, 5% de glicerol, 5 mM de MgCl₂ e 5 mM de β -mercaptoetanol, com 50 nM de mant-GTP ou mant-GDP (Invitrogen). As medidas foram realizadas a 10 °C, em um fluorímetro ISS-K2 utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram excitadas a 366 nm e a aquisição dos dados foi realizada na faixa de 390 a 550 nm. As medidas também foram realizadas com os nucleotídeos fluorescentes na ausência da proteína. As soluções estoque dos nucleotídeos fluorescentes foram preparadas a 100 nM na mesma solução tampão da proteína.

2.2.12 Teste de atividade

O teste de atividade foi realizado com SEPT3GC na mesma solução descrita no item anterior e na Tabela 8. Este teste consistiu na análise direta da presença de GDP por HPLC.

SEPT3GC (18,4 μM) foi incubada com 55 μM de GTP por 1 hora a 20 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 4 minutos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para parar a reação. As amostras foram desnaturadas com ácido hiperclórico e analisadas por cromatografia em uma coluna de troca aniônica Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (*Waters*), como descrito no item 2.2.9.

2.2.13 Espectroscopia de fluorescência com Tioflavina T (ThT)

A propensão de SEPT3GC para forma fibras do tipo amilóide foi avaliada por incubação de 8 μM de SEPT3GC com 50 μM de ThT (Sigma) nas temperaturas de 30, 37, 45 e 55 °C. As amostras foram excitadas a 450 nm e os dados foram coletados a 482 nm durante 5400 segundos, imediatamente após a adição do ThT. As medidas foram realizadas em um fluorímetro ISS-K2 utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A solução estoque da sonda fluorescente, ThT, foi preparada a 10 mM em água. Antes de iniciar os experimentos a proteína foi centrifugada a 10.000 x g, durante 10 minutos e a 4 °C. A proteína foi preparada em solução tampão contendo 25 mM de Tris, pH 7,8, 50 mM de NaCl e 5 % de Glicerol.

2.2.14 Influência da temperatura na composição de estrutura secundária de SEPT3GC

Alíquotas de 6 μM de SEPT3GC, da mesma preparação do experimento anteriormente descrito, foram analisadas em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão), com uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, no intervalo de 200 a 250 nm. Os espectros de CD foram coletados como uma média de 8 acumulações, nas temperaturas de 30, 37, 45 e 55 °C e foram transformados em elipticidade molar ($[\theta]$), como descrito no item 2.2.7.

2.2.15 Ensaio de cristalização

Ensaio de cristalização foram realizados com SEPT3GC utilizando-se o método de difusão de vapor com gotas suspensas (109). Os experimentos foram realizados com SEPT3GC sem a cauda de histidina variando a concentração entre 5,0 e 2,5 mg/mL, em tampões com diferentes concentrações de NaCl (Tabela 8) e na presença de 1 mM de GDP ou GTP γ S. As condições utilizadas nos experimentos foram as fornecidas pelos fatoriais *Classics* e *Classics II* suíte; PEGs e PEGs II suíte; AmSo4 suite e Cryos suite, todos adquiridos da empresa Qiagen. Além destes, foram utilizados *crystal screen HT* e *salt RX HT* da empresa Hampton Research. Variações na temperatura de incubação também foram realizadas (4 e 18°C). Após a escolha da melhor condição provinda dos fatoriais iniciou-se a etapa de refinamento. Todos os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Humberto D'Muniz Pereira e com o doutorando Ivo de Almeida Marques, do grupo de cristalografia de proteínas do IFSC.

2.2.16 Digestão de SEPT3GC com trombina bovina

A cauda de histidina fusionada ao amino-terminal de SEPT3GC foi retirada por meio de digestão com trombina bovina (Sigma-Aldrich). SEPT3GC após purificação por cromatografia de afinidade foi dializada contra tampão Tampão B para cristalografia (Tabela 8) com o propósito de retirar o imidazol da amostra. A diálise foi realizada em uma membrana para diálise, *Spectra/Por[®] Regenerated Cellulose membrane* (BioAgency), com peso molecular de corte de 10 kDa, a 4 °C em um volume de tampão 100 vezes o volume de proteína, durante 8 horas. Após a diálise, trombina foi adicionada à proteína na relação de 0,1 U por micrograma de proteína. A digestão foi realizada por incubação da mistura em banho de gelo por aproximadamente 12 horas. Em seguida, a protease trombina foi retirada por incubação com a resina Benzamidine Sepharose 6B durante 30 minutos a 4 °C. A resina foi separada da amostra protéica por decantação em uma coluna de prolipropileno de 20 mL (BIO-RAD). Após esta etapa, SEPT3GC passou por uma cromatografia de exclusão molecular como descrito no item 2.2.3 e foi utilizada para os ensaios de cristalização.

2.3 SEPT5 e domínios: testes de expressão e purificação

2.3.1 Clonagem de SEPT5 e seus domínios em plasmídeo de expressão em bactéria

Com a finalidade de expressar em bactéria a septina 5 inteira (SEPT5NGC) e as versões truncadas: domínio GTPase (SEPT5G), domínio GTPase juntamente com o carboxi-terminal (SEPT5GC) e o amino-terminal com o domínio GTPase (SEPT5NG); todas fundidas a uma cauda de histidina, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos (Tabela 10) baseados na sequência codificante de SEPT5, depositadas no GenBank, sob o número de acesso NM_002688. Os oligonucleotídeos, além de flanquearem as sequências de interesse, também possuíam sítios para enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*, que permitiram a clonagem no vetor de expressão pET28a(+). As posições dos aminoácidos que limitam cada versão truncada de SEPT5, as combinações dos oligonucleotídeos e as temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação dos fragmentos de DNA em PCR estão descritas na Tabela 11. Os procedimentos de clonagem e propagação dos plasmídeos recombinantes em células de *E. coli* Rosetta foram iguais aos descritos no item 2.2.2. As endonucleases utilizadas nas etapas de digestão de DNA foram *NheI* e *XhoI*.

Tabela 10 - Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de SEPT5

Nome ^a	Sequência ^a	Coordenadas ^b
Sept5-Fow- <u>NheI</u>	GCGCTAGCATGAGCACAGGCCTGCG	1 – 30
Sept5-Rev- <u>XhoI</u>	CCCTCGAGTCACTGGTCCTGCATCTGCTGCTTCATCCTC	1080 - 1110
Sept5-GTPase-Fow- <u>NheI</u>	GGCTAGCGGCTTTGACTTCACACTCATG	124 - 144
Sept5-GTPase-Rev- <u>XhoI</u>	CCTCGAGTTAGGTCATCTGCTGGATGCAG	930 - 948

^a Sublinhado, nome e sítio da enzima de restrição

^b localização do oligonucleotídeo na sequência codificadora, em pares de bases

Tabela 11 - Combinação dos oligonucleotídeos para amplificar SEPT5 e coordenadas dos aminoácidos que flanqueiam cada versão truncada de SEPT5.

Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento	Domínios	Tamanho (pb)	Coordenadas dos aminoácidos
Sept5-Fow-NheI Sept5-Rev-XhoI	64 °C	SEPT5NGC	1110	1 a 369
Sept5-GTPase-Fow-NheI Sept5-Rev-XhoI	64 °C	SEPT5GC	987	42 a 369
Sept5-Fow-NheI Sept5-GTPase-Rev-XhoI	60 °C	SEPT5NG	948	1 a 316
Sept5-GTPase-Fow-NheI Sept5-GTPase-Rev-XhoI	60 °C	SEPT5G	825	42 a 316

2.3.2 Expressão e purificação de SEPT5NGC, SEPT5GC, SEPT5NG e SEPT5G recombinantes

Colônias isoladas de *E. coli* Rosetta hospedando o pET28-SEPT5NGC ou pET28-SEPT5GC, pET28-SEPT5NG e pET28-SEPT5G foram utilizadas para indução da síntese das proteínas recombinantes. O procedimento de indução da expressão foi realizado como descrito para a SEPT3NGC e SEPT3GC no item 2.2.3. Após indução as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensão em 20 mL de tampão A (Tris 25 mM, glicerol 5%, pH 7,8).

O procedimento de purificação da septina 5 e suas versões truncadas foi baseado na metodologia estabelecida para septina 4 (68, 110). A purificação das proteínas por cromatografia de afinidade foi realizada em condições não desnaturante a 4 °C. A suspensão celular foi dividida em 4 frações de 5 mL e as células foram rompidas por 15 ciclos de 25 segundos de ultrassonicação intercalados por 35 segundos. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 17.000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. À fração solúvel recolhida em tubo falcon adicionou-se 5 mM de imidazol e a mistura foi aplicada em coluna de cromatografia contendo 2 mL de resina ativada com níquel, Ni-NTA *super flow* (Qiagen) preequilibrada com 5 volumes de tampão A. O extrato protéico foi aplicado à coluna duas vezes e em seguida a resina foi lavada com 20 volumes de tampão A com 10 mM de imidazol. As proteínas recombinantes foram eluídas com 5 ou 10 mL de tampão A com 250 mM de

imidazol. Em todas as etapas foram armazenadas alíquotas para análise em SDS-PAGE 15%. As proteínas purificadas por cromatografia de afinidade a metal passaram por outra etapa cromatográfica com a finalidade de separar agregados protéicos. Volumes de 1 mL das proteínas eluídas da afinidade foram aplicados em coluna cromatográfica de exclusão molecular, Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão A e acoplada a um sistema Äkta purifier (GE Healthcare). A cromatografia foi realizada a um fluxo de 0,5 mL/min, com um volume de eluição de 1,3 volume da coluna e monitorada pela absorbância a 280 e 254 nm. Alíquotas de 1 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 15% e em gel nativo gradiente 8-25 (PhastGel – GE Healthcare) utilizando-se o sistema *PhastSystem* (GE Healthcare).

2.3.3 Alterações realizadas no procedimento de purificação de SEPT5G e SEPT5GC

Com o propósito de obter amostras homogêneas de SEPT5G e SEPT5GC algumas modificações foram realizadas no procedimento de purificação destas proteínas. As modificações concentraram-se principalmente na composição da solução tampão utilizada nas cromatografias. Na Tabela 12 estão descritas as modificações realizadas em cada teste. Após cada teste as amostras foram analisadas em SDS-PAGE 15% e em gel nativo gradiente 8-25 (PhastGel – GE Healthcare).

Tabela 12 - Alterações realizadas na purificação de SEPT5GC e SEPT5G

Teste	Tampão para cromatografia de afinidade	Tampão para cromatografia de exclusão molecular	Coluna
1	Tris 25 mM, Glicerol 5%, pH 7,8	Tris 25 mM, Glicerol 5%, pH 7,8	Superdex 200 Hiload 16/60, refrigerada a 10C
2	Tris 25 mM, Glicerol 10%, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Tris 25 mM, Glicerol 10%, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Superdex 200 HR 10/30
3	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 500 mM, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 500 mM, pH 7,8	Superdex 200 HR 10/30
4	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 100 mM, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 100 mM, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Superdex 200 HR 10/30
5	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 50 mM, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 50 mM, pH 7,8	Superdex 200 HR 10/30
6	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 20 mM, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8.	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 20 mM, pH 7,8	Superdex 200 HR 10/30
7	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 20 mM, 0,1 mM GDP, 1,0 mM MgCl ₂ , pH 7,8, 5 mM β-mercaptoetanol	Tris 25 mM, Glicerol 10%, NaCl 20 mM, pH 7,8, 5 mM β-mercaptoetanol	Superdex 200 HR 10/30

RESULTADOS E DISCUSSÕES



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Duplo híbrido de SEPT1, SEPT5 e SEPT7

3.1.1 Clonagem da sequência codificadora de SEPT5 fusionada ao domínio de ligação ao DNA LexA

O Sistema do duplo híbrido utilizado foi constituído da proteína isca (SEPT1 ou SEPT5 ou SEPT7) fusionada ao domínio de ligação ao DNA LexA (BD-isca) e as presas corresponderam a duas bibliotecas de cDNA fundido ao domínio de ativação da transcrição GAL4 (AD-presas). A varredura foi realizada utilizando-se a cepa L-40 de *S. cerevisiae*, que permite a identificação da interação entre isca e presa pela ativação da transcrição de dois genes repórteres, *LacZ* e *HIS3*.

O primeiro passo para realizar o ensaio do duplo híbrido foi a construção do plasmídeo recombinante pBTM116kan-SEPT5NGC, no qual a ORF que codifica a isca SEPT5 foi inserida de forma a ser expressa fusionada ao BDLexA. Com este objetivo, a sequência codificadora de SEPT5 foi amplificada com oligonucleotídeos específicos e inicialmente inserida no plasmídeo para clonagem de produto de PCR, pTZ57R/T. Após a confirmação da fidelidade da sequência por sequenciamento automático, a sequência codificadora de SEPT5 foi retirada deste plasmídeo, usando endonucleases específicas e inserida por reação de ligação no plasmídeo pBTM116kan. A confirmação da clonagem foi realizada por análise do padrão de restrição dos clones com as endonucleases *EcoRI* e *SalI* e por sequenciamento do DNA. Na Figura 5 é apresentado o resultado da eletroforese em gel de ágarose do DNA de 3 clones após a digestão com as enzimas de restrição nos quais observa-se duas bandas de aproximadamente 1.110 e 5.700 pb, correspondentes a SEPT5 e ao pBTM116kan, respectivamente. Os resultados aqui apresentados referente ao procedimento de clonagem correspondem apenas a SEPT5, pois como já foi mencionado no item 2.1.3 da metodologia, as clonagens da SEPT1 e SEPT7 em pBTM116kan foram realizadas pelos doutorandos Marcel Nakahira e Luis Fernando Reyes, respectivamente.

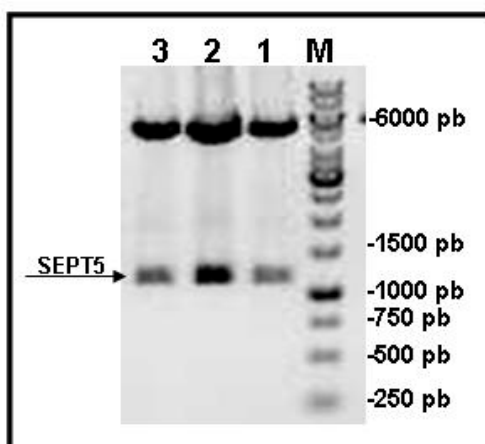


Figura 5 – Confirmação da clonagem de SEPT5 em pBTM116kan. 1, 2, 3 correspondem ao DNA plasmidial de três clones clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*, e M ao padrão em pares de bases.

3.1.2. Testes de autoativação do gene repórter *LacZ* por BD-SEPT1, BD-SEPT5 e BD-SEPT7 em L40

Após obtermos as construções de DNA capazes de produzir as proteínas iscas fusionadas ao BD (BD-isca), as respectivas construções foram utilizadas para a transformação da cepa L40 de *S. cerevisiae*. As colônias transformantes foram selecionadas em meio de cultura SD sem triptofano, visto que o plasmídeo pBTM116 confere auxotrofia a este aminoácido para leveduras com o genótipo Trp^- .

Como o sistema do duplo híbrido é baseado na reconstituição de um fator de transcrição funcional, foi necessário testar a capacidade de autoativação do sistema pela proteína isca fusionada ao domínio de ligação ao DNA. Como descrito na literatura, várias proteínas são capazes de ativar a transcrição quando fusionadas ao domínio de ligação ao DNA. Assim, as bibliotecas de cDNA utilizadas no duplo híbrido não são montadas de forma que os cDNAs estejam fusionados ao BD ao invés do AD, justamente porque aproximadamente 10% de cDNAs gerados aleatoriamente e inseridos em plasmídeos BD tem mostrado a capacidade de autoativar o gene repórter (111). A partir destas observações o teste de autoativação do gene repórter tornou-se etapa crucial no ensaio do duplo híbrido. O teste para autoativação do gene repórter *LacZ* foi realizado por meio do ensaio da β -galactosidase em papel de filtro. A presença de colônias azuis neste teste indica que BD-isca foi capaz de ativar a transcrição e, desta forma, não é apropriada para os experimentos do duplo híbrido. Realizamos o teste de auto-ativação com 3 colônias isoladas de L40 expressando BD-SEPT1,

BD-SEPT5 e BD-SEPT7 e nenhuma apresentou a coloração azul após o contato com o substrato da enzima β -galactosidase, logo as proteínas quiméricas não foram eficientes na ativação da transcrição (Figura 6). Na literatura há relatos apenas da SEPT4 ativando a transcrição e este problema foi contornado deletando o domínio amino-terminal de SEPT4, resultando em SEPT4GC que não apresentou características de fator de transcrição (112).

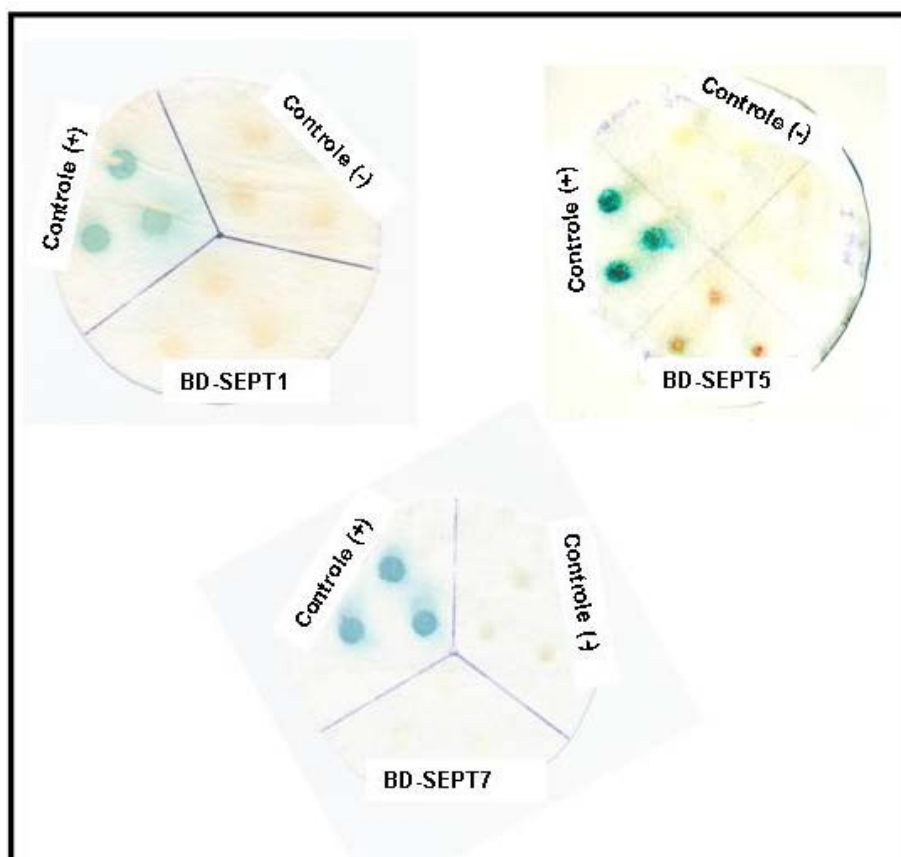


Figura 6 – Teste de autoativação de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 fusionadas ao domínio de ligação ao DNA LexA expressas em *S. cerevisiae*. A coloração azul indica a ativação da transcrição do gene repórter *LacZ*. O controle positivo (+) utilizado foi L40 expressando FEZ1 (1 – 392) fusionada ao domínio de ligação ao DNA de LexA (92); e o controle negativo (-) L40 transformada com o plasmídeo pBTM116-kan.

Confirmado que SEPT1, SEPT5 e SEPT7 não ativavam a expressão β -galactosidase, o próximo passo foi realizar o teste para verificar o escape na expressão do gene repórter *HIS3*. Para este fim colônias isoladas de L40 expressando as BD-iscas foram crescidas em meio SD sem triptofano e histidina, mas com a adição de 3-AT nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 50 mM. O 3-AT é um inibidor competitivo da proteína *HIS3* que converte fosfato glicerol imidazol em fosfato acetol imidazol, um intermediário na rota de

síntese de histidina, desta forma o 3-AT age reduzindo o escape da expressão de HIS3. O objetivo deste experimento é determinar qual a menor concentração de 3-AT na qual o crescimento das colônias não supere 1 mm de diâmetro. Determinar esta concentração de 3-AT foi importante para que na varredura da biblioteca não fosse utilizada uma concentração muito baixa de 3-AT que resultasse em grande número de clones falso-positivos ou, ainda, altas concentrações que eliminassem interações fracas ou moderadas. Nos experimentos descritos neste trabalho, a concentração escolhida foi de 5 mM de 3-AT para o procedimento de triagem das bibliotecas.

3.1.3 Varredura das bibliotecas

As septinas 1, 5 e 7 foram utilizadas como isca na varredura das bibliotecas de cDNA de cérebro fetal e leucócitos humanos por meio do ensaio do duplo híbrido com o propósito de identificar possíveis parceiros protéicos. Na Tabela 13 é apresentada a quantidade total de transformantes obtidos após a transformação de leveduras e acompanhamento do crescimento das colônias por 7 dias. Este número variou de 117 colônias para SEPT1, na biblioteca de leucócitos, a 17 para a mesma isca na biblioteca de cérebro fetal. Estas colônias passaram por várias etapas para eliminação de interações falso-positivas. Inicialmente, estes clones foram submetidos aos testes de ativação da transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela análise do crescimento das mesmas em meio de cultura SD-WLH com 5 mM de 3-AT e do ensaio da β -galactosidase.

As colônias que foram positivas nos dois testes foram crescidas em meio de cultura adequado para que o plasmídeo pACT2, contendo os cDNAs dos possíveis parceiros protéicos das septinas, fossem isolados. Após a propagação destes plasmídeos em bactéria, seguida de purificação, os mesmos foram sequenciados. O sequenciamento conduziu a eliminação de mais clones falso-positivos, nos casos onde a sequência estava fora de fase com o ADGAL4, ou naqueles nos quais os insertos apresentavam tamanho muito reduzido, correspondendo a pequenos peptídeos. Ainda, outros clones foram eliminados porque faziam parte de um grupo de falso-positivos que são frequentemente identificados em ensaios de duplo híbrido, como citocromo oxidase, proteínas ribossomais e proteínas mitocondriais (113). Além disso, alguns insertos não apresentaram homologia com nenhuma sequência conhecida após análise junto ao banco de dados público GenBank. Para finalizar esta

exaustiva etapa de eliminação de falso-positivos foi necessário verificar se realmente a ativação dos genes repórteres era promovida pela interação da septina isca com a presa da biblioteca. Com este propósito realizou-se a cotransformação de L40 com os plasmídeos BD-isca junto com AD-presa, e AD-presa com o plasmídeo pBTM116kan vazio. Nesta etapa, após a realização do teste da β -galactosidase, foram eliminadas as presas que na ausência da proteína isca (SEPT1 ou SEPT5 ou SEPT7) foram capazes de ativar a transcrição do gene repórter, por interagirem com o domínio de ligação ao DNA LexA, presente no pBTM116kan. A importância de todos os testes para eliminação de clones falso-positivos está bem evidente na Tabela 13, na qual pode-se observar que a taxa de exclusão de clones ficou entre 53% para SEPT1 na biblioteca de cérebro fetal e 75% para SEPT5 na biblioteca de leucócitos.

Tabela 13 - Perfil das triagens das bibliotecas de cDNAs com SEPT1, SEPT5 e SEPT7. Quantidades de colônias obtidas e o número de prováveis interações após eliminação dos falso-positivos.

Septina	Cérebro fetal		Leucócitos	
	Colônias	Possíveis interações	Colônias	Possíveis interações
SEPT1	17	8	117	37
SEPT5	31	14	47	12
SEPT7	-	-	75	46

Após análise das sequências de cDNAs dos possíveis parceiros protéicos das septinas 1, 5 e 7 foram construídas as Tabelas 14, 15 e 16, com informações importantes como, a representatividade de uma dada proteína dentro do total de clones identificados, os números de acesso junto ao GenBank e as funções das proteínas na célula. As coordenadas dos aminoácidos que delimitam o fragmento recuperado da proteína presa também estão disponíveis nas tabelas supra citadas. Esta informação é importante, pois nos casos em que as proteínas não foram pescadas inteiras foi possível identificar qual o domínio da presa que interage com a isca. Em uma análise global dos dados, pode-se observar que SEPT1, SEPT5 e SEPT7 tiveram como principais parceiras outras septinas, corroborando com vários dados da literatura que mostram septinas interagindo entre si (50-52). As presas que não foram septinas corresponderam a 13, 27 e 4% para SEPT1, SEPT5 e SEPT7, respectivamente (Figura 7).

Tabela 14 – Proteínas que interagiram com SEPT1 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras

Proteína/abreviação	Números de clones Total/CFH ¹ / LEU ²	Resíduos da proteína (Total e recuperado)	Domínio da proteína recuperado	Número de acesso	Função
Septina 1/SEPT1	03/ - / 03	(372) 1-372	Inteira (NGC)	NM_052838.2	Divisão celular, ciclo celular
Septina 2/SEPT2	02 /01 / 01	(367) 1-367	Inteira (NGC)	BAA09928	Divisão celular, ciclo celular, citocinese
Septina 6/SEPT6	14 / 01 / 13	(491) 1-491	Inteira (NGC)	EAW89857	Divisão celular, ciclo celular
Septina 9/SEPT9	15 / - / 15	(422) 1-422 32-422 77-422 126-422 69-422	Inteira/ domínio GTPase com carboxi- terminal (GC)	NM_001113492	Divisão celular, ciclo celular
Septina 11/SEPT11	03 / 03 / -	(429) 1-429 32-429	Inteira/ domínio GTPase com carboxi- terminal (GC)	NM_018243	Divisão celular, ciclo celular
Septina 4/SEPT4	01 / - / 01	(459) 78-459	domínio GTPase com carboxi-terminal (GC)	NM_080416	Divisão celular, ciclo celular, regulação da apoptose
Septina 5/SEPT5	01 / - / 01	(369) 18-369	domínio GTPase com carboxi-terminal (GC)	NM_002688	Ciclo celular, citocinese, regulação da exocitose, endereçoamento de vesículas
Isoforma 1 da proteína 2 associada ao cinetócoro e fuso/SkaI	01 / - / 01	(121) 1 - 121	Inteira	NM_182620	Manutenção da placa da metáfase e/ou silenciamento do <i>checkpoint</i> do fuso
Proteína associada ao centríolo /CEP110	02 / - / 02	(994) 660-994 567-994	Domínio carboxi- terminal	AF083322	Maturação do centrômero
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2I/Ubc9/ E1 SUMO-ligase</i>	03/ 03/ -	(158) 1-158 7-158	Inteira	NM_003345	Regulação de processos metabólicos de proteínas, ciclo da ubiquitina

¹Cerébro Fetal Humano (em vermelho)

²Leucócitos(em azul)

Tabela 15 - Proteínas que interagiram com SEPT5 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras

Proteína/abreviação	Números de clones Total/CFH¹/ LEU²	Resíduos da proteína (Total e recuperado)	Domínio da proteína recuperado	Número de acesso	Função
Septina 2/SEPT2	01 / - / 01	(367) 1-367	Inteira	BAA09928	Divisão celular, ciclo celular, citocinese
Septina 5/SEPT5	01 / 01 / -	(369) 1-369	Inteira	NM_002688	Ciclo celular, citocinese, reregulação da exocitose , endereçamento de vesículas sinápticas
Septina 6/SEPT6	08 / 01 / 07	(491) 1-491	Inteira	EAW89857	Divisão celular, ciclo celular
Septina 8/SEPT8	06 / 06 / -	(429) 1-429	Inteira	NM_015146	Divisão celular, ciclo celular, secreção granular em plaquetas
Septina11/SEPT11	03 / 03 / -	(429) 1-429	Inteira	NM_018243	Divisão celular, ciclo celular
<i>sorting nexin 6/SNX6</i>	01 / - / 01	(406) 307-406	Domínio de dimerização carboxi-terminal	AAD27829	Trafego intracelular
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E21/Ubc9/ E1 SUMO-ligase</i>	06 / 03 / 03	(158) 1-158 7-158	Inteira	NM_003345	Regulação de processos metabólicos de proteínas, ciclo da ubiquitina

¹Cerébro Fetal Humano (em vermelho)

²Leucócitos(em azul)

Tabela 16 - Proteínas que interagiram com SEPT7 identificadas pela varredura com o sistema do duplo híbrido em leveduras

Proteína/abreviação	Números de clones Total/CFH ¹ /LEU ²	Resíduos da proteína (Total e recuperado)	Domínio da proteína recuperado	Número de acesso	Função
Septina 1/SEPT1	01 / - / 01	(372) 12-218	Domínio amino-terminal com GTPase	NM_052838.2	Divisão celular e ciclo celular
Septina 6/SEPT6	10 / - / 10	(491) 90- 491 1-491, 4-491, 3-491	Inteira Domínio GTPase com carboxi-terminal	EAW89857	Divisão celular e ciclo celular
Septina 9/SEPT9	33 / - / 33	(422) 1 - 422 117-422, 77-422 126-422, 32-422 95-422, 69-422	Inteira, Domínio GTPase com carboxi-terminal	NM_001113492	Divisão celular e ciclo celular
<i>ralA binding protein</i> I/RALBP1	02 / - / 02	(655) 511-655	Domínio carboxi-terminal	NM_006788.3	Regulação da atividade GTPase e transporte

¹Cerébro Fetal Humano (em vermelho)

²Leucócitos(em azul)

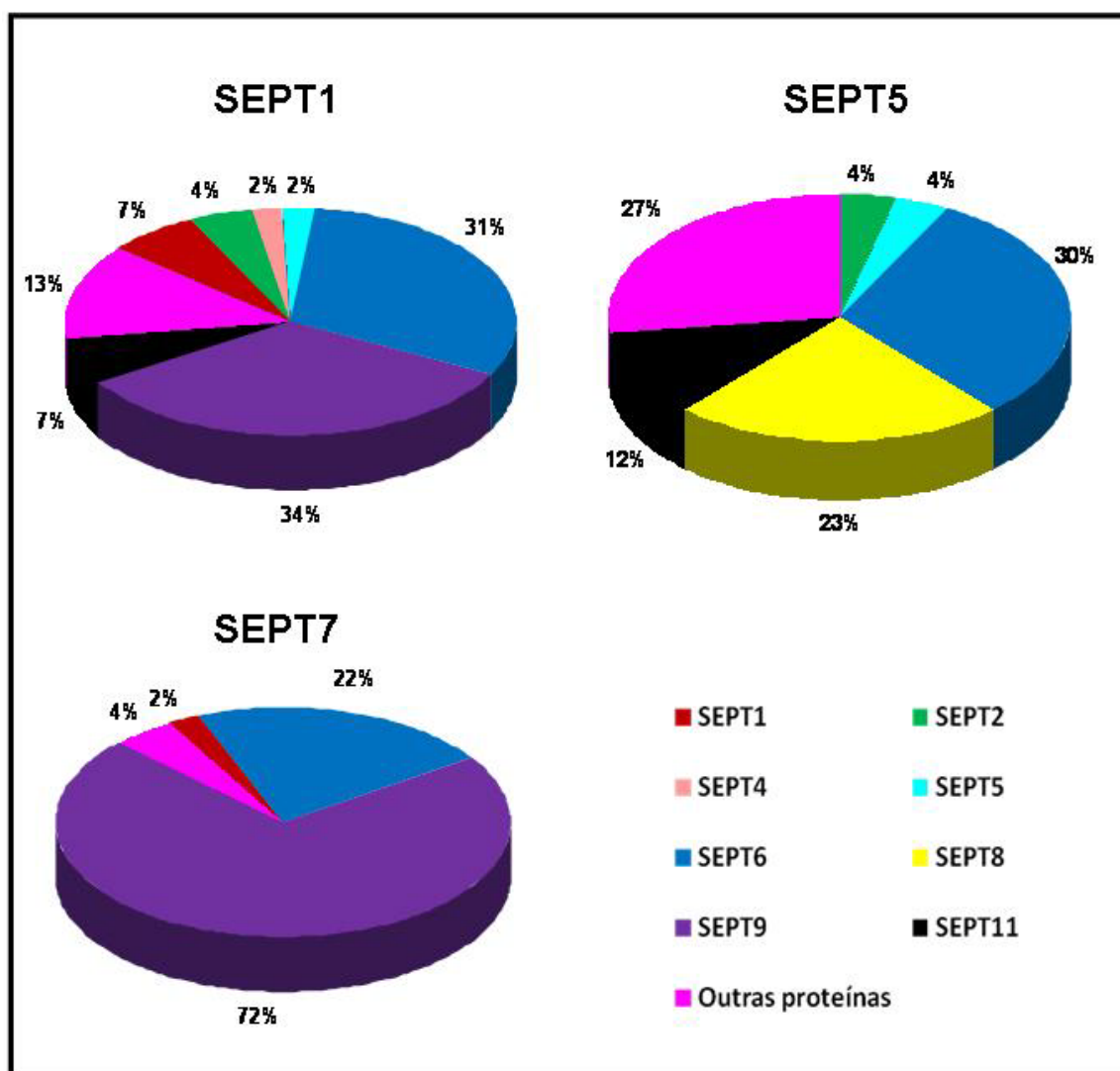


Figura 7 – Representação gráfica dos parceiros protéicos de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 identificados através do duplo híbrido

3.1.4 Interações entre septinas

Nas Tabelas 14, 15 e 16 pode-se observar que as proteínas presas correspondentes às septinas encontram-se com sua composição estrutural completa (NGC) ou foram recuperadas nas formas GC ou NG, faltando um dos domínios flanqueadores do domínio GTPase, mas nunca este último. A presença do domínio GTPase (G) sugere que este domínio seja essencial para a interação entre septinas, da mesma forma que foi observado na estrutura cristalográfica do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 e do dímero SEPT2-SEPT2 (46).

Analisando os dados da Figura 7, verifica-se que cada septina isca teve uma septina preferencial: para SEPT5 foi a SEPT6, correspondendo a 30% das presas, e para SEPT1 e SEPT7 foi a SEPT9 em um total de 34 e 72%, respectivamente. Continuando a análise neste sentido, pode-se observar também que SEPT6 como presa interagiu com as três iscas, sendo o principal parceiro no caso de SEPT5 ou o segundo para SEPT1 e SEPT7. Além disso, os resultados apresentados na Figura 7 e na Tabela 17 ilustram bem que as iscas tiveram como principais parceiras septinas pertencentes a grupos distintos ao seu na classificação: grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10 e SEPT11), grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5) e grupo IV (SEPT7 e SEPT13) (Figura 2, item 1.3). Assim, SEPT7 como isca interagiu com os grupos I, II e II, mas não com septinas pertencentes ao seu grupo (IV). Já as SEPT1 e SEPT5 integrantes do grupo III, apesar da preferência pelas septinas dos grupos I e II, apresentaram algumas associações com septinas do seu grupo. A septina 5 com 89% de parceiros, concentrou as associações no grupo II. A SEPT7 interagiu quase que exclusivamente com a SEPT9 do grupo I (75%), e SEPT1 ao contrário de SEPT5 e SEPT7 teve a maior parte de seus parceiros entre os grupos I e II, com 38% e 44%, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17– Perfil das interações de SEPT1, SEPT5 e SEPT7 com cada grupo de septinas humanas. Em vermelho está destacado o grupo em que as septinas iscas são classificadas.

PRESA	ISCA		
	SEPT1	SEPT5	SEPT7
Grupo I	38%	0%	75%
Grupo II	44%	89%	23%
Grupo III	18%	11%	2%
Grupo IV	0%	0%	0%

A preferência por septinas de grupos diferentes ao da isca nos reporta ao clássico complexo de septinas humanas e as regras de Kinoshita para interações entre septinas (45, 46, 48). Recordando as regras, Kinoshita propõe que as septinas tendem a interagir com septinas de grupos diferentes; e septinas do mesmo grupo poderiam substituir suas parceiras de grupo dentro do complexo formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7. Neste complexo as septinas pertencem a três dos quatro grupos de septina de mamíferos e estão dispostas como um hexâmero composto por duas unidades de cada septina (Figuras 3, item 1.4 e Figura 8A).

Segundo a proposta de Kinoshita, SEPT2 poderia ser substituída por qualquer septina do grupo III, SEPT6 por qualquer um dos componentes do grupo II e SEPT7 apenas por SEPT13. Seguindo este raciocínio, a SEPT5 substituiria a SEPT2 neste filamento (Figura 8C) e poderia interagir com qualquer integrante do grupo II. Os dados obtidos neste trabalho confirmam esta proposta, visto que SEPT5 teve como principais parceiros as septinas 6, 8 e 11 (Figuras 7). Dando continuidade à análise, SEPT5 não pescou SEPT7 como presa, resultado este esperado, já que no complexo não haveria um contato direto entre elas.

Pensando que septinas tendem a interagir apenas com septinas de grupos diferentes para formar as estruturas filamentosas, seria difícil explicar a interação observada entre SEPT5 e SEPT2. Tendo em vista o centro do hexâmero de septinas na Figura 8A, temos um dímero de SEPT2 que poderia ser substituído pelo dímero de qualquer septina do grupo III. Pode-se especular que nesta posição seria possível ter um heterodímero de septinas do mesmo grupo, visto que tem-se a interação entre duas septinas iguais, ou seja, do mesmo grupo. Esta suposição é fundamentada nas interações heterodiméricas entre septinas do mesmo grupo que já foram relatadas na literatura, sendo um dos exemplos a interação supracitada, SEPT2-SEPT5 (114). Porém, o fato de ter sido pescada apenas uma interação com SEPT2 usando a isca SEPT5 não permite descartar a hipótese de artefato. De qualquer modo, a maior parte das interações detectadas para SEPT5 estão de acordo com as observações de Kinoshita e com a estrutura do complexo.

Para a isca SEPT1 o raciocínio é o mesmo, pois tanto SEPT1 como SEPT5 são integrantes do grupo III e SEPT1 interagiu com todas as septinas deste grupo, além disso, interagiu com septinas do grupo II (Tabela 17 e Figura 8B). A SEPT1 da mesma forma que ocorreu com SEPT7 apresentou uma forte tendência a interagir com a SEPT9 do grupo I, o que levanta a questão de como tal grupo faria parte destas estruturas. Alguns complexos já foram identificados em que septinas deste grupo estavam presentes, SEPT7-SEPT11-SEPT9 e SEPT7-SEPT3-SEPT5 (50-52). Comparando as substituições em relação ao complexo SEPT7-SEPT6-SEPT2, pode-se dizer que o grupo I poderia substituir tanto as septinas do grupo II quanto as do grupo III, o que vai de encontro aos resultados obtidos. SEPT9 foi identificada como parceira de SEPT7 e SEPT1, no primeiro caso estaria substituindo septinas do grupo II e, no segundo, septinas do grupo III (Figura 9). Deve-se considerar que apesar das substituições aqui sugeridas para as septinas do grupo I terem sido baseadas no complexo 7-6-2, vários estudos complementares ainda são necessários para sua validação. Considerando os resultados apresentados por Kagata e colaboradores, referente a identificação do complexo 7-9-11, nos quais também demonstram, por ensaios de *pull down*, as interações diméricas

SEPT7-SEPT9, SEPT9-SEPT11 e SEPT7-SEPT11, fica evidente que dentro da estrutura trimérica pode ocorrer várias combinações entre as septinas 7, 9 e 11 (52). Com relação à associação de SEPT7 com SEPT6, esta só vêm mais uma vez solidificar os dados da estrutura cristalográfica, 2-6-7 (46).

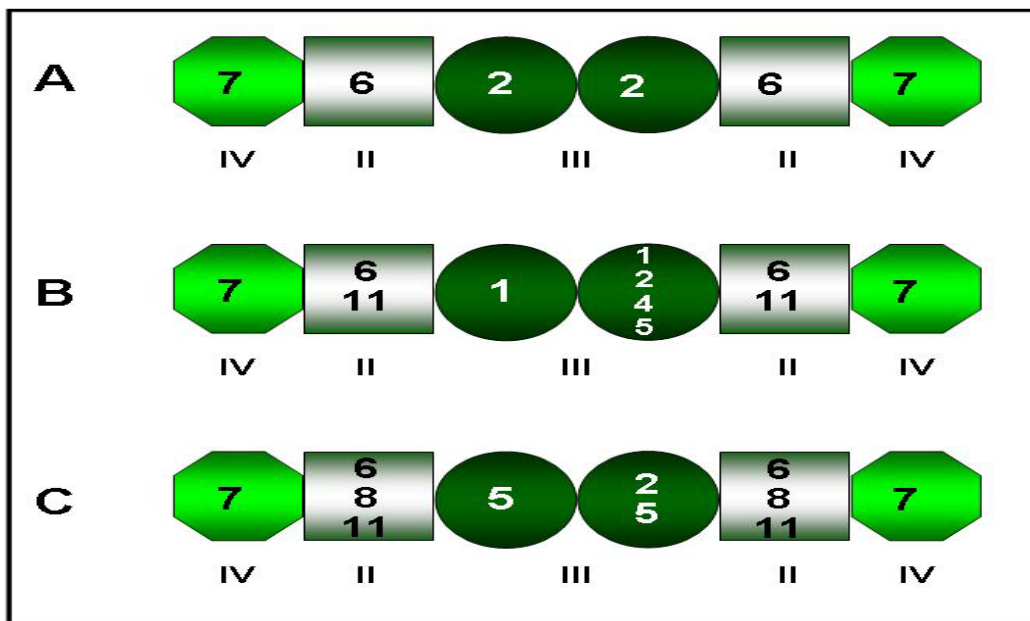


Figura 8 - Esquema ilustrativo de possíveis hexâmeros de septinas dos grupos II, III e IV formados por SEPT1 e SEPT5 com suas parceiras identificadas através do duplo híbrido. Em A, hexâmero das septinas humanas SEPT2, SEPT6 2 e SEPT7. Em B e C, combinações de septinas para a formação de hexâmeros baseado nas septinas que interagiram com SEPT1 e SEPT5, respectivamente. Em algarismo romano estão identificados os grupos a quais as septinas pertencem.

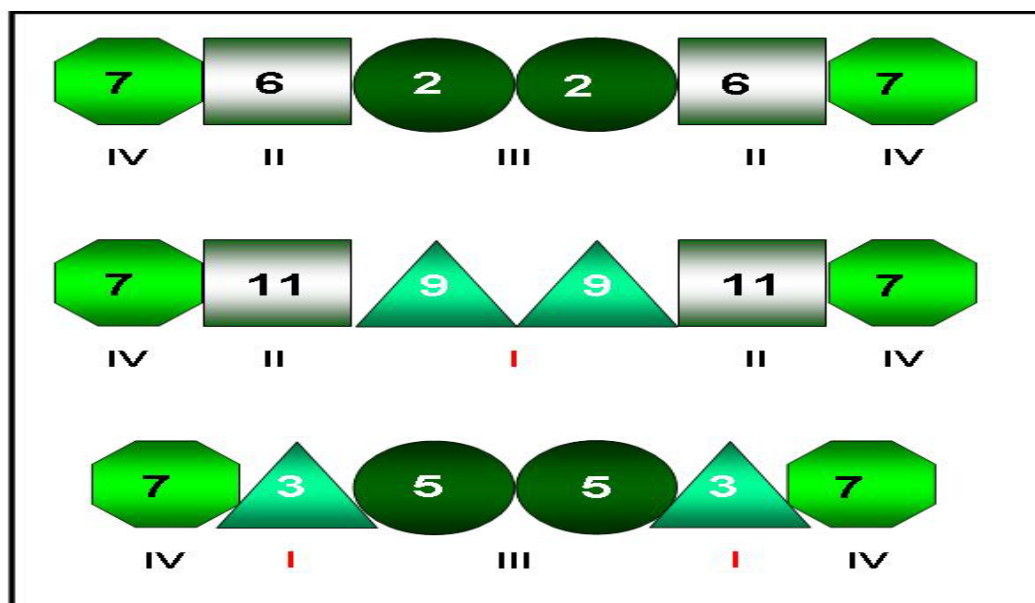


Figura 9 - Esquema ilustrativo de possíveis distribuições das septina nos complexos SEPT7-SEPT9-SEPT11 e SEPT3-SEPT5-SEPT7 baseado no hexâmero 7-6-2-2-6-7. Em algarismo romano estão identificados os grupos a quais as septinas pertencem.

Os complexos trímericos de septinas de mamíferos não são únicos; composições diméricas têm sido identificadas também, como por exemplo, SEPT4-SEPT8, SEPT5-SEPT11, SEPT5-SEPT8, SEPT6-SEPT12, SEPT11-SEPT12, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro* (63, 115-118). Os dímeros de septinas abrem um grande leque de possibilidades de associações entre septinas deixando evidente que pouco se sabe sobre a complexidade dessas moléculas.

Outra evidência que dá suporte à fidelidade das interações identificadas foi a reciprocidade observada quando algumas septinas obtidas como presas (SEPT6, SEPT8 e SEPT9) neste trabalho foram usadas, por outros estudantes do projeto do “interactoma das septinas”, como iscas e pescaram as septinas aqui apresentadas como iscas. Por exemplo, a SEPT6 como isca pescou SEPT1, SEPT5 e SEPT7; a SEPT8 pescou a SEPT5 e finalmente SEPT9 resgatou a SEPT7 como presa (artigo em fase de publicação).

3.1.5 Parceiros protéicos diferentes de septinas

Embora SEPT1, SEPT5 e SEPT7 apresentaram uma evidente preferência por septinas como parceiros protéicos, nós encontramos outros parceiros que funcionalmente estão envolvidos na manutenção da placa na metáfase, na maturação do centrômero, no tráfego intracelular, na regulação de processos metabólicos de proteínas e na regulação da atividade GTPásica (Tabelas 14, 15 e 16).

SEPT1 resgatou duas proteínas envolvidas na divisão celular, a isoforma 1 da proteína 2 associada ao cinetócoro e fuso (SkaI) e uma proteína que se encontra associada ao centríolo (CEP110), sendo que estas proteínas representaram 13% das interações de SEPT1. O centróssomo é o maior centro organizador de microtúbulos em várias células de vertebrados e tem sido relacionado a organização dos fusos na mitose e, na interfase, ele organiza arranjos de microtúbulos que servem como trilhos para o transporte de proteínas, organelas e cromossomos; além de estarem envolvidos na polarização celular e na formação de cílios e flagelos (119, 120). A proteína CEP110 foi identificada como integrante do centróssomo por meio de varredura de uma biblioteca de expressão utilizando-se um soro humano contendo anticorpos contra o centróssomo (121). Análises de imunolocalização de CEP110 durante o ciclo celular sugerem que a distribuição de CEP110 dependente do ciclo celular é única, quando comparada com outras proteínas do centróssomo. Ela é detectada no centróssomo em

G1, no entanto, após a duplicação do centrossomo e separação CEP110 é observada em associação com um dos centrossomos, provavelmente o parental. Este padrão persiste até o início da prófase, momento em que CEP110 é detectada também no segundo centrossomo. Enquanto muitas proteínas centrossomais acumulam-se nos centrossomos com a aproximação da mitose, CEP110 quase desaparece e reaparece com a transição da telófase para G1. A distribuição distinta de CEP110 conduz a especulações que esta proteína atue na organização precoce e na maturação dos centrossomos. Dados obtidos por outros autores conduzem a mesma suposição, pois CEP110 foi encontrada junto com a proteína nineína em pontos do centrossomo associados a sua maturação (122).

A proteína SkaI está envolvida na divisão celular atuando na manutenção da placa na metáfase e/ou no silenciamento do ponto de checagem (*checkpoint*) de montagem dos fusos (123). Hanisch e colaboradores demonstraram que SkaI localiza-se no cinetócoro e em fusos mitóticos, além de se associar a Ska2, formando um complexo protéico associado ao cinetócoro. Análises da depleção do complexo Ska em células Hela S3 indicaram que este complexo não foi necessário para a estrutura global do cinetócoro, no entanto, observou-se que ocorreu um atraso na mitose, apesar dos cromossomos já se encontrarem alinhados na metáfase. Uma interpretação para este fenótipo foi que as células foram ineficientes em manter uma associação estável entre os microtúbulos do fuso e o cinetócoro, simultaneamente não satisfazendo o *checkpoint* de montagem dos fusos. Na tentativa de elucidar qual o papel do complexo Ska na segregação dos cromossomos Welburn e colaboradores demonstraram que o complexo Ska é um componente direto da interface cinetócoro-microtúbulo (124). Este complexo exibe várias características que sugerem um papel importante na junção do movimento do cromossomo com a depolimerização dos microtúbulos, incluindo a dupla localização dos cinetócoros para os microtúbulos do fuso durante a mitose, característica fundamental para adequada segregação dos cromossomos. Além disso, este complexo possui uma atividade de ligação direta nos microtúbulos, com a formação cooperativa de oligômeros sobre os microtúbulos, os quais foram capazes de movimentar-se durante a depolimerização dos microtúbulos (124).

As funções as quais SkaI e CEP110 estão envolvidas nas células fazem destas proteínas dois alvos de grande interesse para a caracterização da interação com SEPT1, visto que septinas há muito tempo são relacionadas com os processos de divisão celular. No início com a confirmação da presença do complexo de septinas de leveduras no septo promovendo a separação de células mãe e filha; em seguida, quando funções similares foram observadas com septinas de *Drosophyla* e *C. elegans* nos sulcos de clivagem e, finalmente, quando

septinas humanas foram identificadas interagindo diretamente com proteínas envolvidas em diferentes etapas do ciclo celular (9, 41, 53, 76, 125). Por exemplo, SEPT9 localiza-se em microtúbulos, no sulco de clivagem e em diversos estágios da mitose sugerindo importantes funções para SEPT9 na segregação dos cromossomos e/ou na conclusão da divisão celular por afetar a formação, desmontagem ou a dinâmica do fuso mitótico (59). Outros trabalhos relacionam SEPT2, SEPT6 e SEPT7 com a segregação de cromossomos por interagir com CENP-E (Proteína E associada ao centrômero) (53, 54). Os autores sugerem que as septinas de mamíferos formam um andaime no centro do plano do fuso mitótico que coordena vários passos importantes na mitose. Primeiro na metáfase este andaime seria requerido para a manutenção de CENP-E nos cinetócoros e conseqüentemente para a congregação dos cromossomos. Em segundo, as septinas estariam envolvidas indiretamente na regulação do tempo da segregação do cromossomo, porque a manutenção de CENP-E nos cinetócoros é crítica para a ativação do *checkpoint* mitótico. E finalizando, durante a anáfase, o andaime de septinas permaneceria dentro do fuso central, onde seria requerido para a segregação dos cromossomos e alongação do fuso. CENP-E é uma proteína motora, uma cinesina mitótica, requerida para a ligação estável do cinetócoro em microtúbulos do fuso. Deleções em CENP-E resultam em um alinhamento inapropriado dos cromossomos e perda da manutenção do *checkpoint* mitótico (126). Finalmente, algumas evidências já haviam criado esta ponte entre SEPT1 e a segregação de cromossomos, quando Qi e colaboradores identificaram SEPT1 como substrato da serina/treonina quinase Aurora-B, uma quinase requerida para segregação dos cromossomos e citocinese (76). A interação entre SEPT1 e aurora-B foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*, onde ambas as proteínas se localizaram no sulco de clivagem durante a telófase e a citocinese, e SEPT1 foi fosforilada por aurora-B em vários sítios. Apesar de precisarem ser experimentalmente validados, estes dados permitem propor que a dinâmica de montagem e desmontagem de septinas pode ser regulada por aurora-B como ocorre com outras proteínas de filamentos intermediários (por exemplo, vimentina). Outro dado animador em relação a Ska1, possível parceiro protéico aqui mencionado para SEPT1, é que a quinase aurora-B fosforila a proteína Ska3 durante a mitose e Ska3 tem o papel de coordenar a cooperatividade da formação dos oligômeros de Ska1 ao longo dos microtúbulos do fuso (127, 128).

Tanto SEPT1 quanto SEPT5 tiveram como principal parceiro protéico não septina a enzima conjugadora de ubiquitina E2 (UBE21/Ubc9), proteína homóloga a Ubc9 de leveduras também conhecida como E1 SUMO-ligase. SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*) são proteínas estruturalmente relacionadas com a ubiquitina e que se liga covalentemente a resíduos de lisina das proteínas substratos, em um processo de três etapas similar ao que

envolve a ubiquitinação de proteínas. A sumoilação se inicia quando a SUMO é ativada por uma enzima ativadora-E1 seguida por sua transferência para a enzima conjugadora-E2, finalizando com SUMO sendo transferida da enzima conjugadora-E2 para o substrato protéico (129). Ubc9 é uma enzima conjugadora-E2, que reconhece o substrato e catalisa a ligação entre a glicina 97 de SUMO e um resíduo de lisina do substrato, por essa razão é um regulador chave da sumoilação. A sumoilação é um processo dinâmico que comumente não resulta em degradação de proteínas, mas aumenta a estabilidade de proteínas e é importante na localização subcelular de proteínas. Diferente da ubiquitinação, um motivo consenso, Ψ KXE/D, tem sido identificado para sumoilação. O símbolo Ψ representa um resíduo hidrofóbico e X corresponde a qualquer aminoácido. Análises de sequências de proteínas têm mostrado que nem todas as proteínas que possuem este motivo são sumoiladas, indicando que deve existir algum mecanismo de regulação (130, 131). Desde a sua descoberta em 1966, a SUMO tem sido encontrada ligada a várias proteínas que participam de diversos processos celulares, como transcrição, reparo do DNA, transporte nuclear, transdução de sinal, e o ciclo celular (131). Estudos genéticos em organismos modelos têm relacionado SUMO com a dinâmica dos cromossomos, ilustrando assim a diversidade das funções desta proteína. Algumas generalizações são feitas em relação ao efeito da ligação de SUMO ao substrato, por exemplo, SUMO alteraria a interação do substrato com outras macromoléculas; em interações proteína-proteína frequentemente ela promove a montagem de vários complexos multi-protéicos.

A sumoilação em septinas já foi mostrada por Johnson e colaboradores quando identificaram as septinas de leveduras, CDC3, CDC11 e Shs1/Sept7 entre as proteínas mais sumoiladas durante a divisão celular (132). Eles identificaram uma sequência consenso, (IVL)KX(ED), nestas septinas, na qual mutações resultaram na eliminação da maioria de SUMO associada ao septo. Células mutantes para este consenso apresentaram defeitos na desmontagem dos anéis de septinas, resultando no acúmulo de anéis de septinas como marcadores de sítios prematuros da divisão. Desta forma, a ligação de SUMO em septinas de leveduras tem um papel importante na regulação da dinâmica dos anéis de septinas durante a divisão celular. Em outro trabalho, Johnson e Gupta identificaram a proteína Siz1 como uma proteína que auxilia a ligação de SUMO a septinas de leveduras estimulando acentuadamente a sumoilação de septinas *in vitro* (133). A fim de analisar se SEPT1 e SEPT5 possuem sítios de sumoilação nós submetemos as sequências destas proteínas à análise no programa SUMOplot™ Prediction disponível na web. Na tabela 18 apresentamos o resultado desta análise onde foram identificados 3 prováveis sítios de sumoilação em SEPT1 e SEPT5. Os

sítios abaixo listados foram os determinados pelos parâmetros do programa como os que apresentam alta probabilidade de serem sumoilados, outros sítios foram identificados, mas com baixa probabilidade de serem alvos para SUMO. A identificação de Ubc9 como parceira protéica de SEPT1 e SEPT5, somada aos relatos referente a sumoilação de septinas de leveduras e a presença de sítios preditos de sumoilação em SEPT1 e SEPT5 são fortes evidências que a sumoilação é uma modificação pós-traducional envolvida na regulação das funções de septinas em humanos, pelo menos com relação a SEPT1 e SEPT5.

Tabela 18 – Identificação de possíveis sítios de sumoilação em SEPT1 e SEPT5 por meio do programa SUMOplot™ Prediction

Septina	Posição do resíduo de lisina (K)	Motivo	Score
SEPT1	K192	L <u>K</u> EE	0.91
	K21	V <u>K</u> KG	0.76
	K171	G <u>K</u> AD	0.67
SEPT5	K348	M <u>K</u> DE	0.80
	K190	A <u>K</u> AD	0.79
	K40	V <u>K</u> KG	0.76

SEPT5 também teve como parceira protéica a SNX6, *sortin nexin 6*. SNX6 pertence a uma grande família de proteínas caracterizadas pela presença de um domínio homólogo a *phox*, o SNX-PX, que integra um subgrupo da grande família dos domínios PX (134). As SNXs têm sido identificadas desde leveduras, com 10 representantes, à mamíferos com 33 representantes. Em todas as SNXs estudadas, o domínio SNX-PX atua como um motivo de ligação a fosfato de fosfatidilinositol (PtdInsPs), auxiliando na marcação destas proteínas para membranas ricas nestes lipídeos. Além do domínio SNX-PX estas proteínas possuem uma variedade de domínios de interação proteína-proteína, motivos estes que podem participar da sua localização subcelular ou na sua habilidade de formar complexos em membranas enriquecidas com PtdInsPs (135). As SNXs estão envolvidas na regulação do tráfego intracelular da rota endocítica, em etapas como a triagem e sinalização endossomal. Alguns autores sugerem que SNX6 regula a função do oncogene Pim-1, da proteína de tumor controlada transducionalmente (TCTP) e de alguns integrantes da família de receptores treonina/serina quinase de fatores de crescimento TGFβ (136). Em relatos mais recentes, Wassmer e colaboradores mostraram que SNX6 e SNX5 são potenciais componentes do retrômero de mamíferos (137). O retrômero é um complexo protéico que se associa com a

face citosólica do endossomo e medeia o transporte retrógrado de proteínas transmembranas do endossomo para a rede trans-Golgi. A interação de SEPT5 e SNX6 é biologicamente relevante visto que, várias outras proteínas que têm sido descritas interagindo com septinas são relacionadas para o tráfego intracelular e ou endocitose (59, 79).

Finalizando, o único parceiro protéico de SEPT7 diferente de septinas foi a RalBP1, *ralA binding protein 1*, também conhecida como RLIP76, RIP1 e citocentrina. RalBP1 é expressa ubiquamente no corpo humano e foi originalmente identificada exibindo uma atividade ATPase dependente do conjugado dinitrofenil-S-glutationa (DNP-SG ATPase) (138). Mais tarde, RalBP1 foi clonada como uma proteína que se liga a RalA, sendo que, esta ligação só ocorre quando RalA se encontra na forma RalA-GTP e por meio do domínio efetor de RalA (139, 140). RalBP1 possui um domínio GAP (proteína ativadora de GTPase) homólogo ao GAP Rho/Rac e sua atividade GAP tem sido demonstrada para proteínas G Rho/Rac (139, 141, 142). Desde que a atividade ATPase DNP-SG foi mostrada, vários estudos tem apontado a importância da função de transportador para RalBP1, especialmente de agentes quimioterápicos, drogas antiepilépticas, conjugados eletrofilicos, entre outros. RalBP1 é considerada um transportador dependente de ATP distinto dos transportadores ABC e não apresenta nenhum aparente domínio transmembrana ou o clássico domínio *Walker*. Além de atuar como um transportador, RalBP1 também atua como um regulador de várias proteínas de respostas a estresses; em condições fisiológicas normais ela é encontrada na forma de um complexo com Hsf-1 (*heat shock factor-1*), tubulina, HSP90 e Ral. HSP90 e Hsf-1 são liberadas deste complexo em resposta a injúria por radiação e químicos a qual resulte em estresse oxidativo e RalBP1 parece controlar a liberação de Hsf-1. Várias outras funções são atribuídas a RalBP1 que a fazem uma proteína multifuncional. Por exemplo, ela desempenha uma função, ainda não conhecida, na endocitose de uma variedade de receptores tais como, o fator de crescimento epidérmico (EGF), a transferrina, a insulina, entre outros. A ligação de RalBP1 a proteína reguladora do ciclo CDK1 (Cdc2) é importante para a finalização de mitose, e Cdc2 também tem um efeito inibidor na função de transportador de RalBP1. A inibição é atribuída ao fato que após ligar ao complexo (RalBP1, Cdc2 e ciclina), RalBP1 dissocia da membrana para funcionar como um motor no movimento do fuso na mitose (143-145).

Para muitas GTPases, a taxa de conversão da forma ativa ligada a GTP para a forma inativa ligada a GDP envolve a assistência de outras proteínas, como as GAP (proteína ativadora de GTPase) e as GEF (fator de troca do nucleotídeo guanina). As septinas compõem uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo que possuem os motivos GTPase similares

ao da família das Ras GTPases. Devido a sua baixa atividade GTPase intrínseca e lenta taxa de troca GDP-GTP, GTPases Ras requerem GAP e GEF, como fatores adicionais, para promover a atividade GTPase e a troca de nucleotídeo. Vários fatores são descritos na literatura, como o já mencionado RalBP1, mas para septinas são poucos os relatos de fatores associados a elas. Foi observado que mutações na GEF de Cdc42 e nas GAPs RgaI, Rga2 e Bem3 resultam em defeitos na montagem das septinas sugerindo que a montagem do anel de septinas de leveduras no septo é regulada pela GTPase Cdc42 e/ou pelas suas proteínas efetoras (17, 146). Kinoshita e colaboradores mostraram que SEPT2 pode regular a absorção de glutamato mediada por GLAST e que a interação entre GLAST e SEPT2 é dependente da forma SEPT2-GDP. Neste trabalho, os autores sugerem uma atividade GEF para GLAST em relação a SEPT2, postulam que SEPT2-GDP se liga a GLAST inativando-o, e que a ligação de glutamato e/ou algum outro sinal, relacionado a absorção de glutamato, pode elicitar a troca de nucleotídeo de SEPT2, resultando na conversão de SEPT2-GDP para SEPT2-GTP. Desta forma, GLAST pode ser liberado de SEPT2-GTP aumentando sua atividade (42). Em outro trabalho Nagata e Inagaki identificaram uma proteína, a qual nomearam de SA-RhoGEF (*septin-associated RhoGEF*). Esses autores observaram que a expressão transiente de SEPT9 em células COS7 e HeLa inibia a ativação de Rho dependente de SA-RhoGEF e que a expressão de AS-RhoGEF em células REF52 alterava as estruturas filamentosas de septinas endógenas. Estes são os poucos relatos de interações entre GAP e GEF com septinas, e assim, devemos considerar que pouquíssimo se sabe sobre a atividade GTPase das septinas, como ela é regulada e qual a importância para sua função na célula. Desde que se tem conhecimento da baixa atividade GTPase das septinas, especula-se que outras proteínas devam ser necessárias para controlar esta atividade (147). A identificação de parceiros protéicos como GAP e GEF poderá ajudar a completar as lacunas que existem com relação à atividade GTPásica das septinas.

Pode-se especular que alguns dos diversos papéis funcionais de septinas estão intrinsecamente relacionados às suas interações físicas, o que poderia explicar como uma septina pode ter múltiplas funções em diferentes tecidos e em diferentes momentos do ciclo celular e do desenvolvimento. Isto é claramente observado quando analisamos a diversidade de parceiros protéicos já relacionados a septinas.

3.1.6 Análise qualitativa da força das interações

Apesar das interações não terem sido validadas com ensaios *in vitro* ou *in vivo*, há fortes evidências que as mesmas não são escapes da técnica do duplo híbrido, pois em alguns casos a alta representatividade na varredura enfraquece esta hipótese. Foi realizado um ensaio qualitativo visando avaliar a força relativa das interações e dar suporte a veracidade de tais interações. Neste ensaio colônias de leveduras expressando os parceiros protéicos foram submetidas a condições crescentes de estrigência no meio de cultura, aumentando a força seletiva, que neste caso foi à adição de concentrações crescentes de 3-AT no meio de cultura sem histidina. Neste ensaio pode-se avaliar a força da interação pela maior ou menor capacidade da levedura de proliferar sob as condições ensaiadas. Utilizou-se SEPT5-SEPT8 como controle para interação forte, apoiada nos relatos de Martinez e colaboradores que através de ensaios quantitativos da atividade da β -galactosidase igualaram a força da associação entre SEPT5 e SEPT8 com a força da interação entre a proteína p53 e o antígeno-T maior do SV40, conhecida como uma interação forte (97, 148). O ensaio foi realizado com a SEPT5 e seus parceiros protéicos SNX6, SEPT2, SEPT5, SEPT6 e SEPT8. Segundo Van Crieking e Beyaert, pode-se considerar uma interação como forte no sistema do duplo híbrido como sendo aquela que a levedura expressando os parceiros protéicos é capaz de proliferar no meio de cultura sem triptofano com 25 a 50 mM de 3-AT, independente de diluições da cultura; em interações intermediárias a proliferação das leveduras seria numa faixa de 10 a 25 mM de 3-AT e as associações fracas cairiam na faixa de 5 a 10 mM de 3-AT (113).

Considerando estas observações e analisando os resultados apresentados na Figura 10, pode-se confirmar que a interação entre SEPT5-SEPT8 é forte, como já relatado na literatura por Martinez, pois foi a única associação que as células proliferam em todas as concentrações, inclusive a 50 mM de 3-AT. Comparando agora as demais associações com SEPT5-SEPT8, observa-se que as interações entre septinas do mesmo grupo (SEPT5-SEPT2) e a interação homotípica (SEPT5-SEPT5) são as que as forças relativas foram as mais fracas entre as interações aqui analisadas. Mais uma vez, estes dados corroboram com as observações de Martinez, que também mostrou que as forças das interações homotípicas SEPT4, SEPT5 e SEPT8 foram similares a da interação SEPT4-SEPT5 (mesmo grupo), mas ambas foram mais fracas que as interações heterotípicas entre septinas de grupos diferentes (SEPT5-SEPT8). Prosseguindo na análise pode-se sugerir que as interações SEPT5-SEPT5 e SEPT5-SEPT2

são fracas quando comparadas com SEPT5-SEPT8 e a interação entre SEPT5-SEPT6 (grupos diferentes) poderia então ser considerada uma interação intermediária. Estes dados reforçam a proposta sugerida no item 3.1.4, Figura 8, para outros arranjos de septinas baseados nas regras de Kinoshita, na estrutura do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 e nos resultados identificados no duplo híbrido. Os dados da força das interações aqui observadas e as relatadas por Martinez, fortalecem as evidências que as interações mais prováveis de ocorrer para formação das estruturas filamentosas são entre septinas de grupos diferentes. A proposta apresentada que dentro do hexâmero SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Figura 8) a interação central homotípica poderia ser substituída por interações heterotípicas de septinas do grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5) é plausível se for considerado os vários dímeros identificados entre septinas deste grupo pelos integrantes do projeto do interactoma das septinas (dados não publicados) e pelas análises da força das interações, visto que a interação SEPT5-SEPT5 não se mostrou mais forte que a interação SEPT5-SEPT2, sugerindo que não há uma preferência entre elas.

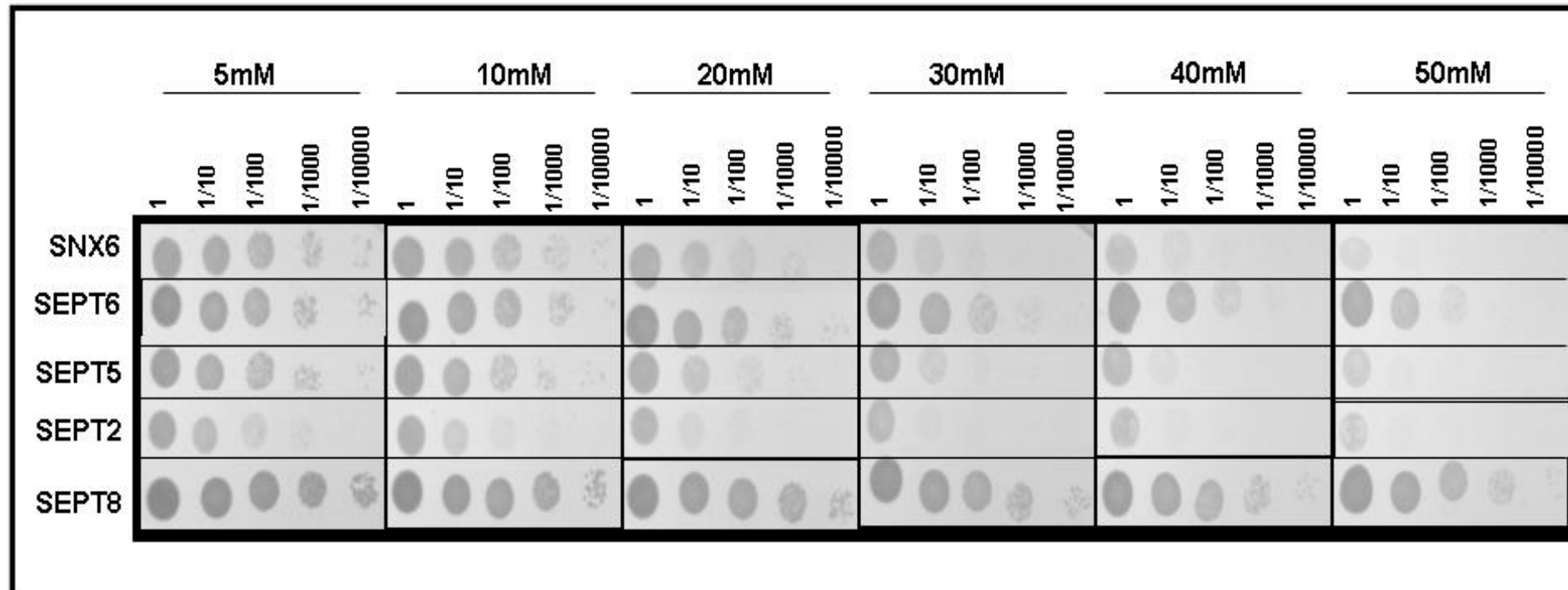


Figura 10 - Análise qualitativa da força das interações. Do lado esquerdo estão identificados os parceiros para quais interações com SEPT5 estão sendo avaliadas. Na parte superior 5 a 50 mM correspondem as concentrações de 3-AT adicionadas ao meio SD-WLH. 1, 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000 correspondem às diluições seriadas das suspensões celulares.

3.2 Caracterização biofísica da septina 3 humana

3.2.1 Clonagem de SEPT3, SEPT5 e seus domínios em plasmídeo de expressão em bactéria

Com intuito de realizar estudos biofísicos e estruturais com a septina 3 humana foi necessário isolar, amplificar e subclonar seu cDNA. O isolamento da sequência (ORF) foi realizado pela técnica de PCR utilizando-se como molde uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano e oligonucleotídeos específicos, baseados na sequência de SEPT3, depositada no GenBank sob o número de acesso NM_019106. O produto amplificado, aproximadamente 1030 pb (SEPT3NGC, 1 a 337 aa) (Figura 11A), foi purificado após eletroforese em gel de ágarose 1% e em seguida inserido em plasmídeo de propagação, pTZ57R/T, permitindo a clonagem direta e a subsequente confirmação da integridade da sequência por sequenciamento. Este clone foi utilizado como molde em PCR para amplificar um fragmento de aproximadamente 898 pb que corresponde a septina 3 sem o domínio amino terminal, SEPT3GC (46 a 337 aa) (Figura 11A). Da mesma forma que foi realizado para SEPT3NGC, o produto de PCR correspondente a SEPT3GC foi purificado e inserido no pTZ57R/T sendo a fidelidade sequencial confirmada por sequenciamento. Com o propósito de subclonar SEPT3NGC e SEPT3GC no vetor de expressão em bactéria, os fragmentos de DNA foram liberados do pTZ57R/T por digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e então foram inseridos no pET28a(+), fundidos a uma sequência codificadora de seis resíduos do aminoácido histidina no amino-terminal. A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento e análise do padrão de restrição dos clones como demonstrado na Figura 11B e 11C.

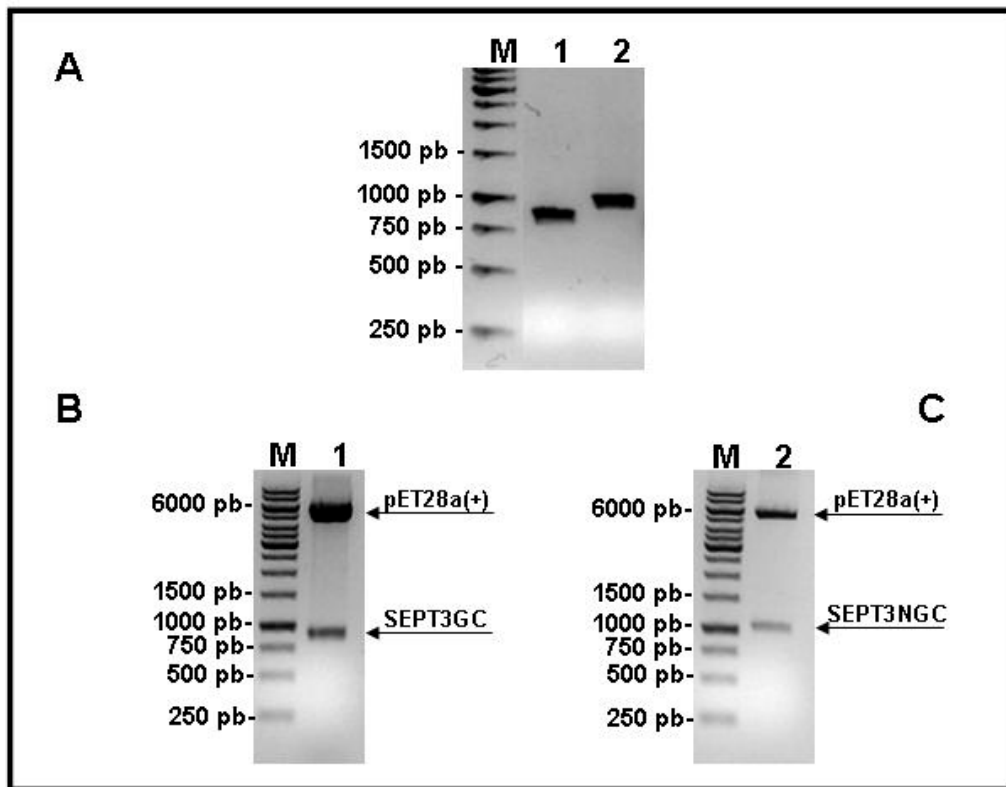


Figura 11 - Análise do padrão de restrição dos clones da septina 3. Em A, produtos da PCR após purificação, 1 e 2 correspondem aos fragmentos de DNA amplificados de SEPT3GC e SEPT3NGC, respectivamente. Em B e C padrão de restrição dos clones de SEPT3GC e SEPT3NGC em pET28a(+) respectivamente, após digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. M corresponde ao padrão em pares de bases.

Os clones pET28-SEPT3NGC e pET28-SEPT3GC foram usados para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta, com a finalidade de expressar as proteínas recombinantes. É importante mencionar algumas características destas proteínas após serem expressas em *E. coli* via clonagem no plasmídeo pET28a(+) (Figura 12).



Figura 12 – Esquema ilustrativo das proteínas recombinantes após expressão em *E. coli*. SEPT3NGC ou SEPT3GC fusionadas ao sítio de reconhecimento para a protease trombina e a cauda de 6 resíduos de histidina no amino-terminal.

Na Figura 12 observamos que, após expressão, as proteínas carregam na região amino terminal um sítio para a protease trombina e uma cauda de seis resíduos de histidina, juntos estes resíduos correspondem a um aumento de 1882,0 Da na massa da proteína. A cauda de histidina tem a finalidade de facilitar a purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade aos metais Ni^{2+} ou Co^{2+} . Esta cauda pode ser retirada ao final do processo de purificação através de digestão com a protease trombina, cujo sítio de reconhecimento está fusionado ao resíduo amino-terminal da proteína de interesse. Após a clivagem pela trombina, a proteína recombinante ainda terá adicionada a sua massa aproximadamente 281,3 Da, correspondente a massa de três resíduos de aminoácido remanescentes. Antes de iniciar os procedimentos de clonagem, ainda nas etapas iniciais de escolha do vetor para clonagem, foi realizada uma análise da estrutura primária da proteína, junto ao programa PeptideCutter, para verificar se dentro da sequência de SEPT3 havia potenciais sítios de clivagem para a protease trombina, e o resultado foi negativo. A fim de obter alguns parâmetros físico-químicos das proteínas, a sequência primária de SEPT3 também foi submetida à análise no programa ProtParam, os dados obtidos são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Características físico-químicas de SEPT3NGC e SEPT3GC recombinantes.

Proteína	Massa Molecular	Ponto isoelétrico (PI)	Coefficiente de extinção (ϵ)¹
SEPT3NGC + 6 x His	40904.7 Da	6.77	28670 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
SEPT3NGC	39022.7 Da	6.42	28670 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
SEPT3GC + 6 x His	35968.8 Da	5.99	27180 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
SEPT3GC	34086.7 Da	6.36	27180 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

¹Coefficiente de extinção para comprimento de onda de 280 nm.

3.2.2 Expressão e purificação de SEPT3NGC e SEPT3GC

A síntese das proteínas recombinantes foi conduzida em *E. coli* Rosetta, a qual possui o gene que codifica a T7 RNA polimerase, sob o controle do promotor *lac*. A indução da síntese das proteínas recombinantes foi realizada de forma indireta, adicionando-se IPTG ao meio de cultura, o qual age sobre o promotor *lac* induzindo a expressão da T7 RNA

polimerase. Esta, por sua vez, reconhece o promotor T7, controlando assim a expressão do gene de interesse. As condições de indução utilizadas foram baseadas na metodologia descrita por Garcia e colaboradores para SEPT4 (68). A expressão foi realizada a 18 °C por aproximadamente 16 horas após adição de 0,2 mM de IPTG, agente indutor.

A dificuldade de trabalhar com as versões das septinas que contém o domínio amino-terminal já era conhecida por trabalhos prévios no laboratório com a SEPT2NGC (dados não publicados), SEPT4NGC (68) e a SEPT5NGC e SEPT5NG (descrito neste trabalho no item 3.3). Assim, os esforços de purificação e estudos estruturais foram centralizados no trabalho com a SEPT3GC. Foram realizados apenas os testes 1 e 2 de purificação com SEPT3NGC (item 2.2.3, Tabela 8). Na Figura 13 é apresentado o perfil cromatográfico e eletroforético de SEPT3NGC em gel nativo gradiente 8-25 (PhastGel – GE Healthcare), permitindo observar que a amostra continha inúmeras formas oligoméricas, com uma clara tendência a agregar, característica esta que é comumente observada nas septinas.

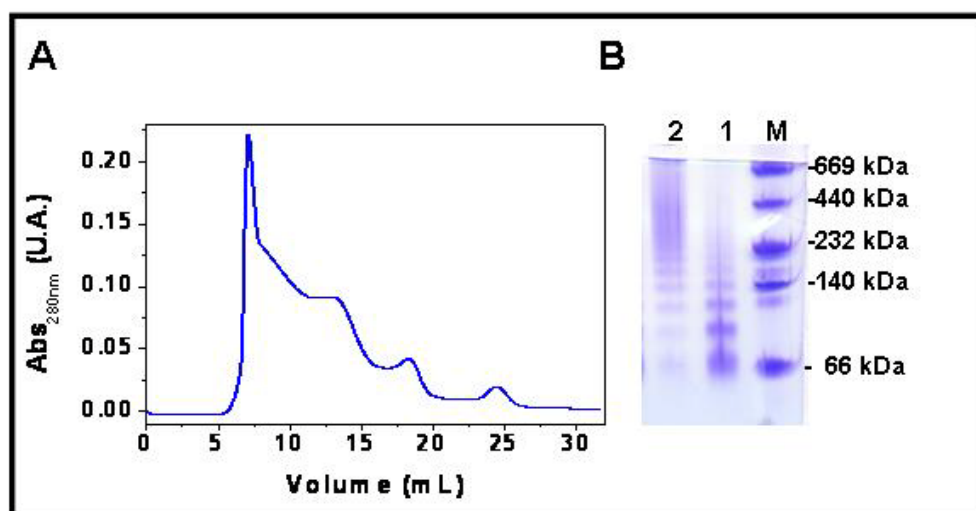


Figura 13 - Perfil cromatográfico e eletroforético em gel nativo de SEPT3NGC. Em A, cromatograma de SEPT3NGC em uma coluna superdex 200. Em B, gel nativo (gradiente 8 – 25%) de SEPT3NGC, 1 corresponde as frações de eluição 10 e 11; e 2 as frações 13, 14 e 15. M, corresponde ao padrão de massa molecular.

A presença de inúmeras formas oligoméricas seria incompatível com algumas análises a ser realizadas como, ITC e ensaios de cristalização. Assim, iniciaram-se os procedimentos de purificação da proteína SEPT3GC. O resultado do primeiro teste de purificação não foi muito animador, pois o perfil eletroforético em gel nativo foi similar ao observado para SEPT3NGC, apresentado na Figura 13. Nesta primeira tentativa, todo o processo de purificação foi realizado numa solução tampão contendo 10% glicerol e 25 mM de Tris, pH

7,8. O segundo teste realizado (Tabela 8, item 2.2.3) foi baseado no melhor resultado obtido para a SEPT5G e SEPT5GC (item 3.3), no qual a principal alteração foi a adição de 20 mM de NaCl e 5 mM β -mercaptoetanol na solução tampão. O resultado foi consideravelmente melhor quando comparado com o 1º teste, sendo que as inúmeras formas oligoméricas foram reduzidas para apenas duas, quando analisadas por eletroforese sob condições nativas (Figura 14B).

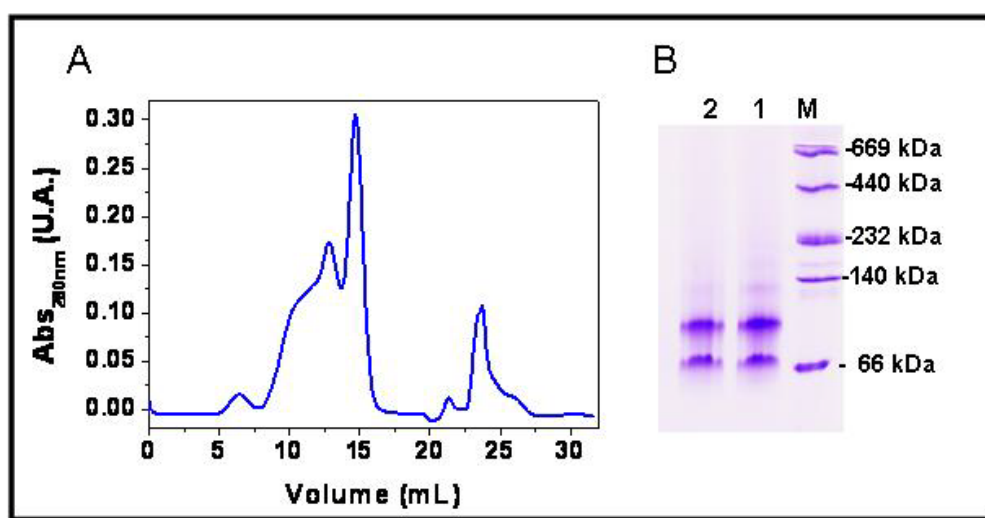


Figura 14 - Perfil cromatográfico e eletroforético em gel nativo de SEPT3GC após 2º teste de purificação. Em A, cromatograma de SEPT3GC em uma coluna Superdex 200. Em B, Gel nativo (gradiente 8 – 25%) de SEPT3GC, 1 corresponde a fração de eluição 15; e 2 a fração 14. M corresponde ao padrão de massa molecular.

A partir deste resultado, iniciou-se testes com diferentes concentrações de NaCl no tampão de purificação de SEPT3GC, aumentando assim a força iônica do meio. Nesta época, já havia sido publicado o artigo sobre a estrutura cristalográfica do complexo hexamérico com as septinas humanas 7-6-2, no qual os autores usaram 500 mM de NaCl na solução tampão para cristalização e, em outro experimento para observar a formação dos filamentos, utilizaram 800 mM de NaCl (46). Considerando os resultados deste trabalho, alterou-se a concentração de NaCl na solução tampão de SEPT3GC para 800 mM e o resultado obtido foi ótimo, pois nesta condição a proteína assumiu apenas uma forma oligomérica. A seguir, experimentos no qual a concentração de NaCl na solução tampão foi gradativamente sendo reduzida foram realizados a fim de determinar a concentração mínima que permitisse realizar as análises estruturais propostas. Na Figura 15 observam-se o cromatograma, e os perfis em SDS-PAGE e em gel nativo de SEPT3GC em solução tampão contendo 300 mM de NaCl, condição na qual foram realizados a maioria dos experimentos, que serão descritos

mais tarde. No cromatograma (Figura 15A) o pico correspondente a SEPT3GC engloba as frações de eluição 14, 15 e 16. A fração 14, na maioria das condições de purificação, era composta por duas formas oligoméricas de SEPT3GC (similar ao demonstrado na Figura 14B), por isso esta fração foi descartada das análises estruturais, as quais foram realizadas apenas com as frações 15 e 16.

A concentração salina foi fator limitante para se estabelecer o limite da concentração protéica que era possível trabalhar de forma a manter a proteína em uma única forma oligomérica. Com a concentração de proteína por volta de 10 μM , a força iônica foi mantida por 150 mM de NaCl. Porém, para concentrações entre 10 a 25 μM de proteína, a homogeneidade da amostra foi mantida apenas na presença de 300 mM de NaCl no tampão. Finalmente, para os ensaios em que a concentração de proteína excedeu 25 μM , concentrações superiores a 400 mM de NaCl no tampão foram necessárias. Outro fator importante para a homogeneidade da proteína em termos de oligômero foi a presença do agente redutor na solução tampão. Em experimentos na ausência do β -mercaptoetanol observou-se heterogeneidade em termos de formas oligoméricas. O rendimento de SEPT3GC purificada foi estimado em aproximadamente 20 mg/L de cultura

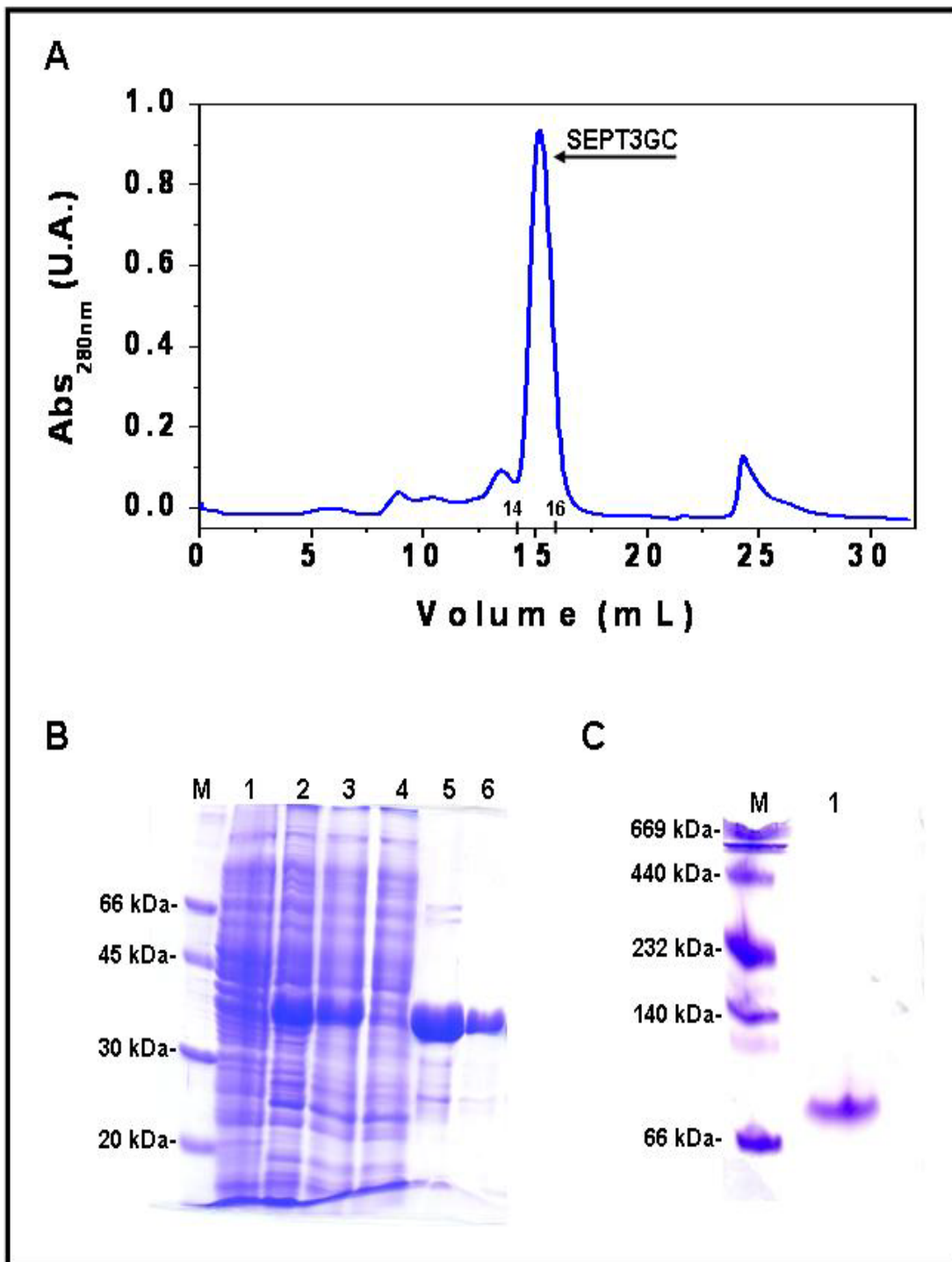


Figura 15 – Análise da expressão e purificação da SEPT3GC. Em A, perfil cromatográfico de SEPT3GC em uma coluna de exclusão molecular Superdex 200. Em B, SDS-PAGE 15%: (1) extrato protéico total da cultura antes da indução com IPTG; (2) fração solúvel; (3) fração insolúvel; (4) fração não retida na resina Ni-NTA; (5) e (6) SEPT3GC eluída da cromatografia de afinidade e após a exclusão molecular, respectivamente. Em C, Perfil eletroforético em gel nativo, 1 corresponde a SEPT3GC eluída nas frações 15 e 16 da cromatografia de exclusão molecular. M corresponde aos padrões em massa molecular. As análises foram realizadas com a proteína em solução tampão contendo 300 mM de NaCl, 25 mM de Tris, 10 % de glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,8.

3.2.3 Determinação da massa molecular de SEPT3GC

A análise de SEPT3GC em gel nativo nos mostra uma banda que teve uma mobilidade eletroforética um pouco acima do padrão em massa molecular de 66 kDa (Figura 15C), sendo assim é mais provável que SEPT3GC esteja na forma dimérica, a qual possui uma massa molecular predita de aproximadamente 72 kDa. Para confirmarmos este resultado a coluna Superdex 200 foi calibrada com seis proteínas globulares de massa molecular conhecida, que foram eluídas aos pares em solução tampão idêntica a da proteína SEPT3GC, contendo 300 mM NaCl. A partir dos perfis cromatográficos, os volumes de eluição obtidos foram utilizados para montar uma curva de calibração (Figura 16), permitindo calcular a massa molecular aparente de SEPT3GC. O resultado foi igual a 42.468,3 Da, o qual representa uma discrepância de 18%, em relação a massa molecular calculada para um monômero a partir da sequência primária de aminoácidos, que foi de 35.968,8 Da. Considerando que na cromatografia de exclusão molecular a massa molecular e a conformação da proteína contribuem para o grau de retenção da mesma esta discrepância é aceitável, visto que, a calibração da coluna foi realizada com padrões de proteínas globulares. Apesar da diferença, este resultado é compatível com a proteína no estado monomérico, sendo diferente do observado no perfil eletroforético de SEPT3GC em gel nativo (Figura 15C).

Mediante a divergência de dados obtidos, optou-se por utilizar outra técnica com maior acurácia para determinar o estado oligomérico de SEPT3GC em solução. Para este fim, utilizou-se a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). As medidas e análises de dados de SAXS foram realizadas pelo Dr. Frederico Moraes Ferreira. A estimativa da massa molecular por meio dos experimentos de SAXS foi de 40,8 kDa, o que resulta em uma discrepância relativa 13,3% quando comparada a massa obtida a partir de sua estrutura primária, e este valor encontra-se dentro de erros experimentais aceitáveis. A massa obtida indica que SEPT3GC organiza-se como um monômero em solução tampão contendo 800 mM de NaCl, concordando com os dados da massa estimada por cromatografia de exclusão molecular em solução tampão com 300 mM de NaCl (Tabela 8, item 2.2.3). Os resultados de SAXS são discutidos mais detalhadamente no item 3.2.9.

Visto que as condições experimentais da cromatografia de exclusão molecular (Figuras 15 e 16) e do SAXS apresentavam diferenças com relação a concentração de NaCl (300 e 800 mM, respectivamente), repetimos a cromatografia na presença de 800 mM NaCl no tampão. Comparando as cromatografias e os géis nativos de ambas condições (300 e 800mM de

NaCl), observou-se que os perfis foram similares tanto em gel quanto na cromatografia (dados não mostrados) e assim, foi possível excluir a hipótese de que a condição monomérica de SEPT3GC observada por SAXS fosse proveniente da alta concentração salina da solução tampão.

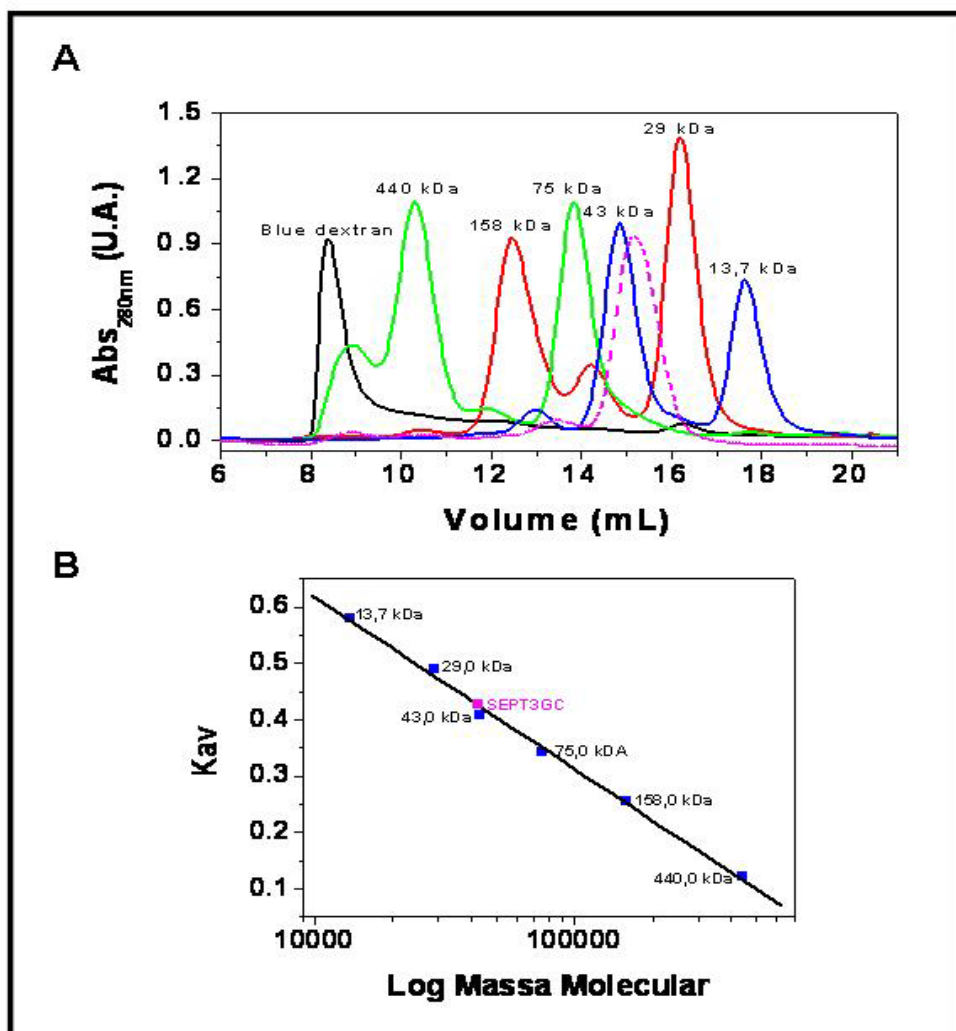


Figura 16 – Calibração da coluna Superdex 200. Perfis cromatográficos das proteínas utilizadas como padrão de massa molecular em cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200. Os padrões correspondem a ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ribonuclease (13,7 kDa). O Blue dextran foi utilizado para determinar o volume de exclusão da coluna, alguns picos que não foram identificados no cromatograma são resultados da oligomerização ou parcial degradação de alguns padrões. Em rosa e tracejado perfil cromatográfico de SEPT3GC. Em B, curva de calibração das proteínas padrões e localização de SEPT3GC após o cálculo da massa molecular aparente. Todas as amostras foram preparadas em solução tampão contendo 300 mM de NaCl, 25 mM de Tris, 10 % de glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,8.

3.2.4 Análises de dicroísmo circular de SEPT3GC

Espectros de CD de SEPT3GC foram obtidos na faixa de 200 a 250 nm (região do UV- distante) responsável pelo monitoramento das transições da cadeia peptídica da proteína, o qual oferece informações sobre a estrutura global da proteína em solução (101). O espectro foi caracterizado pela presença de dois mínimos localizados em 222 e 208 nm, os quais são típicos de proteínas contendo elementos α -hélice em sua estrutura secundária (Figura 17). A estimativa do conteúdo de estruturas secundárias que contribuem para o arranjo tridimensional de SEPT3GC foi realizada por meio da desconvolução do espectro de CD utilizando os programas Selcon3, Contill, CDSSTR do pacote de programas CDPRO (99, 101). Os valores médios dos três programas resultaram em 26,8% de α -hélices, 21,9% de estruturas- β , 20,9% de voltas e 30,4% de estruturas desordenadas. Os dados de desconvolução são consistentes com o fato do espectro de CD observado experimentalmente ser dominado por α -hélice da mesma forma que foi observado para SEPT4 em solução e na estrutura cristalográfica de SEPT2 (49, 68). SEPT3GC foi classificada dentro do grupo de proteínas α -hélice segundo a estimativa de suas estruturas terciárias, por meio do programa CLUSTER. Estes dados permitiram obter um parâmetro conformacional de SEPT3GC nas condições em que as análises biofísicas foram realizadas.

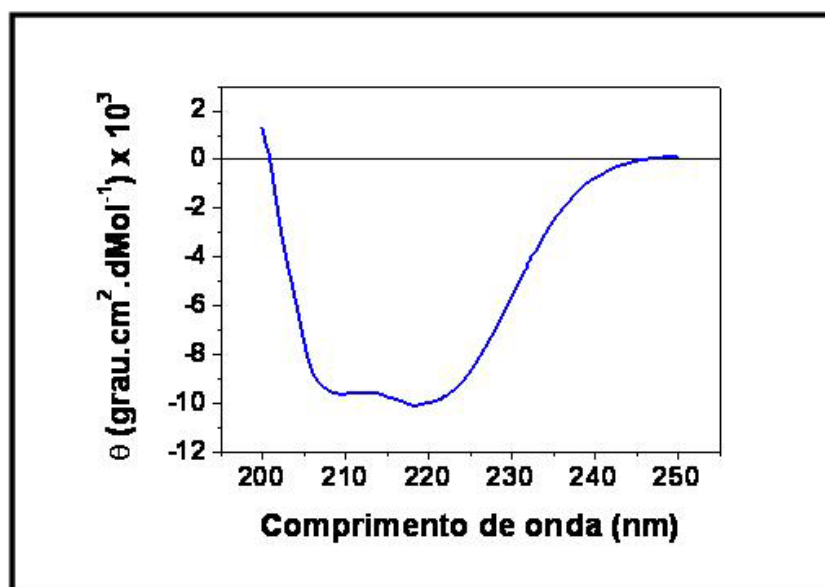


Figura 17 – Espectro de CD de SEPT3GC. O espectro foi obtido com a proteína em solução tampão contendo 25 mM de tris, 50 mM de NaCl, 5% de glicerol, 2 mM de β -mercaptoetanol e 5 mM $MgCl_2$, pH 7,8

3.2.5 Análises do comportamento estrutural frente a diferentes pHs

A influência do pH na conformação de SEPT3GC foi avaliada por dicroísmo circular (CD) conforme apresentado na Tabela 20 e Figura 18. Os dados mostram que ocorreram alterações no conteúdo de estrutura secundária, sendo evidente nas variações dos teores de α -hélices e estruturas- β . Nos pHs de 6 a 10 observa-se que a proteína manteve maior quantidade de α -hélices quando comparada com as estruturas- β , similar ao observado para a mesma em tampão tris, pH 7,8 (Figura 17). No pH 11, a contribuição destas estruturas é quase similar. Nos pHs de 3 a 5 observa-se a perda do mínimo em 222 nm (Figura 18), característico de elementos do tipo α -hélice, com conseqüente redução percentual desse componente na desconvolução. No pH 12 esse comportamento fica mais acentuado, além do deslocamento do mínimo de 208 nm para as proximidades de 204 nm, sugerindo o início da desestruturação da proteína.

De modo geral, os dados de CD sugerem que, variações no pH não levaram a desnaturação da proteína, exceto em extremos básicos. Porém, mudanças e/ou reorganização dos elementos de estrutura secundária foram observadas pela desconvolução, principalmente nos pHs extremos. A conformação adotada por SEPT3GC entre os pHs 6 a 10, na qual a proteína possui maior conteúdo de α -hélices parece ser a mais próxima da proteína nativa, visto que SEPT3 é uma septina detectada exclusivamente em células cerebrais e o pH neste ambiente é de aproximadamente 7,2 (74, 82).

Deve-se ressaltar aqui que dadas as limitações das medidas de CD com relação a concentração de NaCl no tampão, os experimentos foram realizados em tampão contendo apenas 50 mM de NaCl. Assim, embora a solução de SEPT3GC estivesse em baixa concentração (6 μ M), a baixa força iônica da solução pode ter levado a heterogeneidade da amostra em termos de oligomerização, influenciando os resultados obtidos. Experimentos complementares ainda precisam ser realizados para confirmar os resultados aqui apresentados.

Tabela 20 - Conteúdo de estrutura secundária de SEPT3GC sob a influência de diferentes pHs.

Estrutura Secundária (%)	pH									
	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
α -hélice	19,4	20,6	20,8	26,3	26,1	25,0	24,8	25,5	23,7	14,2
Estruturas- β	25,6	25,0	24,9	22,4	22,5	23,2	23,6	22,7	23,4	28,3
Volts	21,4	21,4	21,8	20,9	20,7	20,7	30,5	21,0	21,5	22,8
Desordenadas	33,5	32,9	32,5	30,4	30,7	31,0	21,1	30,7	31,4	34,7

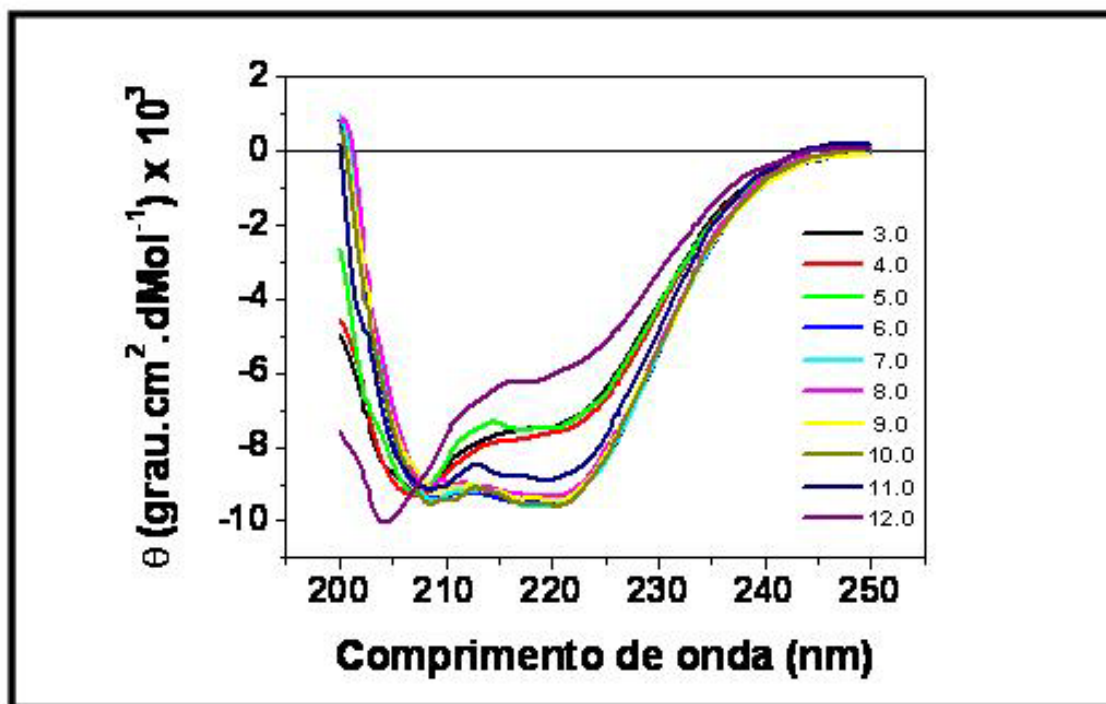


Figura 18 – Influência do pH na composição de estrutura secundária da SEPT3GC avaliada por CD. Espectros de CD foram obtidos de SEPT3GC nos pHs 3 a 12 em 20 μ M de acetato-borato-fosfato de sódio ajustado para os diferentes pHs.

3.2.6 Atividade GTPásica

Septinas são constituídas de 3 domínios bem definidos sendo o central e maior o domínio de ligação a nucleotídeo, o qual permite classificá-las como membros da superfamília das GTPases. Pouco se conhece sobre a atividade GTPásica das septinas, e como tal atividade influi nas funções exercidas por estas proteínas. Na tentativa de contribuir com informações neste contexto, iniciou-se um estudo da atividade GTPásica de SEPT3GC. Foi utilizado um protocolo de desnaturação química com ácido hiperclórico, descrito por Seckler e colaboradores, para analisar o teor de nucleotídeo liberado por cromatografia líquida em uma coluna de troca aniônica (108). Neste experimento, o primeiro passo foi a calibração da coluna com os nucleotídeos, GDP e GTP, com a finalidade de estabelecer a melhor condição experimental para que os nucleotídeos padrões eluissem em tempos diferentes durante a cromatografia (Figura 19). Os nucleotídeos eluíram em 5,3 e 6,8 mL para GDP e GTP, respectivamente. Uma curva padrão de concentrações dos nucleotídeos nos permitiu observar que foi mantida a proporção entre concentração e absorbância a 253 nm, indicando que durante o preparo das amostras com ácido hiperclórico não ocorreu a perda de nucleotídeos (dados não mostrados).

Confirmada a eficiência do procedimento para a separação dos nucleotídeos de guanina, o próximo passo foi investigar se após o processo de purificação, SEPT3GC estava associada à nucleotídeo, a natureza deste (GTP ou GDP) ou, ainda, se estava na forma apo (sem nucleotídeo ligado). Assim, amostras de SEPT3GC foram submetidas ao processo de desnaturação por ácido hiperclórico e o sobrenadante foi analisado em HPLC. No cromatograma apresentado na Figura 20 não se observa a presença dos picos correspondentes a GDP e GTP (5,3 e 6,8 mL, respectivamente), indicando que SEPT3GC encontrava-se na forma apo. A verificação que SEPT3GC em solução se encontra como monômero (item 3.2.3) e na forma apo são duas características que diferenciam SEPT3 das septinas 2 e 4, que são ambas purificadas como dímero e associadas a nucleotídeo (46, 68)

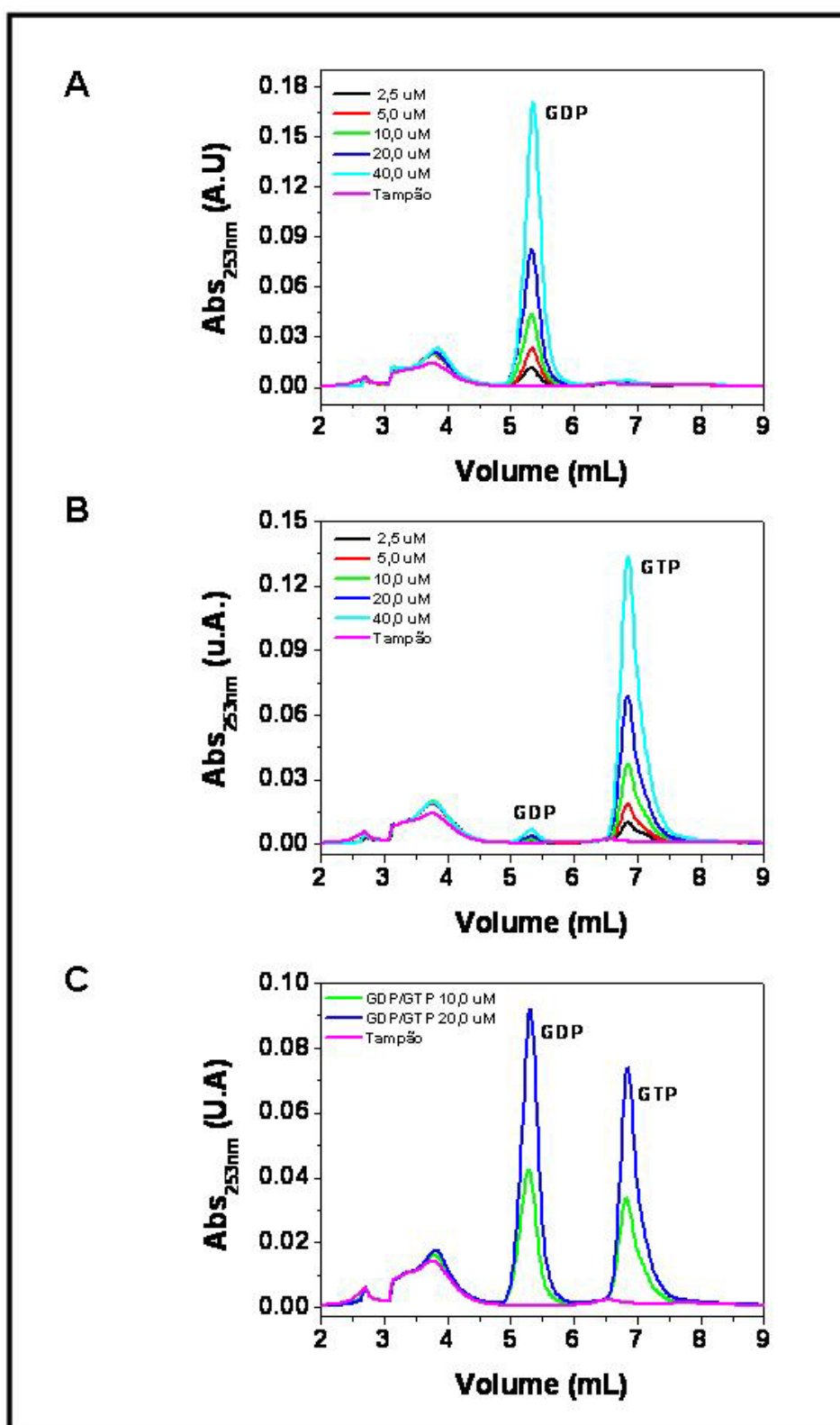


Figura 19 – Perfil cromatográfico do GDP e GTP em uma coluna de troca aniônica. Em A e B, GDP e GTP, respectivamente em diferentes concentrações. Em C, perfil da separação de misturas de GDP e GTP. Todas as amostras passaram por tratamento com ácido hiperclórico. A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 1 mL/min em um tempo total de 15 min, a temperatura ambiente.

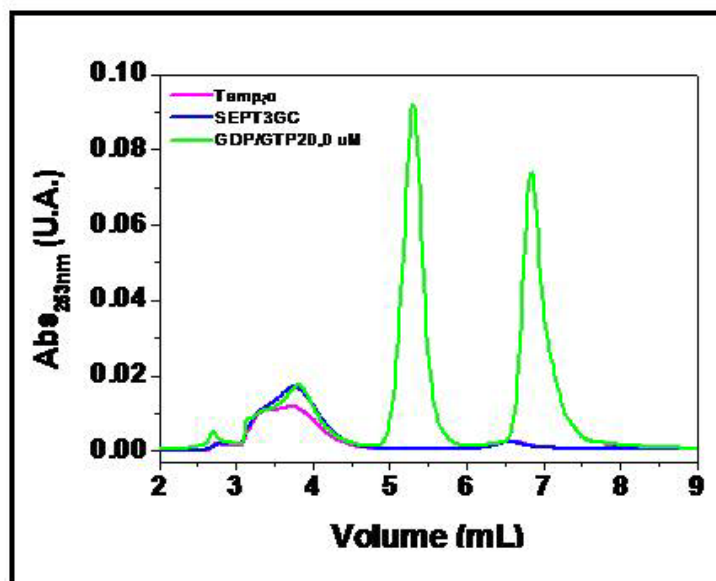


Figura 20 – Análise do teor de nucleotídeo de SEPT3GC . Após purificação, 20 μ M de SEPT3GC foram desnaturados com ácido hipercloreto e o sobrenadante foi analisado por HPLC em uma coluna de troca aniônica.

A fim de avaliar a capacidade de SEPT3GC de hidrolisar GTP, a proteína apo foi incubada com GTP em uma relação de 3:1 (GTP:proteína), a 20 °C , durante 60 minutos. Aliquotas foram retiradas em intervalos de 4 min e congeladas em nitrogênio líquido para parar a reação. Em seguida, as amostras foram desnaturadas com ácido hipercloreto e analisadas em HPLC. Na Figura 21 são apresentados alguns dos cromatogramas sobrepostos, os quais permitem concluir que SEPT3GC foi capaz de hidrolisar GTP em GDP e fosfato inorgânico. Os dados aqui apresentados não permitiram obter alguns parâmetros como K_m e K_{cat} , mas experimentos futuros estão programados para a caracterização quantitativa da atividade GTPásica de SEPT3GC.

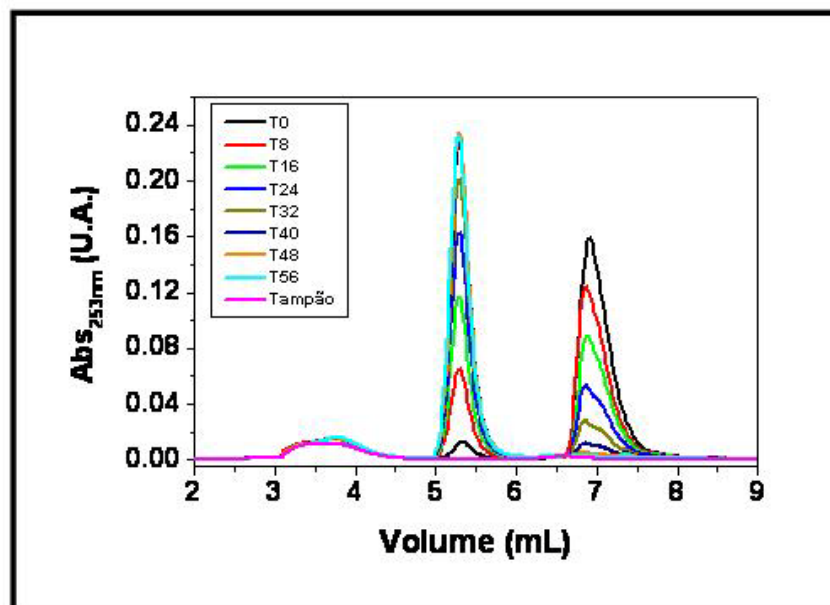


Figura 21- Análise da atividade GTPásica de SEPT3GC. SEPT3GC (18,4 μ M) foi incubada com 55 μ M de GTP durante 60 minutos a 20 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 4 minutos e após serem desnaturadas com ácido hiperclórico foram analisadas por cromatografia de troca iônica. A sobreposição de nove cromatogramas é apresentada, os demais cromatogramas foram omitidos para melhor visualização dos resultados. “T” corresponde ao tempo em que foi retirada cada amostra.

A obtenção da proteína apo ainda permitiu iniciar a caracterização da ligação a nucleotídeo de SEPT3GC por experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Esta é uma técnica biofísica que permite obter a constante de ligação (K_a) de uma molécula com seu ligante entre outros parâmetros termodinâmicos. Neste experimento, SEPT3GC foi titulada com $GTP\gamma S$, um análogo não hidrolisável do GTP e com GDP, a temperatura constante de 20 °C.

Na Figura 22 é mostrado um termograma típico de ligação exotérmica, na qual a entalpia total é negativa (ΔH negativo) e para o mesmo, o modelo de ligação de um único sítio (estequiometria (N)1:1) descreveu os dados adequadamente para a titulação de SEPT3GC com $GTP\gamma S$. As septinas possuem um único sítio de ligação a nucleotídeo, desta forma os dados obtidos onde N corresponde à estequiometria da reação estão de acordo com o esperado. A variação no valor de N entre experimentos independentes (Tabela 21) é esperada em análises por ITC, pois vários fatores contribuem para que isso ocorra. Por exemplo, a variação no grau de enovelamento correto da proteína, que resulta em alterações na efetiva atividade da mesma, e a acurácia na determinação das concentrações do ligante e da proteína (há muitos erros associados às técnicas usadas para este fim) são os fatores que mais interferem na reprodutibilidade dos dados de ITC.

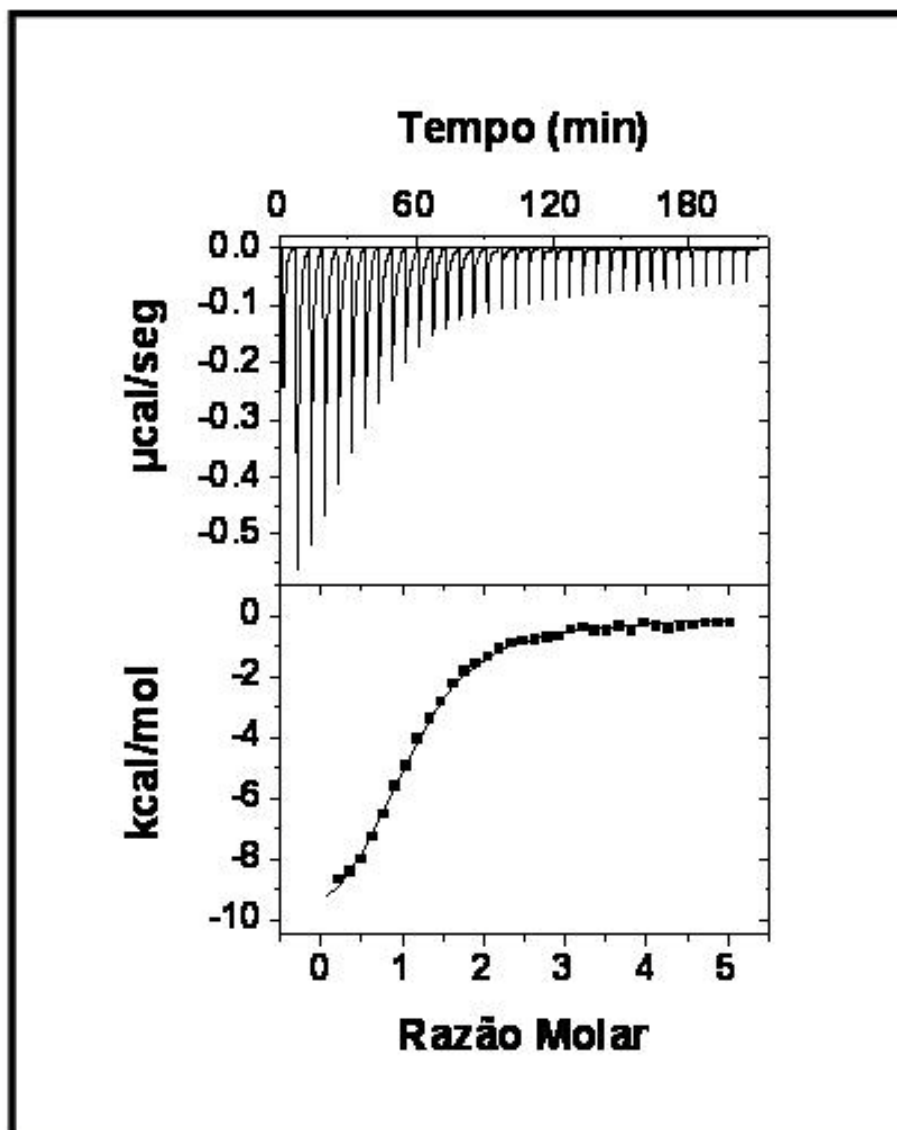


Figura 22 - Calorimetria de titulação isotérmica de SEPT3GC com GTP γ S. Curva de titulação (painel superior) e isoterma de ligação (painel inferior) de SEPT3GC interagindo com GTP γ S em solução tampão contendo 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 7,8 a 20°C. Dados referente ao experimento 1 da Tabela 21.

Tabela 21 - Parâmetros termodinâmicos referente a titulação de SEPT3GC com GTP γ S obtidos por meio de calorimetria de titulação isotérmica.

Experimento	Número de sítios (N)	Constante de afinidade (K _a)	Constante de dissociação (K _d)	Entalpia (ΔH)
1	1,09 +/- 0,0143	$1,84 \times 10^5 \pm 9,54 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$5,43 \pm 0,3 \mu\text{M}$	$-1,11 \times 10^4 \text{ cal/mol}$
2	0,87 +/- 0,00901	$5,18 \times 10^5 \pm 3,49 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$1,93 \pm 0,13 \mu\text{M}$	$-1,14 \times 10^4 \text{ cal/mol}$

Os valores de N apresentados na Tabela 21, 1,09 e 0,87, para um modelo de um único sítio ($N = 1$) estão dentro dos valores aceitáveis, pois N não deve variar mais que 20% do esperado. Nos resultados apresentados esta variação foi de 9 e 13%. As constantes de dissociação calculadas ($K_D = 1/K_a$) para o $GTP\gamma S$ foram $5,43 \mu M$ e $1,93 \mu M$ que são de uma ordem de grandeza maior que o calculado para SEPT2, $0,28 \mu M$, na presença de $5 \text{ mM } Mg^{2+}$ e a temperatura ambiente (147). Os mesmos valores de K_D são similares aos obtidos por ITC para os complexos de septinas de leveduras expressos em bactéria Cdc3-Cdc12, Cdc3-Cdc11-Cdc12 e Cdc3-Cdc10-Cdc12 que têm valores de K_D $1,6 \mu M$, $6,2 \mu M$ e $5,0 \mu M$, respectivamente, onde a estequiometria das ligações indicaram que apenas uma das septinas em cada complexo ligou-se ao $GTP\gamma S$ (15). O K_D de micromolar para $GTP\gamma S$ de SEPT3GC tem a mesma ordem de magnitude das constantes de ligação das Rho GTPases, Cdc42, RhoA e Rac1; mas está muito distante da alta afinidade por nucleotídeo guanina exibida pela Ras GTPase, p21, que possuem K_D na faixa de picomolar (149, 150).

A influência do magnésio na afinidade de SEPT3GC por $GTP\gamma S$ também foi investigada por ITC. Com essa finalidade SEPT3GC foi purificada na ausência de Mg^{2+} sendo em seguida titulada com o nucleotídeo guanina a temperatura constante de $20 \text{ }^\circ C$. Na Figura 23 observa-se o termograma onde nota-se que a troca de calor variou entre $-0,04$ e $-0,07 \mu cal s^{-1}$, podendo ser considerada desprezível, pois se encontra próximo ao limite de detecção do calorímetro ($0,01 \mu cal s^{-1}$). Este termograma é muito similar aos obtidos nos experimentos de calor diluição que são realizados como controle nas análises por ITC, para avaliar a inércia química dos reagentes na ausência da proteína. Este resultado indica que SEPT3GC não foi eficiente para ligar a $GTP\gamma S$ na ausência de Mg^{2+} ou que a afinidade a tal nucleotídeo foi drasticamente reduzida, não sendo perceptível nas condições experimentais usadas. Resultados similares foram observados para SEPT2, cuja afinidade por $GTP\gamma S$ foi reduzida de até 12 vezes quando a concentração de Mg^{2+} foi alterada de níveis fisiológicos ($5 - 0,5 \text{ mM}$) para $0,01 \text{ mM}$ (147). O cátion divalente, Mg^{2+} , há muito tem sido relatado como um cofator essencial para a função de pequenas GTPases, sendo importante na prevenção da integridade estrutural de proteínas que ligam a GTP. Para o íon magnésio é proposta a função de inibidor da dissociação de GDP para Rab5 (151). O mesmo íon em nada afeta a afinidade por GDP de algumas Rho GTPases, enquanto para as mesmas a afinidade por $GTP\gamma S$ é dependente das concentrações deste íon, comportamento este similar ao observado para a septina 2 (147, 149, 151). Já para outras GTPases, a eficiência na hidrólise do GTP é indetectável na ausência de Mg^{2+} (150). Os dados aqui apresentados indicam que a afinidade de SEPT3GC por $GTP\gamma S$ é

dependente de íons magnésio. Análises futuras são necessárias para avaliar se tal dependência também ocorre na capacidade de hidrolisar o GTP.

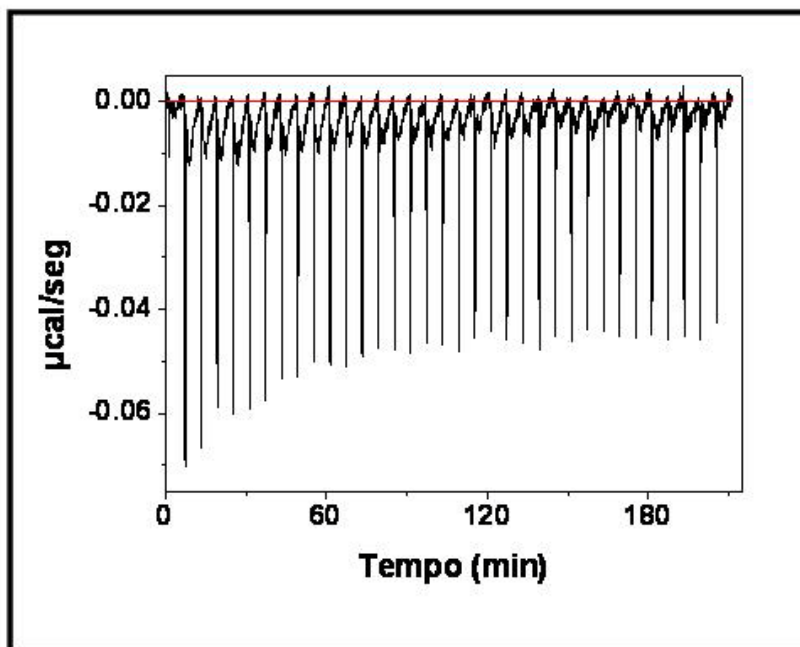


Figura 23 – Termograma da titulação de SEPT3GC com GTP γ S na ausência de íons magnésio. A titulação foi realizada a 20 °C e SEPT3GC encontrava-se em solução tampão contendo 300 mM de NaCl.

Visto que a afinidade entre os nucleotídeos de guanina, GDP e GTP, costuma ser distinta para GTPases, foram realizadas análises em ITC também para quantificar a afinidade de SEPT3GC por GDP. Diferente dos dados apresentados para a titulação com GTP γ S, a titulação de SEPT3GC com GDP não permitiu a obtenção dos parâmetros termodinâmicos para um modelo de um único sítio. Os dados apresentados, na Figura 24, sugerem que a afinidade de SEPT3GC por GDP é muito baixa, não sendo possível detectá-la por ITC. Analisando o termograma, observa-se que apesar de realizadas 35 titulações de L5d e GTP γ S a 500 μ M, o estado de saturação da ligação não foi atingido. Ainda, o experimento foi repetido nas mesmas condições anteriores, exceto pela concentração do ligante, agora a 1 mM, e mesmo assim os dados obtidos não permitiram calcular a constante de ligação.

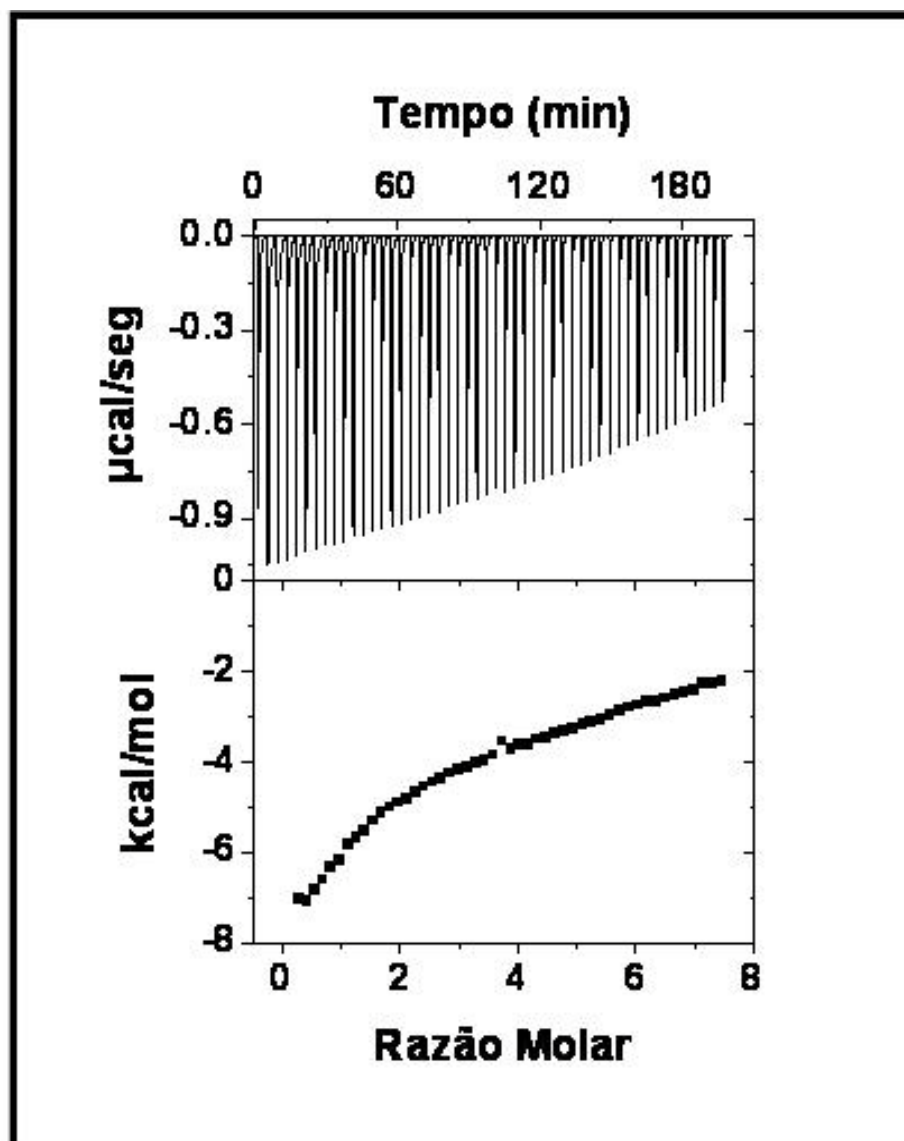


Figura 24 - Calorimetria de titulação isotérmica de SEPT3GC com GDP. Curva de titulação (painel superior) e isoterma de ligação (painel inferior) de SEPT3GC interagindo com GDP em solução tampão contendo 300 mM NaCl e 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 7,8 a 20°C.

A afinidade de SEPT3GC por GDP e GTP também foi avaliada em experimentos qualitativos, por meio de emissão de fluorescência. SEPT3GC foi incubada com os derivados fluorescentes dos nucleotídeos de guanina, mant-GDP e mant-GTP, e a emissão de fluorescência foi analisada em um espectrofluorímetro. Na Figura 25 é mostrado um aumento de aproximadamente 100% na fluorescência do mant-GTP na presença de SEPT3GC quando comparado com mant-GTP sozinho. A fluorescência do mant-GDP, entretanto, foi acrescida de um pouco menos que 20% na presença de SEPT3GC, indicando que SEPT3GC tem maior afinidade por GTP do que GDP.

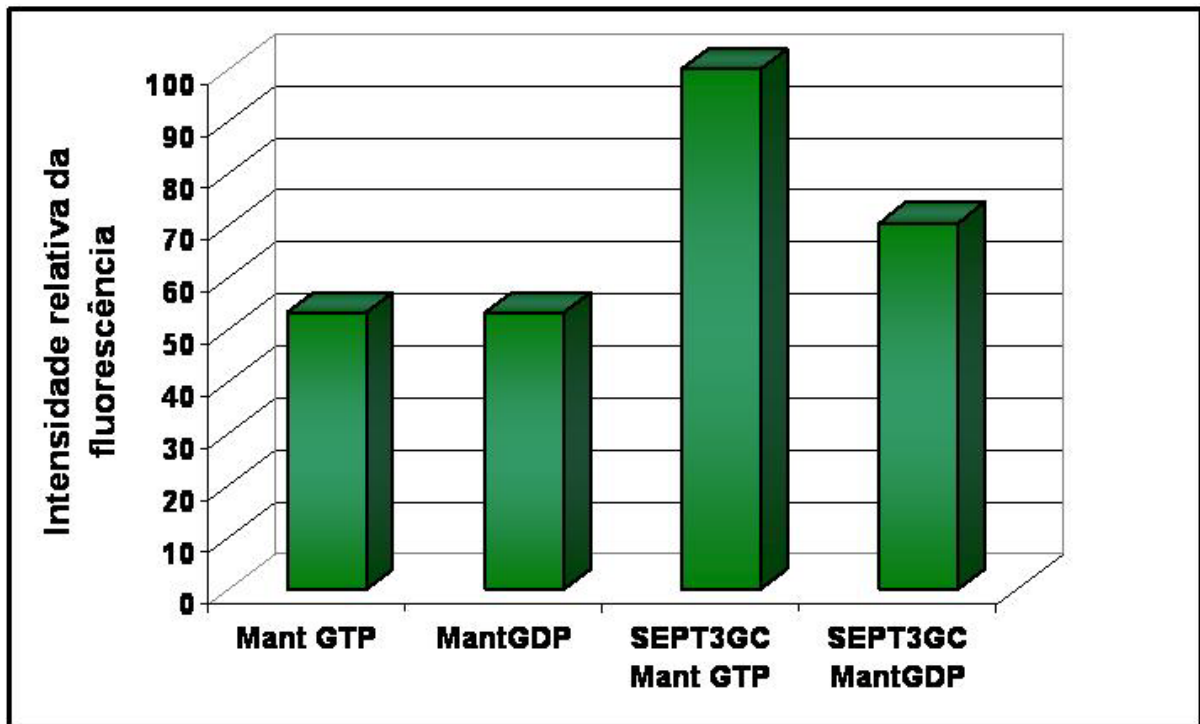


Figura 25 – Análise da interação de SEPT3GC com mant-GTP e mant-GDP. A emissão de fluorescência do mant-GTP ou mant-GDP a 25 nM na presença de SEPT3GC foi medida em espectrofluorímetro a temperatura constante de 10 °C.

Uma importante questão ainda pendente sobre as septinas é o papel da ligação e hidrólise de GTP na função das septinas e formação dos heterofilamentos. Vários autores tem sugerido alguns modelos para o papel do GTP; em um deles é proposto que as septinas passem por vários ciclos de ligação a GTP e hidrólise, e que, as mudanças geradas pelo tipo de nucleotídeo ligado resultem na regulação da montagem e desmontagem de filamentos como ocorre com a tubulina. Outro modelo sugere que a ligação a GTP ou hidrólise pode regular a interação de septinas com outras proteínas, regulando assim sua função. Um terceiro modelo propõe que a ligação a nucleotídeo tem uma função estrutural. No geral ao que se refere a função do GTP pouco se sabe e alguns trabalhos ainda apresentam resultados contraditórios dificultando ainda mais o esclarecimento de seu papel (22, 44-46, 152, 153).

Alguns trabalhos mostram a dificuldade da caracterização da atividade GTPásica de septinas quando as mesmas foram expressas em bactérias e individualmente devido a instabilidade da proteína recombinante (15, 45). Em um destes trabalhos, a atividade de SEPT6 e SEPT7 não foi detectada quando as mesmas foram analisadas individualmente, mas quando a análise foi realizada com o dímero formado por elas a atividade GTPásica foi facilmente detectada, indicando que a interação entre elas tornou-as mais estáveis (45). Para

SEPT2 já foi demonstrado que sua estabilidade foi dependente da ligação a nucleotídeo, indicando que mudanças conformacionais devem ocorrer tornando-a mais estável, similar ao que é visto para várias GTPases (147). Neste mesmo trabalho a formação de homofilamentos *in vitro* de SEPT2 foi observada quando a mesma estava ligada a GDP ou GTP; e em outro estudo, o equilíbrio entre as formas monoméricas e diméricas de SEPT2 dependente da ligação a nucleotídeos de guanina foi monitorada por cromatografia de exclusão molecular (46, 147). Apesar deste relato da formação de homofilamentos de SEPT2 *in vitro*, acredita-se que esta não é uma condição natural visto que, a imunoprecipitação de septinas de células resulta na precipitação de complexos de septinas, formados por subunidades diferentes, sugerindo que a formação de homopolímeros não é típica *in vivo* (22, 44, 52). Diferente de SEPT2, SEPT3 manteve-se estável na forma apo, conservando sua capacidade de ligar-se a GTP γ S, mesmo após 40 a 50 dias de congelamento a - 80° C.

Com o propósito de analisar se a ligação a nucleotídeo promove alguma modificação no estado oligomérico de SEPT3GC, avaliamos por cromatografia de exclusão molecular e por eletroforese em condições nativa, amostras de SEPT3GC incubadas com GTP γ S e GDP na presença de 5 mM de Mg⁺² (Figura 26). Os perfis cromatográficos de SEPT3GC na ausência e na presença de GDP foram idênticos, não havendo dúvidas quanto a conservação da forma monomérica da proteína. Já o perfil cromatográfico de SEPT3GC após incubação com GTP γ S sofreu um pequeno deslocamento de 15,6 para 15,1 mL quando comparado com a proteína pura. Tal alteração no volume de eluição provavelmente é consequência de alterações na forma da proteína após ligação ao nucleotídeo, pois este deslocamento não é compatível com a posição esperada para o volume de eluição da forma dimérica de SEPT3GC (próximo de 13,8 mL). A eletroforese em condições nativas (Figura 26B) também comprova que SEPT3GC manteve uma única conformação, correspondente à forma monomérica após incubação com GDP ou GTP γ S, diferentemente do que foi relatado na literatura para SEPT2 (46). Além disso, é importante mencionar que o resultado aqui apresentado é válido para as condições ensaiadas, na qual SEPT3GC se encontrava sob a ação da força iônica imposta por 300 mM de NaCl. Não podemos descartar ainda a hipótese de que a concentração salina possa ter sido fator limitante para a manutenção do estado monomérico de SEPT3GC, após associação com nucleotídeo. Visto que, já sabemos da propensão de SEPT3GC a forma oligômeros em concentrações salinas menores. Além disso, os experimentos realizados com SEPT2 que mostram a transição entre as formas monoméricas e diméricas foram realizados em solução tampão contendo 150 mM NaCl (46). Deve-se ressaltar aqui, que embora, a

eletroforese em gel nativo (Figura 26B) indique um perfil anômalo de migração, com a massa maior que a predita para um monômero, SEPT3GC encontra-se na forma monomérica como já descrito no item 3.2.3.

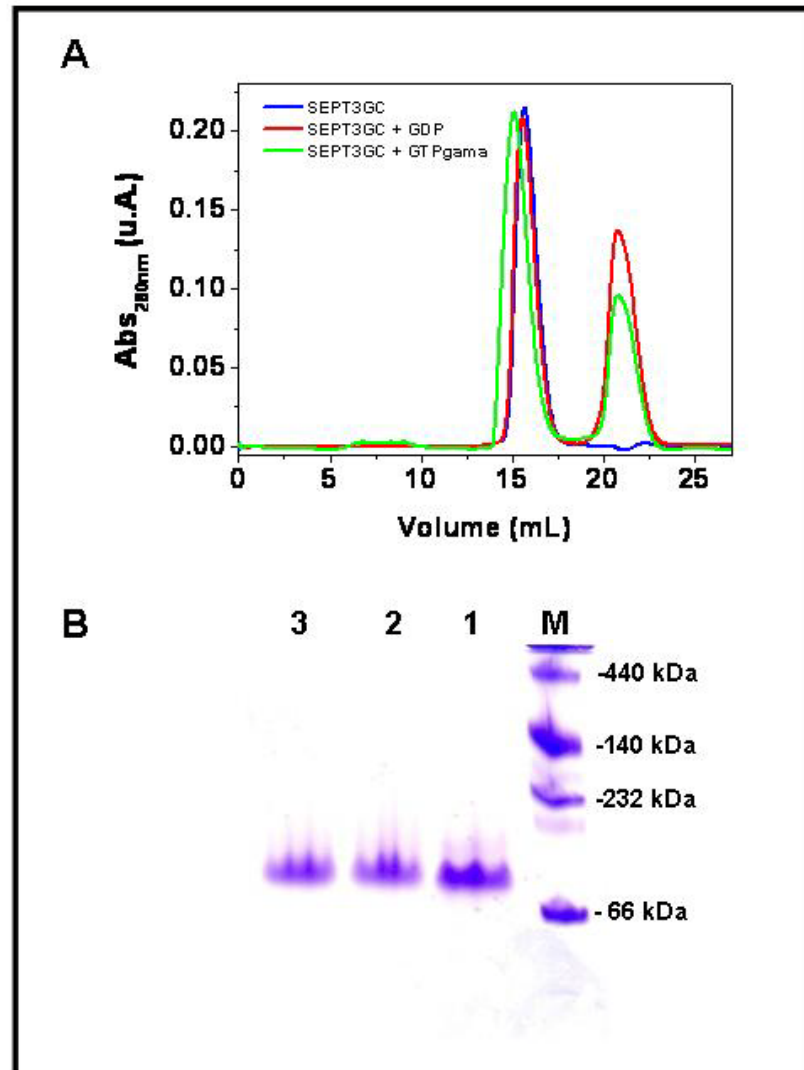


Figura 26 – Análise da influência de nucleotídeo no estado oligomérico de SEPT3GC. SEPT3GC (25 μ M) foi incubada com 75 μ M de GDP ou GTP γ S durante 3 horas a 20 $^{\circ}$ C, em seguida a amostra foi analisada por cromatografia de exclusão molecular (A) ou por eletroforese em gel nativo (B). M, corresponde ao padrão em massa molecular, 1, SEPT3GC; 2 e 3 correspondem a SEPT3GC incubada com GDP e GTP γ S, respectivamente. Em A, os picos próximos aos 20 mL correspondem aos nucleotídeos.

3.2.7 Análise da propensão para forma fibras do tipo amilóide

A conversão de polipeptídeos em seu estado solúvel para agregados fibrilares bem organizados está associada com várias patologias, que são agrupadas como “doenças de deposição de proteínas”, entre elas estão algumas neuropatologias, tais como, mal de Alzheimer e mal de Parkinson (154). Estes agregados fibrilares altamente ordenados e estáveis são denominados amilóides e tipicamente possuem um alto conteúdo de estruturas- β , cujas cadeias estão perpendicularmente dispostas ao longo do eixo da fibrila. Proteínas precursoras de amilóides não compartilham de semelhanças sequencial, de composição de estrutura secundária ou de tamanho, as semelhanças são observadas nas fibrilas por elas formadas, tanto na morfologia quanto nos mecanismos de toxicidade (154, 155).

A septina 4 humana foi identificada em depósitos filamentosos conhecidos como fibrilas gliais em mal de Alzheimer bem como em inclusões citoplasmáticas em mal de Parkinson (67, 156). Garcia e colaboradores demonstraram que SEPT4G é capaz de forma fibras e que estas fibras são do tipo amilóide (110). Neste trabalho, os autores propõem um modelo, no qual inicialmente SEPT4G encontra-se ligada a nucleotídeo sendo que, a perda deste nucleotídeo, promovida por alterações no sistema como aumento de temperatura, favorece a formação de fibras do tipo amilóide. Além de SEPT4 outras septinas como a SEPT3, SEPT2, já foram relacionadas a doenças neurodegenerativas (67, 86).

Com intuito de analisar se SEPT3GC tende a forma fibrilas avaliamos sua capacidade de se ligar a Tioflavina-T (ThT), uma sonda que exibe aumento na intensidade da fluorescência quando se liga a fibras do tipo amilóide. Observamos que, em temperaturas superiores a 30 °C ocorre um aumento na fluorescência do ThT (Figura 27A). Nas temperaturas de 37 e 45 °C o aumento da fluorescência é gradativo sugerindo uma lenta formação das fibrilas. Diferentemente é observado a 55 °C, onde um platô foi rapidamente atingido por volta de 600 segundos, indicando uma acelerada formação de fibras, seguida, pela formação de agregados amorfos, os quais não são mais reconhecidos por ThT. Estes resultados são similares aos observado para SEPT2 (dados não publicados) e para SEPT4 (110). A fim de avaliar se a capacidade de ligar a ThT de SEPT3GC está associada a alterações no conteúdo de estrutura secundária, espectros de CD foram obtidos (Figura 27B). De acordo com o esperado, os espectros de CD sofreram alterações que resultaram na perda dos mínimos característicos de proteínas ricas em elementos α -hélice, passando a apresentar o perfil típico de predominância de estruturas- β , caracterizado pelo mínimo aos redores de 216

nm. Embora experimentos que permitam observar as estruturas fibrilares são necessários para confirmar a natureza das fibras, nossos resultados são forte indício de que SEPT3GC converte estruturalmente para fibras do tipo amilóide *in vitro*.

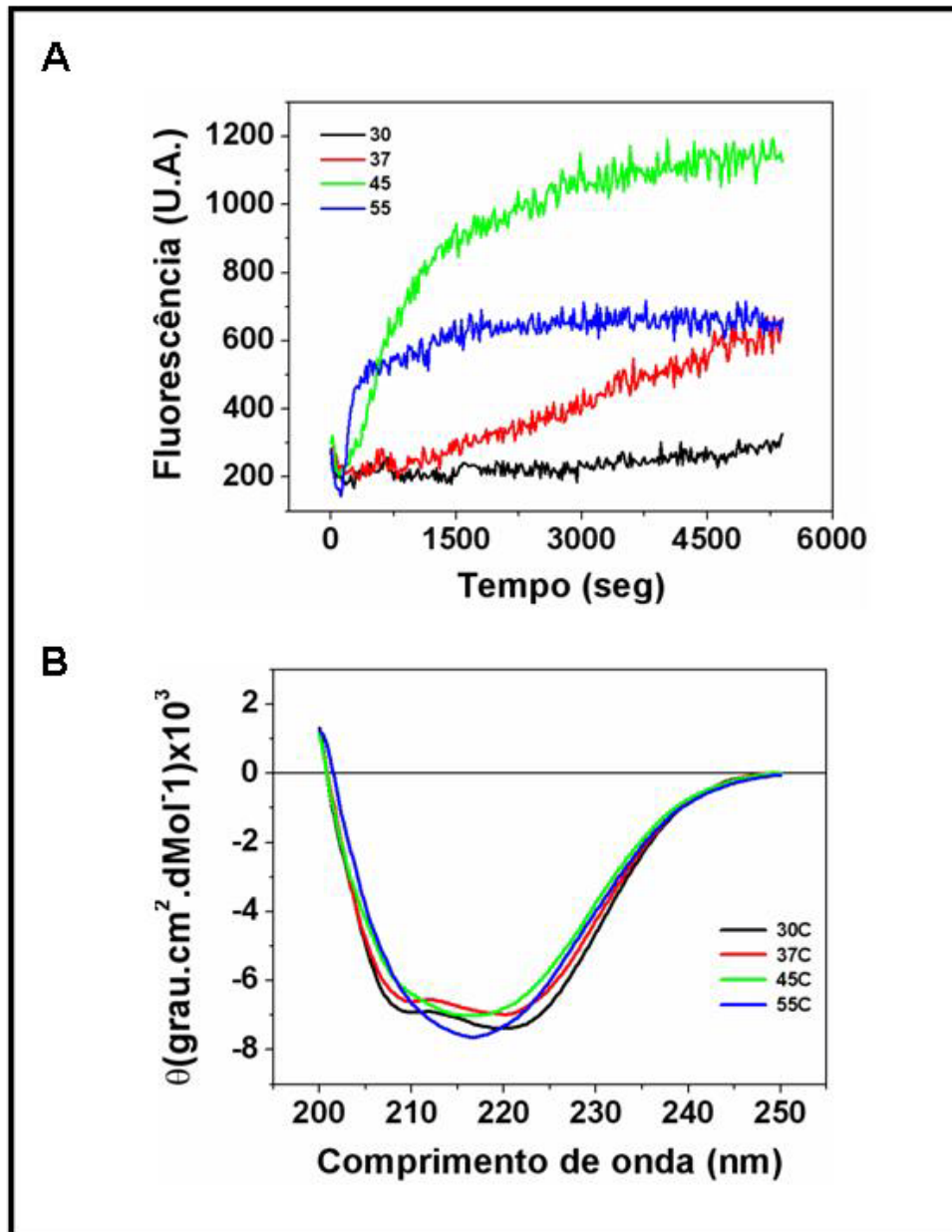


Figura 27 – Alterações conformacionais em SEPT3GC em função da temperatura. Em A, formação de agregados monitorados por emissão de fluorescência do ThT a 482 nm, durante incubação com 8 μM de SEPT3GC em diferentes temperaturas. Em B, espectros de CD obtidos a 30, 37, 45 e 55 °C de SEPT3GC a 6 μM. A proteína estava em solução tampão contendo 25 mM de Tris, 50mM NaCl e 5% de glicerol, pH 7,8.

É importante ressaltar que há uma ampla discussão na literatura a respeito da formação de homo e heterofilamentos de septinas, visto que, estudos *in vivo* indicam que filamentos funcionais são compostos por mais de duas septinas distintas, e experimentos *in vitro* mostram resultados similares (45, 46, 50, 52, 147, 153). Há poucos relatos de formação de homofilamentos, sendo que, em apenas um, há evidências de tais filamentos serem funcionais (110, 147, 153). Desta forma estudos que contribuam com informações sobre os homofilamentos de septinas são importantes para elucidar a relevância dos mesmos.

3.2.8 Ensaios de cristalização

Uma vez estabelecido o procedimento de purificação de SEPT3GC para obter a proteína em solução de forma homogênea e estável, vários experimentos foram delineados e realizados com sucesso como descritos anteriormente. Além daqueles, foram realizados ensaios de cristalização com a finalidade de contribuir com informações estruturais mais detalhadas referente a SEPT3. Estes ensaios foram realizados junto ao Grupo de Cristalografia de Proteínas do IFSC, USP, em colaboração com o doutorando Ivo de Almeida Marques e do pós-doutorando Humberto D´Muniz Pereira.

Para a realização dos ensaios de cristalização, SEPT3GC foi submetida previamente à clivagem com trombina para a retirada da cauda de 6xHis. A confirmação da eliminação da cauda de histidina foi realizada por análise da proteína em SDS-PAGE, como apresentado na Figura 28, na qual nota-se que a mobilidade eletroforética da proteína após tratamento com trombina foi levemente superior, indicando redução de sua massa molecular.

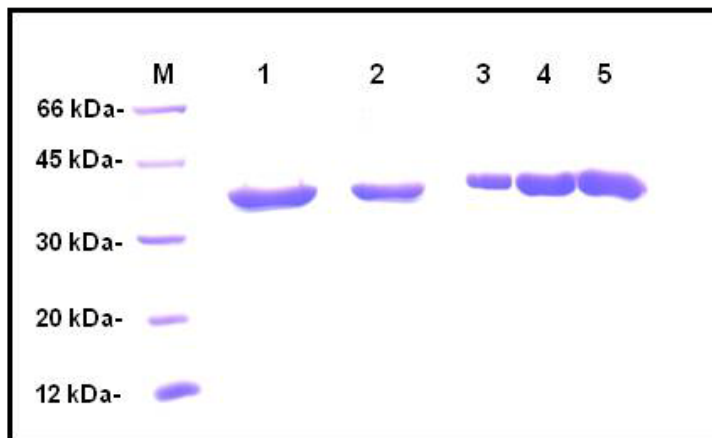


Figura 28 – Perfil eletroforético de SEPT3GC após tratamento com a protease trombina. 1 e 2 correspondem a SEPT3GC após retirada da cauda de histidina. 3, 4 e 5, SEPT3GC antes do tratamento com trombina. M, corresponde ao padrão em massa molecular.

Os ensaios iniciais de varredura dos fatoriais citados no item 2.2.15 foram realizados com a proteína a 5 mg/mL na presença e ausência de GDP e GTP γ S, a 18 °C. Observou-se nestes ensaios que em torno de 80% das condições testadas a proteína precipitava. Esse resultado preliminar levou a novos experimentos nos quais a concentração de SEPT3GC foi reduzida para 4,0 mg/mL e, finalmente, para 2,5 mg/mL. Nestas duas concentrações houve uma redução da precipitação da proteína, sendo que na condição de cristalização composta por 20% de PEG 3350 e 0,2 M de formato de magnésio, houve a formação de *clusters* de cristais agulha (Figura 29A). Estes cristais foram submetidos à coleta de dados de difração de raios-X no LNLS pelo Dr. Humberto, confirmando sua natureza protéica. A formação destes cristais foi observada por várias vezes na mesma condição anteriormente citada e sempre na presença de nucleotídeo.

Com o refinamento da condição supracitada, chegou-se a condição composta por 18% de PEG 3350, 0,2 M de formato de magnésio, 0,1 M de tris, pH 6,2 e 5% de etileno glicol, na qual pequenos cristais foram formados. Estes cristais foram obtidos com a proteína a 2,5 mg/mL, 18 °C, tanto na presença de GTP γ S quanto de GDP, sendo que, com GDP os cristais se apresentaram mais definidos (Figura 29B). O padrão de difração de um destes cristais na presença de GDP está ilustrado na Figura 29C, sendo que a resolução máxima obtida foi de aproximadamente 6 Å. No momento esforços estão sendo centralizados na tentativa de melhorar a qualidade de tais cristais e, conseqüentemente, conseguir uma resolução mais alta.

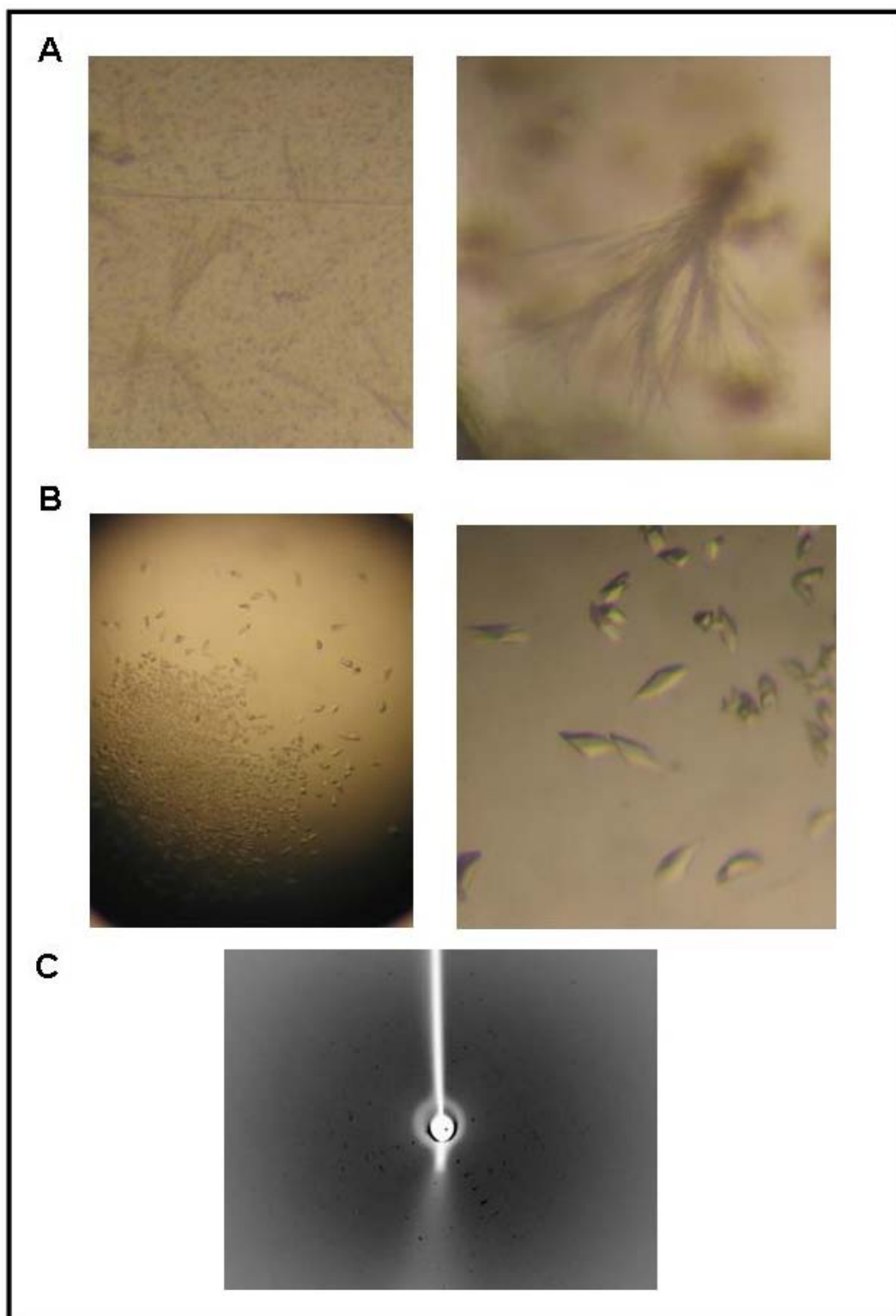


Figura 29 – Cristais de SEPT3GC e seu padrão de difração. Em A, cluster de cristais agulhas de SEPT3GC obtidos nas etapas iniciais de varredura na presença de GDP. Em B, os cristais formados na presença de GDP, após refinamento da melhor condição verificada na etapa de varredura. Em C, padrão de difração de um cristal nas condições citadas em B.

3.2.9 Modelagem Molecular e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Como o objetivo de obter informações estruturais a partir da resolução da estrutura cristalográfica ainda não foi atingido, decidiu-se realizar estudos de modelagem e SAXS com SEPT3GC. Inicialmente, a proposta de realização dos experimentos de SAXS surgiu com a dificuldade de determinar o estado de oligomerização de SEPT3GC. A coleta de dados no LNLS e o processamento dos dados de SAXS, tanto quanto, os de modelagem molecular foram propostos e realizados pelo pesquisador Dr. Frederico Moraes Ferreira, do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração da FMUSP, e são apresentados a seguir para complementar os dados estruturais de SEPT3GC.

Os resultados do programa PSI-BLAST apresentaram similaridade sequencial entre SEPT3 e um grande número de sequências de septinas de diferentes organismos, assim como, com uma grande variedade de proteínas Ras, membros da super família das GTPases. O confronto destas sequências com o banco de dados, *Protein Data Bank*, revelou identidade sequencial apreciável para 4 modelos cristalográficos, todos eles, variações da septina 2. A saber: SEPT2 humana em complexo com GDP (2QNR); SEPT2 de *Mus musculus* em complexo com GPPnhp e Mg^{2+} (3FTQ); domínio G da SEPT2 humana (2QA5); e a estrutura do trímero composto pelas septinas humana, SEPT2-SEPT6-SEPT7, (2QAG). Estas estruturas foram utilizadas para construção de 5 modelos por homologia molecular, sendo um para cada estrutura cristalográfica; e um quinto modelo híbrido, reunindo as melhores partes de cada uma das estruturas mencionadas. As análises revelaram que o modelo obtido a partir da estrutura 3FTQ como sendo a melhor representação estrutural para a septina 3 humana. Em particular, o alinhamento das sequências primárias da SEPT3 de *Homo sapiens* e a SEPT2 de *Mus musculus* apresentou uma identidade sequencial de 39,7%. Contudo, levando-se em consideração o alinhamento entre a sequência alvo e a sequência do modelo cristalográfico 3FTQ, tal número aumentou para 45,8%. A Figura 30 apresenta o alinhamento das sequências primárias da septina 3 de *Homo sapiens* e da septina 2 de *mus musculus*.

Em uma segunda etapa, o modelo preliminar obtido, exclusivamente por homologia, a partir da estrutura 3FTQ foi submetido a modelagem molecular *ab initio* para a construção e remodelagem dos elementos de inserção e “loops”. A Figura 31 apresenta a sobreposição entre o modelo final de SEPT3 e a estrutura cristalográfica da septina 2 (3FTQ).

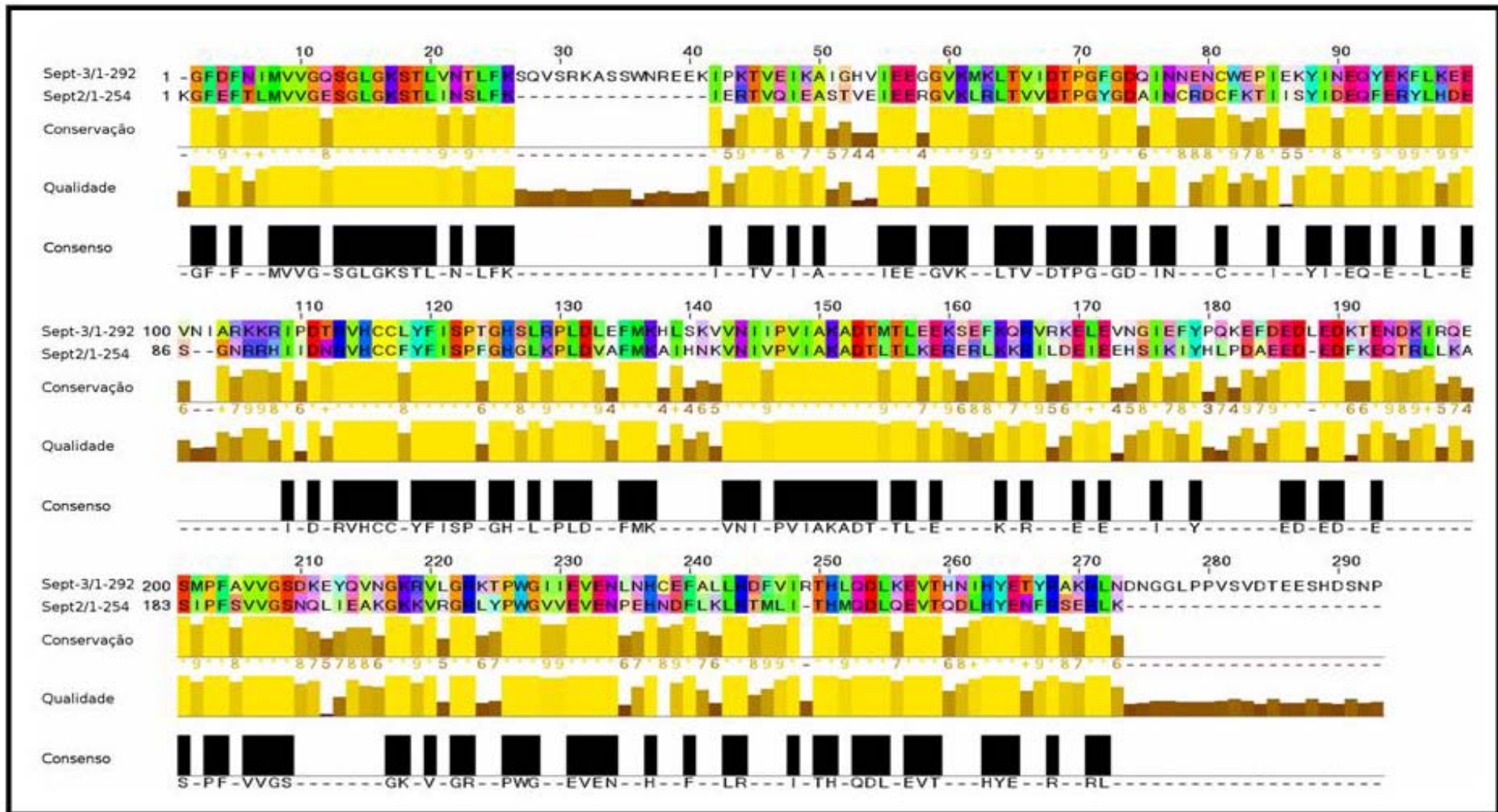


Figura 30 - Alinhamento de seqüências primárias da SEPT3 de *Homo sapiens* e da SEPT2 de *Mus musculus*. Aminoácidos com conservação superior a 30% foram coloridos segundo as regras de Taylor (157). Na parte superior das seqüências, observam-se o histograma de conservação; o histograma de qualidade, segundo a matriz de alinhamento BLOSUM62 (158); e o histograma de consenso.

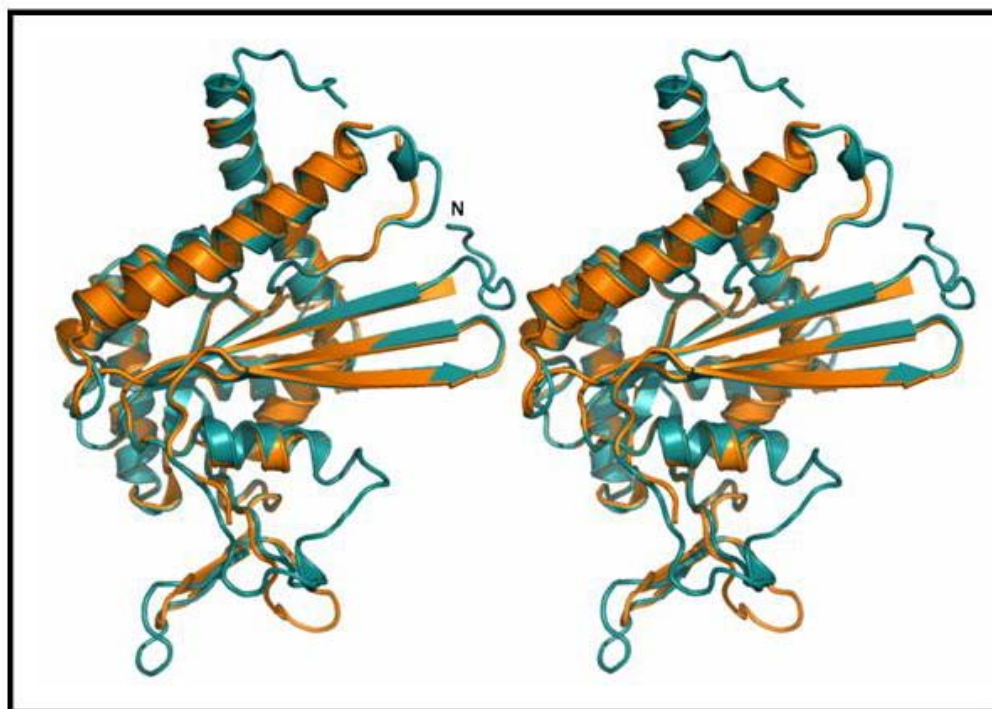


Figura 31 - Projeção esterescópica da sobreposição do modelo final de modelagem molecular da septina-3 (azul) e da estrutura cristalográfica 3FTQ (laranja). Figura produzida com o programa Pymol.

As amostras de SEPT3GC em solução utilizadas nos experimentos de espalhamento de SAXS estavam em boas condições de coleta, conforme verificado através da análise preliminar de Guinier (Figura 32). Todos os fatores de qualidade dos dados de espalhamento foram devidamente observados. A dispersão foi apropriada, sobretudo para as intensidades espalhadas em ângulos menores. A linearidade do gráfico de Guinier para $q \sim 0$ foi acompanhada de um coeficiente de correlação linear de 0,998. Os raios de giro obtidos por extrapolação de Guinier e pela regularização de parâmetros por critério percentual estão plenamente de acordo. O χ^2 resultante da sobreposição entre a curva teórica de espalhamento do modelo de DAMMIF e os dados experimentais também é excelente. Por outro lado, o χ^2 resultante da sobreposição entre a curva experimental e a curva teórica de espalhamento do modelo obtido por modelagem molecular não é plenamente satisfatório. Contudo, foi mostrado que a modelagem diminuiu o χ^2 resultante da sobreposição entre a curva teórica de espalhamento e os dados experimentais, quando comparado ao resultado obtido com a sobreposição da curva da estrutura cristalográfica da septina 2. Este comportamento já era esperado, pois SEPT2 encontra-se sensivelmente compactada pela rede cristalina em contraste com a SEPT3GC em solução. Em regime de baixíssimos ângulos, observa-se que as curvas teóricas de espalhamento, do modelo da SEPT3 e da estrutura cristalográfica, passam abaixo

da curva experimental, evidenciando um raio de giro menor do que aquele obtido para a proteína em solução (Figura 33A). A saber, os raios de giro calculado para o modelo da SEPT3 e da estrutura 3FTQ foram, respectivamente, 22,44 Å e 21,38 Å. O mesmo também ocorreu com respeito ao volume interado pelos dois modelos em relação àquele obtido para a SEPT3GC em solução. A correção destas discrepâncias pode ser realizada através do refinamento de corpo rígido do modelo contra os dados experimentais. Contudo, a adoção de tal prática não resultou em uma diminuição apreciável do χ^2 da sobreposição das curvas teórica e experimental.

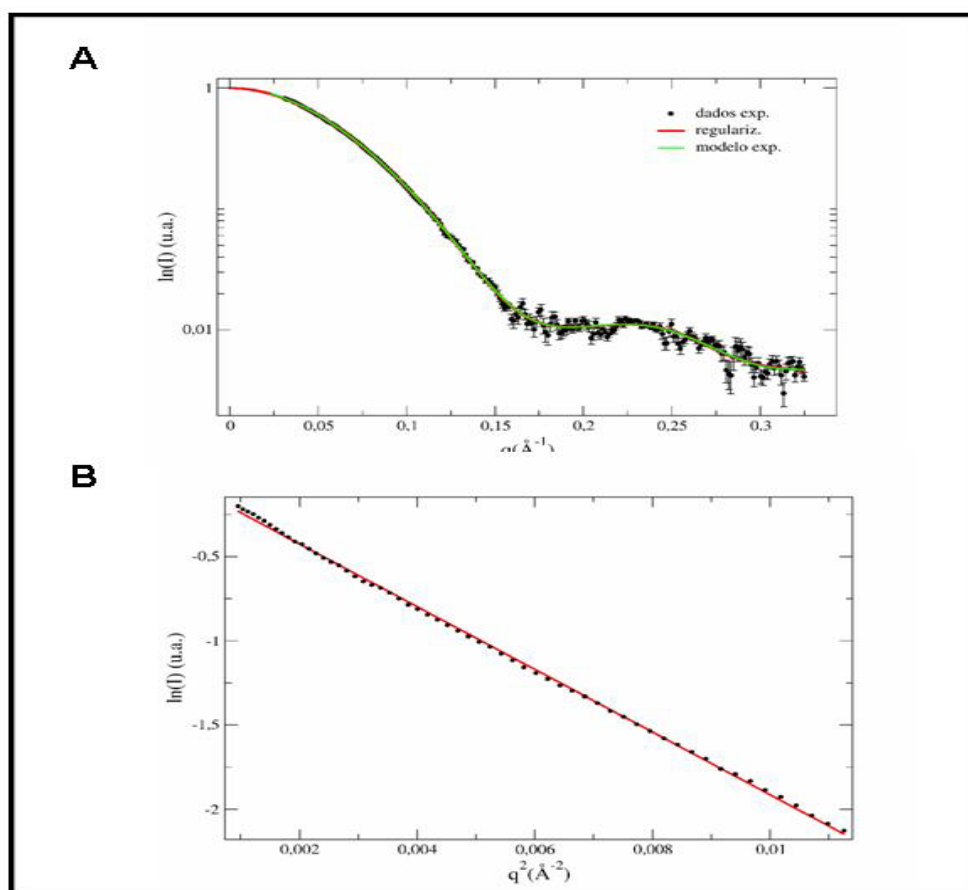


Figura 32 – Análises dos dados de SAXS coletados no LNLS com amostras de SEPT3GC. Em A, Curva de espalhamento de raios X a baixos ângulos; dados experimentais e respectivos erros, em preto; curva obtida pela regularização de parâmetros por critério percentual implementada no programa GNOM, em vermelho; a curva teórica de espalhamento do modelo de DAMMIF, em verde. Em B, Gráfico de Guinier; dados experimentais, na cor preta; e a regressão linear, na cor vermelha.

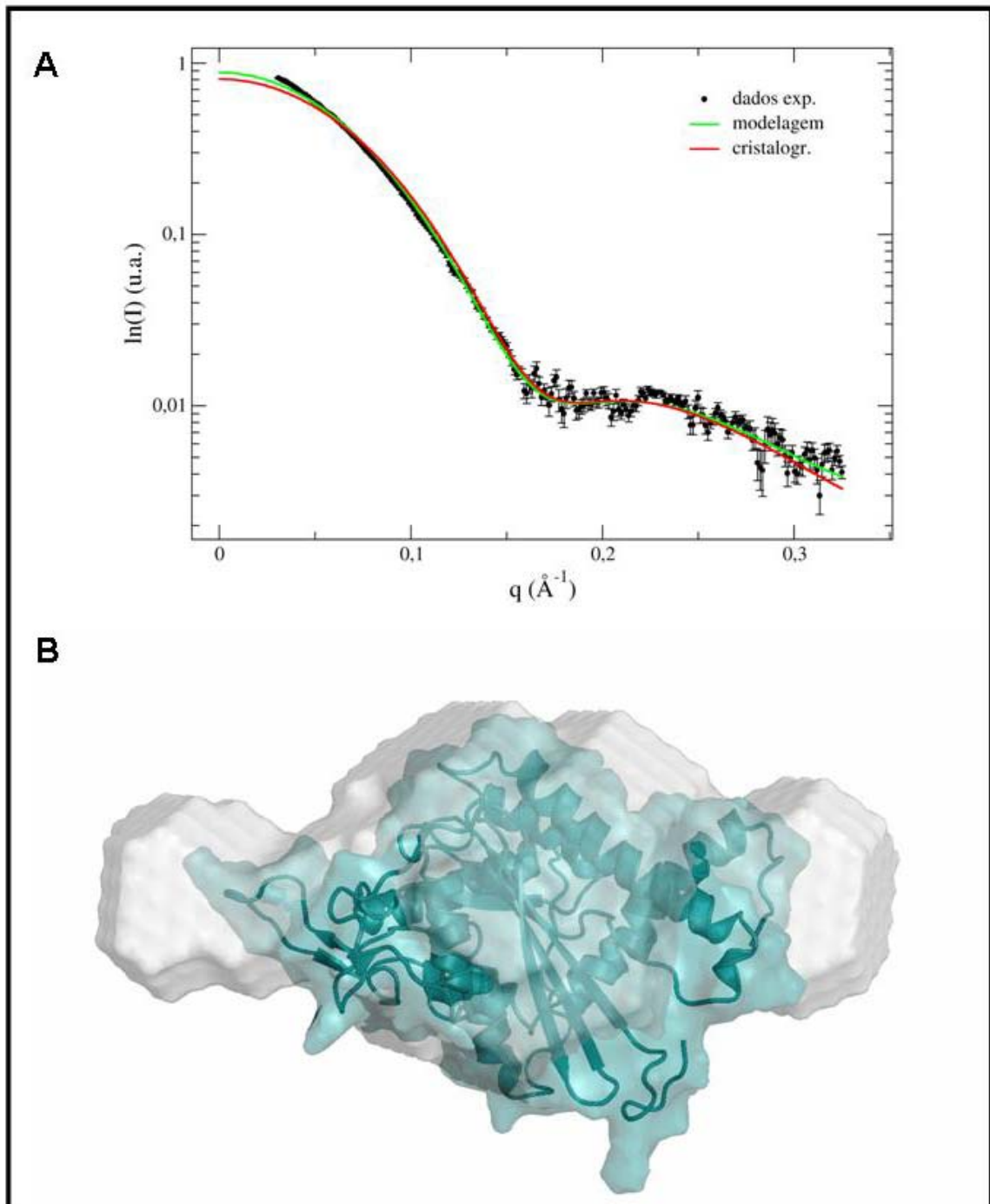


Figura 33 – Comparação entre os dados de modelagem molecular e de espalhamento de raios-X a baixos ângulos. Em A, sobreposição entre a curva experimental de espalhamento de raios X de SEPT3GC e as curvas teóricas de espalhamento do modelo de SEPT3 obtido por modelagem molecular e a estrutura cristalográfica da SEPT2 (3FTQ). Em B, sobreposição entre o modelo de SEPT3 construído por modelagem molecular e o modelo experimental obtido a partir do programa DAMMIF.

Finalmente, é importante ressaltar que os experimentos de SAXS com amostras de SEPT3GC foram devidamente reproduzidos. Ademais, tais achados também encontram-se apoiados pela estimativa da massa da SEPT3GC estimada a partir dos dados de espalhamento de baixos ângulos. A massa obtida encontra-se dentro de erros experimentais aceitáveis, o que elimina qualquer outra possibilidade de estado de oligomerização. A SEPT3GC, portanto, organiza-se como um monômero nas condições experimentais adotadas. Estes resultados, por sua vez, estão plenamente de acordo com àqueles obtidos por cromatografia de filtração em gel, nos quais SEPT3GC também apresenta-se como monômero. Portanto, o envelope molecular construído para SEPT3GC a partir de sua curva de espalhamento em solução é muito confiável (Figura 33 B)

3.3 SEPT5 e versões truncadas: testes de expressão e purificação

3.3.1 Clonagem de SEPT5 e seus domínios em vetor de expressão em bactéria

A sequência codificadora de SEPT5NGC foi isolada de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano por reação em cadeia da polimerase. O produto da reação de aproximadamente 1110 pb foi purificado e inserido no plasmídeo pTZ57R/T. Após confirmação da fidelidade sequencial por sequenciamento este clone serviu como molde para amplificar as versões da septina 5, SEPT5NG (948 pb), SEPT5 GC (987 pb) e SEPT5 G (825 pb) (Figura 34A). Em seguida os fragmentos de DNA foram inseridos no plasmídeo de propagação, pTZ57R/T, e a integridade das sequências foram confirmadas por sequenciamento. A subclonagem destes fragmentos de DNA foi realizada no plasmídeo de expressão em bactéria pET28a(+). A confirmação da clonagem foi verificada por análise do padrão de restrição dos clones como demonstrado na Figura 34B.

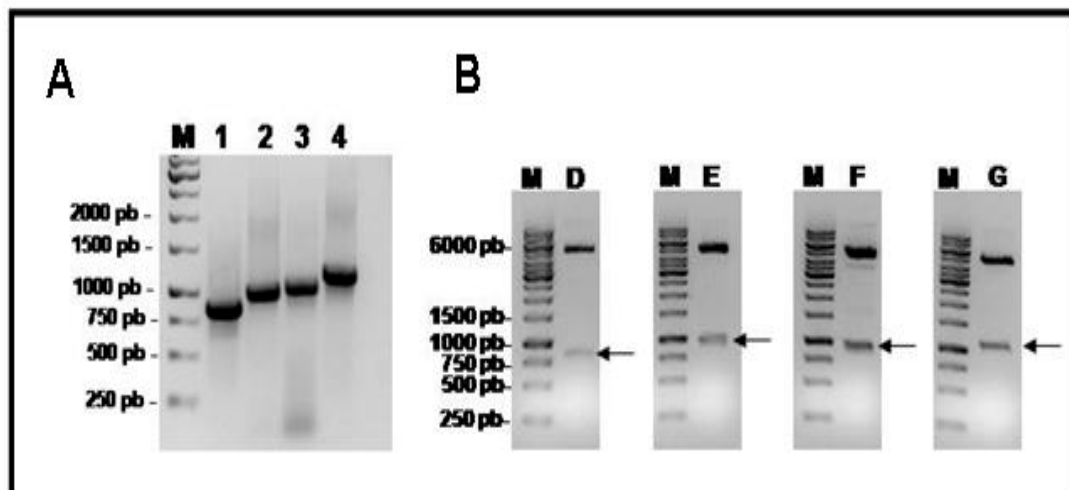


Figura 34 – Confirmação da clonagem de SEPT5 e seus domínios em pET28a(+). Em A, fragmentos de DNA amplificados por PCR. Em B, padrão de restrição dos clones em pET28a(+). 1 e D correspondem a SEPT5G; 2 e E, SEPT5NG; 3 e F, SEPT5GC e 4 e G, SEPT5NGC. M, corresponde ao marcador em pares de bases.

Alguns parâmetros físico-químicos que caracterizam SEPT5 e suas versões truncadas estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22 – Parâmetros físico-químicos de SEPT5NGC, SEPT5NG, SEPT5GC e SEPT5G

Proteína	Massa Molecular (Da)	Ponto isoelétrico (PI)	Coefficiente de extinção (€) ¹
SEPT5NGC + 6 x His	45071.5	6.56	26400 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5NGC	42776.9	6.21	26400 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5NG + 6 x His	38719.1	6.68	26400 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5NG	36424.5	6.32	26400 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5GC + 6 x His	40513.2	6.06	23420 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5GC	38218.7	5.63	23420 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5G + 6 x His	34029.6	6.13	23420 M ⁻¹ cm ⁻¹
SEPT5G	31735.1	5.69	23420 M ⁻¹ cm ⁻¹

¹Coefficiente de extinção para comprimento de onda de 280 nm

3.3.2 Expressão e purificação SEPT5G e SEPT5GC

As proteínas recombinantes SEPT5G e SEPT5GC foram eficientemente produzidas em bactérias e purificadas em duas etapas cromatográficas. Na Figura 35A e 35C observamos a presença das proteínas recombinantes SEPT5G e SEPT5GC respectivamente, na fração solúvel o que permitiu a purificação por cromatografia de afinidade sob condição nativa. As proteínas foram eficientemente retidas na resina Ni²⁺, devido à presença dos seis resíduos de histidinas na região amino-terminal.

Após a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, realizou-se a segunda etapa do processo de purificação, a cromatografia de exclusão molecular em uma coluna superdex 200 HR 10/30 (Figura 35B e 35D). Esta etapa foi adicionada para conseguir homogeneidade conformacional da amostra, pois havia o conhecimento prévio que as septinas 2 e 4 formavam agregados. Visto que as amostras de SEPT5G e SEPT5GC não estavam homogêneas, (Figura 35E e 35F), foram realizadas algumas modificações no procedimento de purificação das proteínas na tentativa de homogeneizá-las.

Na Tabela 12 (item 2.3.3) estão descritas as alterações realizadas no procedimento de purificação das proteínas, centradas principalmente em modificações na força iônica da solução tampão e na adição de agente redutor. Dos testes realizados, o de número 7 foi o que apresentou melhor resultado para SEPT5G. Neste teste, a solução tampão continha tris 25 mM, pH 7,8, glicerol 10%, NaCl 20 mM e 5 mM β-mercaptoetanol. O perfil de SEPT5G em gel nativo é apresentado na Figura 36, onde nota-se a presença de duas bandas indicando que a proteína encontrava-se em duas formas oligoméricas. Apesar de nesta condição de purificação o perfil da proteína foi o melhor obtido, este resultado não foi reproduzível, sugerindo instabilidade da amostra. Para SEPT5GC nenhum dos testes realizados melhorou a condição da proteína em solução.

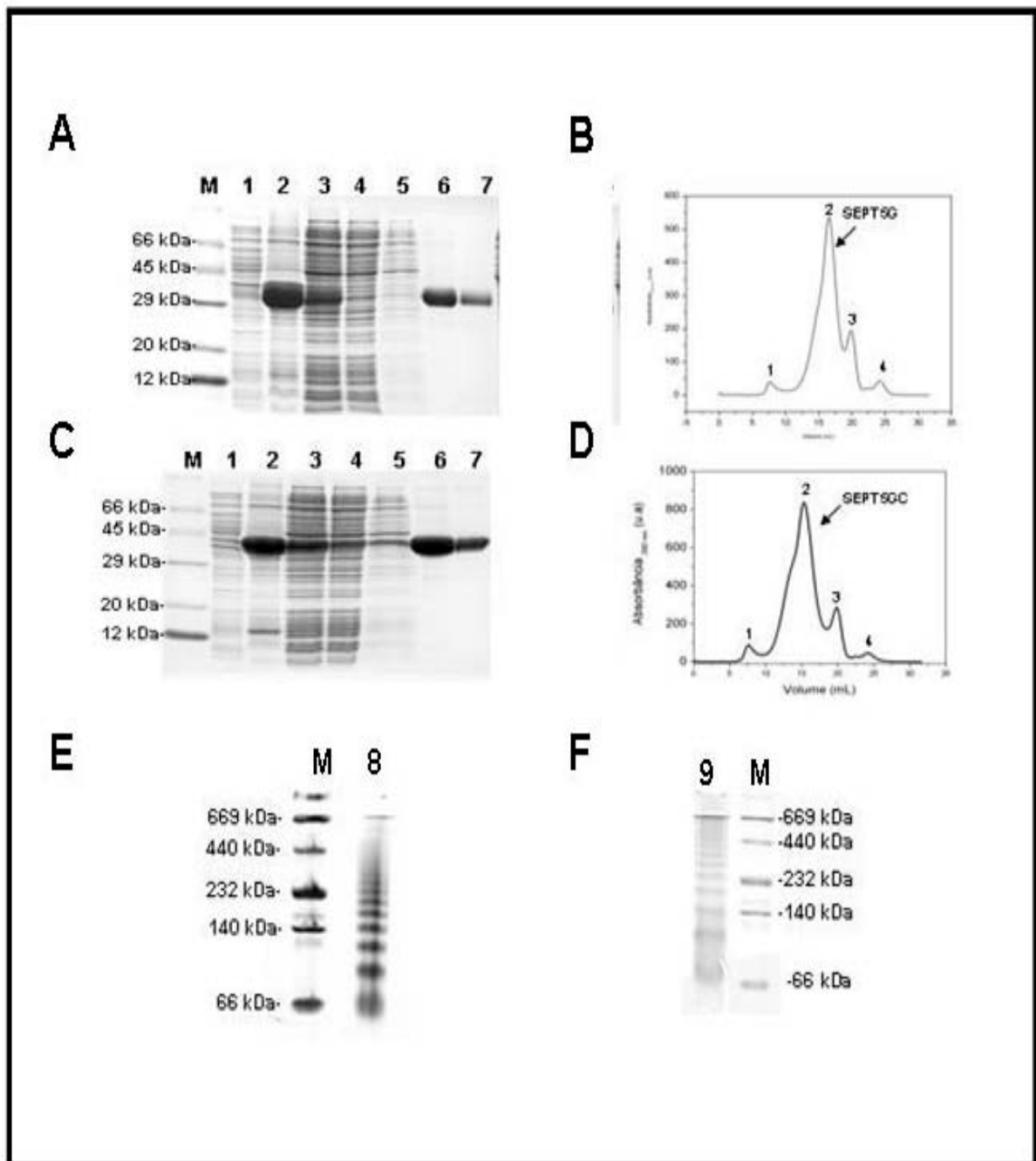


Figura 35 - Análise da expressão e purificação de SEPT5G e SEPT5GC. A e C correspondem a eletroforese sob condições desnaturantes de SEPT5G e SEPT5GC, respectivamente. Canaleta 1 corresponde ao extrato protéico bruto de bactéria antes da adição de IPTG; 2, fração insolúvel após a lise celular; 3, fração solúvel; 4 fração solúvel após passar pela resina de afinidade; 5, eluato da etapa de lavagem da coluna com tampão contendo 12 mM de imidazol; 6, proteína eluída da resina Ni^{2+} e 7, proteína eluída da coluna superdex 200 da cromatografia de exclusão molecular. Em B e D cromatogramas da segunda etapa da purificação de SEPT5G e GC, respectivamente, nos quais 2 indica o pico correspondente a proteína de interesse; 1, 3 e 4 correspondem a fração excluída da coluna, GDP e imidazol, respectivamente. E e F, perfil eletroforético sob condições nativa de SEPT5G (canaleta 8) e SEPT5GC (canaleta 9), respectivamente. M, corresponde aos padrões em massa molecular.

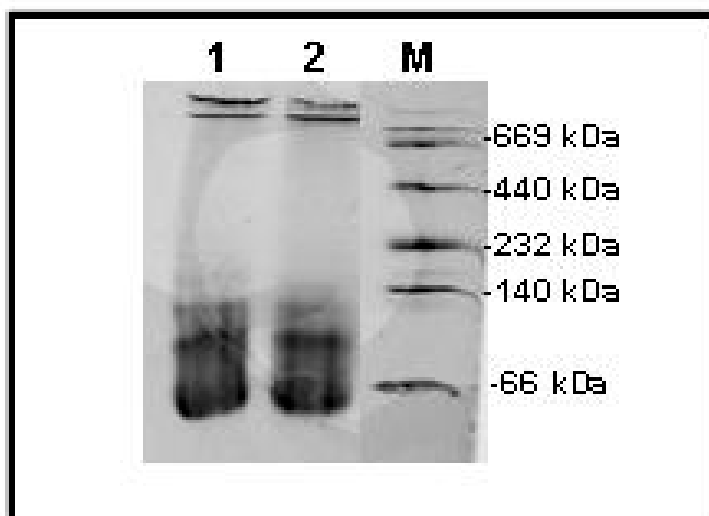


Figura 36 - Eletroforese de SEPT5G em condição nativa. M, corresponde ao padrão em massa molecular. 1 e 2 correspondem a SEPT5G após purificação em solução tampão tris 25 mM, pH 7,8, glicerol 10%, NaCl 20 mM e 5 mM β -mercaptoetanol, condição estabelecida pelo sétimo teste de purificação.

3.3.3 SEPT5NGC e SEPT5NG: expressão e purificação

SEPT5NG e SEPT5NGC recombinantes também foram expressas em bactéria, porém a maior proporção das proteínas se encontrava na fração insolúvel do extrato protéico das bactérias (Figura 37A e 37C). O procedimento de purificação foi idêntico ao realizado para SEPT5G e SEPT5GC, entretanto para essas duas versões de SEPT5 foram realizados apenas o primeiro teste de purificação, em que a solução tampão não continha sal e nem agente redutor, e o sétimo, que correspondeu a melhor condição para SEPT5G (Tabela 12, item 2.3.3). Na Figura 37B e 37D observa que nos cromatogramas o pico correspondente a proteína de interesse é muito largo, típico de amostras que não estão homogêneas. A dificuldade para trabalhar com septinas inteiras ou com versões contendo o domínio amino-terminal já era conhecida pelos relatos de Garcia referente a SEPT4 (68). Este domínio em SEPT5 é rico em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (quase 50%) e, além disso, a predição de estrutura secundária mostra que este domínio é desestruturado, como foi observado para SEPT4.

Mediante as dificuldades para obter amostras de SEPT5NGC e de seus domínios em condições adequadas para realizar as análises propostas, optou-se por dedicar os esforços nas análises com SEPT3.

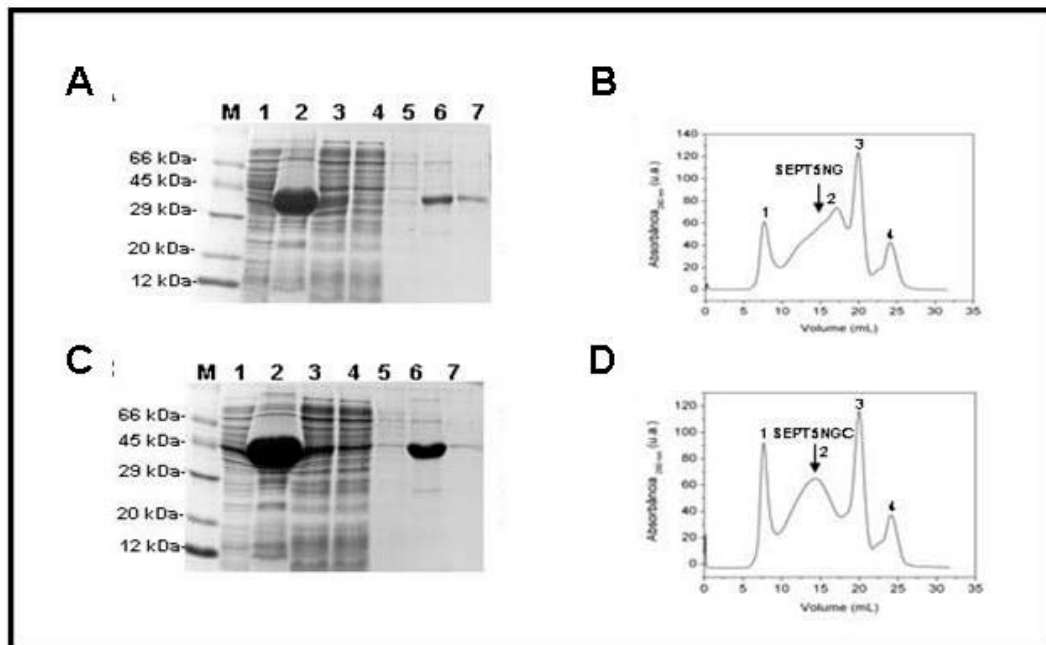


Figura 37- Análise da expressão e purificação de SEPT5NG e SEPT5NGC. A e C correspondem ao perfil em eletroforese sob condições desnaturante de SEPT5NG e SEPT5NGC, respectivamente. Canaleta 1 corresponde ao extrato protéico bruto de bactéria antes da adição de IPTG; 2, fração insolúvel após a lise celular; 3, fração solúvel; 4 fração solúvel após passar pela resina de afinidade; 5, eluato da lavagem da resina com tampão contendo 12 mM de imidazol; 6, proteína eluída da resina Ni^{2+} e 7, proteína eluída da coluna superdex 200 (pico 2). Em B e D perfil cromatográfico de SEPT5NG e SEPT5NGC em uma coluna Superdex 200 de exclusão molecular, respectivamente. 2 corresponde ao pico da proteína de interesse; 1, 3 e 4 correspondem as frações de exclusão, ao GDP e o imidazol, respectivamente.

CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a busca de parceiros protéicos para as septinas humanas 1, 5 e 7. Estas proteínas tiveram como principais parceiros outras septinas que em geral corresponderam às septinas pertencentes a grupos diferentes das septinas usadas como iscas no ensaio do duplo híbrido em leveduras. Os resultados obtidos seguiram as regras propostas por Kinoshita, nas quais as posições de septinas dentro do complexo trimérico, formado pelas septinas 7, 6 e 2, poderiam ser substituídas por septinas do mesmo grupo. Baseado em outros complexos de septinas já relatados na literatura e em algumas interações identificadas neste trabalho, foi proposto um novo modelo para o trímero no qual septinas do grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) poderiam substituir SEPT2 ou SEPT6 no trímero, SEPT7-SEPT6-SEPT2. Poucos parceiros protéicos diferentes de septinas foram identificados, mas as funções por eles executadas estão envolvidas a processos celulares em que septinas, não só de humanos, mas também de outros organismos, já foram relacionadas. Resumidamente estes resultados confirmam a preferência das septinas de interagirem entre si, mas apesar da necessidade de validação experimental para as interações aqui apresentadas, algumas evidências fortalecem as descobertas, como o teste qualitativo da força relativa das interações e a representabilidade de alguns parceiros protéicos na varredura do ensaio do duplo híbrido. Os resultados apresentados referentes a busca de parceiros protéicos para SEPT1, SEPT5 e SEPT7 fazem parte do projeto do “interactoma das septinas”, o qual resultou na identificação de parceiros de interação para 10 das 14 septinas de humano. Os resultados foram reunidos em um artigo científico sob o título “*A draft of the human septin interactome*” que foi recentemente submetido a publicação.

Os estudos biofísicos com SEPT3 foram realizados com sucesso, sendo possível estabelecer um sistema de expressão e purificação eficiente que permitiu realizar as análises biofísicas. SEPT3GC apresentou-se em solução como monômero e na forma apo, duas características que a distingue de outras septinas humanas já caracterizadas, as quais são purificadas apenas como dímeros e associadas ao nucleotídeo. A purificação de SEPT3GC na forma apo permitiu realizar um estudo da afinidade desta proteína por GTP γ S por meio de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica. A afinidade de SEPT3GC por GTP γ S foi similar ao observado para outras septinas e para algumas Rho GTPases. Esta afinidade, como foi observado para várias GTPases e para SEPT2, é dependente de íons Mg²⁺, o que

pode ter uma função na manutenção da estabilidade conformacional da proteína. SEPT3GC diferentemente de outras septinas não dimerizou após associação a nucleotídeo, pelo menos nas condições ensaiadas. A eficiência em hidrolisar GTP foi verificada, mas os experimentos não permitiram obter dados quantitativos desta atividade. A capacidade de SEPT3GC ligar e hidrolisar GTP, assim como observado para outras septinas, foi independente de proteínas auxiliares como fatores de troca de nucleotídeos (GEF). A modelagem molecular e a predição do teor de estrutura secundária baseados nas análises de dicroísmo circular mostram que SEPT3GC como outras septinas são compostas de uma misturas de α -hélice e estruturas- β na qual a composição é afetada por pHs extremamente básicos ou ácidos. Ensaio de cristalização com SEPT3GC foram realizados, mas até o momento o melhor cristal obtido difratou a uma resolução de aproximadamente 6 °A, o que não permitiu obter dados estruturais. A realização de uma investigação preliminar da natureza dos agregados formados por SEPT3GC sob variação de temperatura resultou na ligação a tioflavina-T, uma sonda específica para agregados do tipo amilóide. Resumidamente os resultados aqui apresentados mostram que SEPT3GC apresenta algumas características que a diferencia das septinas humanas já caracterizadas: encontra-se em solução na forma monomérica e apo e após a associação ao nucleotídeo conserva-se no estado monomérico, sugerindo que a ligação ao nucleotídeo não está regulando sua oligomerização. Já a ligação a tioflavina-T, sugere a possível formação de agregados do tipo amilóide, que são comumente relacionadas a algumas anomalias neurodegenerativas. Este resultado abre espaço para novas linhas de investigação futura, visto que já há relatos do envolvimento de SEPT3 com a doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 66, n. 2, p. 352-359, 1970.
- 2 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*, v. 69, n. 2, p. 265-276, 1971.
- 3 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; PRINGLE, J. R.; REID, B. J. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974.
- 4 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *The Journal of Cell Biology*, v. 69, n. 3, p. 717-721, 1976.
- 5 HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 10, p. 3678-3687, 1987.
- 6 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *The Journal of Cell Biology*, v. 112, n. 4, p. 535-544, 1991.
- 7 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends in Cell Biology*, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.
- 8 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 6, p. 478-489, 2008.
- 9 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 6, p. 681-689, 2001.
- 10 FRAZIER, J. A.; WONG, M. L.; LONGTINE, M. S.; PRINGLE, J. R.; MANN, M.; MITCHISON, T. J.; FIELD, C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *The Journal of Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 737-749, 1998.

- 11 MORTENSEN, E. M.; MCDONALD, H.; YATES, J.; KELLOGG, D. R. Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 6, p. 2091-2105, 2002.
- 12 CARROLL, C. W.; ALTMAN, R.; SCHIELTZ, D.; YATES, J. R.; KELLOGG, D. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *The Journal of Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 709-717, 1998.
- 13 VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *The Journal of Cell Biology*, v. 164, n. 5, p. 701-715, 2004.
- 14 VERSELE, M.; GULLBRAND, B.; SHULEWITZ, M. J.; CID, V. J.; BAHMANYAR, S.; CHEN, R. E.; BARTH, P.; ALBER, T.; THORNER, J. Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 10, p. 4568-4583, 2004.
- 15 FARKASOVSKY, M.; HERTER, P.; VOSS, B.; WITTINGHOFER, A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biological Chemistry*, v. 386, n. 7, p. 643-656, 2005.
- 16 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P.; PARK, S. S.; GARCIA, G.; PATANWALA, I.; Ng, H. L.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.
- 17 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends in Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.
- 18 DE VIRGILIO, C.; DEMARINI, D. J.; PRINGLE, J. R. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology*, v. 142, n.10, p. 2897-2905, 1996.
- 19 FARES, H.; GOETSCH, L.; PRINGLE, J. R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, v. 132, n. 3, p. 399-411, 1996.
- 20 DOUGLAS, L. M.; ALVAREZ, F. J.; MCCREARY, C.; KONOPKA, J. B. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 9, p. 1503-1512, 2005.

- 21 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, v. 77, n. 3, p. 371-379, 1994.
- 22 FIELD, C. M.; ALAWAR, O.; ROSENBLATT, J.; WONG, M. L.; ALBERTS, B.; MITCHISON, T. J. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *The Journal of Cell Biology*, v. 133, n. 3, p. 605-616, 1996.
- 23 NGUYEN, T. Q.; SAWA, H.; OKANO, H.; WHITE, J. G. The *C-elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000.
- 24 FINGER, F. P.; KOPIK, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C-elegans*. *Developmental Biology*, v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.
- 25 JOHN, C. M.; HITE, R. K.; WEIRICH, C. S.; FITZGERALD, D. J.; JAWHARI, H.; FATY, M.; SCHLAPFER, D.; KROSCHEWSKI, R.; WINKLER, F. K.; WALZ, T.; BARRAL, Y.; STEINMETZ, M. O. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *The EMBO Journal*, v. 26, n. 14, p. 3296-3307, 2007.
- 26 MCILHATTON, M. A.; BURROWS, J. F.; DONAGHY, P. G.; CHANDULLOY, S.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. E. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene*, v. 20, n. 41, p. 5930-5939, 2001.
- 27 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n.6, p. 511 - 524, 2010.
- 28 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111-4113, 2002.
- 29 MARTINEZ, C.; WARE, J. Mammalian septin function in hemostasis and beyond. *Experimental Biology and Medicine*, v. 229, n. 11, p. 1111-1119, 2004.
- 30 PETERSON, E. A.; KALIKIN, L. M.; STEELS, J. D.; ESTEY, M. P.; TRIMBLE, W. S.; PETTY, E. M. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mammalian Genome*, v. 18, n. 11, p. 796-807, 2007.

- 31 MARTINEZ, C.; CORRAL, J.; DENT, J. A.; SESMA, L.; VICENTE, V.; WARE, J. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 4, n. 6, p. 1388-1395, 2006.
- 32 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. *Current Biology*, v. 9, n. 24, p. 1458-1467, 1999.
- 33 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. *The Journal of Pathology*, v. 204, n. 4, p. 489-505, 2004.
- 34 RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Do septins have a role in cancer? *British Journal of Cancer*, v. 93, n. 5, p. 499-503, 2005.
- 35 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 114, n.5, p. 839-844, 2001.
- 36 LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, v. 317, n. 1, p. 41-72, 2002.
- 37 BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The gtpase superfamily - conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, v. 349, n. 6305, p. 117-127, 1991.
- 38 SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-Loop - a common motif in Atp-Binding and Gtp-Binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 15, n. 11, p. 430-434, 1990.
- 39 VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 32, n. 1, p. 1-56, 1999.
- 40 DEVER, T. E.; GLYNIAS, M. J.; MERRICK, W. C. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 84, n. 7, p. 1814-1818, 1987.
- 41 KINOSHITA, M. The septins. *Genome Biology*, v. 4, n. 11, artigo 236, 2003. doi:10.1186/gb-2003-4-11-236

- 42 KINOSHITA, N.; KIMURA, K.; MATSUMOTO, N.; WATANABE, M.; FUKAYA, M.; IDE, C. Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells*, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2004.
- 43 BEITES, C. L.; XIE, H.; BOWSER, R.; TRIMBLE, W. S. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 5, p. 434-439, 1999.
- 44 KINOSHITA, M.; FIELD, C. M.; COUGHLIN, M. L.; STRAIGHT, A. F.; MITCHISON, T. J. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Developmental Cell*, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 45 SHEFFIELD, P. J.; OLIVER, C. J.; KREMER, B. E.; SHENG, S.; SHAO, Z.; MACARA, I. G. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.
- 46 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*, v. 449, n. 7160, p. 311-315, 2007.
- 47 CAO, L.; YU, W.; WU, Y.; YU, L. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 20, p. 3309-3323, 2009.
- 48 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *The Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.
- 49 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.
- 50 FUJISHIMA, K.; KIYONARI, H.; KURISU, J.; HIRANO, T.; KENGAKU, M. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 102, n. 1, p. 77-92, 2007.
- 51 LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A.; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008.
- 52 NAGATA, K.; ASANO, T.; NOZAWA, Y.; INAGAKI, M. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *The Journal of Biological Chemistry* v. 279, n. 53, p. 55895-55904, 2004.

- 53 SPILIOTIS, E. T.; KINOSHITA, M.; NELSON, W. J. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.
- 54 ZHU, M. et al. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 27, p. 18916-18925, 2008.
- 55 ITO, H.; ATSUZAWA, K.; MORISHITA, R.; USUDA, N.; SUDO, K.; IWAMOTO, I.; MIZUTANI, K.; KATOH-SEMBA, R.; NOZAWA, Y.; ASANO, T.; NAGATA, K. Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *Journal of Neurochemistry*, v. 108, n. 4, p. 867-880, 2009.
- 56 BEITES, C. L.; CAMPBELL, K. A.; TRIMBLE, W. S. The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochemical Journal*, v. 385, p. 347-353, 2005. doi: 10.1042/BJ20041090.
- 57 HSU, S. C.; HAZUKA, C. D.; ROTH, R.; FOLETTI, D. L.; HEUSER, J.; SCHELLER, R. H. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*, v. 20, n. 6, p. 1111-1122, 1998.
- 58 HUANG, Y. W.; YAN, M.; COLLINS, R. F.; DICICCIO, J. E.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W. S. Mammalian septins are required for phagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 4, p. 1717-1726, 2008.
- 59 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n. 6, p. 511-524, 2010.
- 60 KINOSHITA, M.; KUMAR, S.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; KINOSHITA, A.; HARAGUCHI, T.; HIRAOKA, Y.; NODA, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development*, v. 11, n. 12, p. 1535-1547, 1997.
- 61 NAGATA, K.; KAWAJIRI, A.; MATSUI, S.; TAKAGISHI, M.; SHIROMIZU, T.; SAITOH, N.; IZAWA, I.; KIYONO, T.; ITOH, T. J.; HOTANI, H.; INAGAKI, M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 20, p. 18538-18543, 2003.

62 CHACKO, A. D.; HYLAND, P. L.; CHURCH, S. W.; PENTLAND, N. L.; RUSSELL, S. H.; HALL, P. A. Septin 9 expression affects the actin cytoskeleton via Cdc42 activity. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n.21, p. 386a-387a, 2004.

63 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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 91, n. 5, p. 959-966, 2004.

64 GOTTFRIED, Y.; ROTEM, A.; LOTAN, R.; STELLER, H.; LARISCH, S. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *The EMBO Journal*, v. 23, n. 7, p. 1627-1635, 2004.

65 LARISCH, S. et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nature Cell Biology*, v. 2, n. 12, p. 915-921, 2000.

66 ZHANG, Y.; GAO, J.; CHUNG, K. K.; HUANG, H.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 97, n. 24, p. 13354-13359, 2000.

67 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. *American Journal of Pathology*, v. 153, n. 5, p. 1551-1560, 1998.

68 GARCIA, W.; DE ARAUJO, A. P.; OLIVEIRA NETO, M.; 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*, v. 45, n. 46, p. 13918-13931, 2006.

69 CAPURSO, G.; CRNOGORAC-JURCEVIC, T.; MILIONE, M.; PANZUTO, F.; CAMPANINI, N.; DOWEN, S. E.; DI FLORIO, A.; SETTE, C.; BORDI, C.; LEMOINE, N. R.; DELLE FAVE, G. Peanut-like 1 (septin 5) gene expression in normal and neoplastic human endocrine pancreas. *Neuroendocrinology*, v. 81, n. 5, p. 311-321, 2005.

70 KIM, D. S.; HUBBARD, S. L.; PERAUD, A.; SALHIA, B.; SAKAI, K.; RUTKA, J. T. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. *Neoplasia*, v. 6, n. 2, p. 168-178, 2004.

71 BURROWS, J. F.; CHANDULOY, S.; MCILHATTON, M. A.; NÁGAR, H.; YEATES, K.; DONAGHY, P.; PRICE, J.; GODWIN, A. K.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. E.

Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *The Journal of Pathology*, v. 201, n. 4, p. 581-588, 2003.

72 YU, W. B.; DING, X. M.; CHEN, F.; LIU, M.; SHEN, S. Q.; GU, X.; YU, L. The phosphorylation of SEPT2 on Ser218 by casein kinase 2 is important to hepatoma carcinoma cell proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 325, n. 1-2, p. 61-67, 2009.

73 CRAVEN, R. A.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; HARNDEN, P.; STANLEY, A. J.; MAHER, E. R.; HARRIS, A. L.; TRIMBLE, W. S.; SELBY, P. J.; BANKS, R. E. Proteomic identification of a role for the von Hippel Lindau tumour suppressor in changes in the expression of mitochondrial proteins and septin 2 in renal cell carcinoma. *Proteomics*, v. 6, n. 13, p. 3880-3893, 2006.

74 HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. Expression profiling the human septin gene family. *The Journal of Pathology*, v. 206, n. 3, p. 269-278, 2005.

75 KATO, Y.; UZAWA, K.; YAMAMOTO, N.; KOUZU, Y.; KOIKE, H.; SHIIBA, M.; BUKAWA, H.; YOKOE, H.; SHIBAHARA, T.; TANZAWA, H. Overexpression of Septin 1: possible contribution to the development of oral cancer. *International Journal of Oncology*, v. 31, n. 5, p. 1021-1028, 2007.

76 QI, M.; YU, W.; LIU, S.; JIA, H.; TANG, L.; SHEN, M.; YAN, X.; SAIYIN, H.; LANG, Q.; WAN, B.; ZHAO, S.; YU, L. Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 336, n. 3, p. 994-1000, 2005.

77 BEITES, C. L.; PENG, X. R.; TRIMBLE, W. S. Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. *Methods in Enzymology*, v. 329, p. 499-510, 2001. doi:10.1016/S0076-6879(01)29111-3.

78 TANIGUCHI, M.; TAOKA, M.; ITAKURA, M.; ASADA, A.; SAITO, T.; KINOSHITA, M.; TAKAHASHI, M.; ISOBE, T.; HISANAGA, S. Phosphorylation of adult type Sept5 (CDCrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 11, p.7869-7876, 2007.

79 DENT, J.; KATO, K.; PENG, X. R.; MARTINEZ, C.; CATTANEO, M.; POUJOL, C.; NURDEN, P.; NURDEN, A.; TRIMBLE, W. S.; WARE, J. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 99, n. 5, p. 3064-3069, 2002.

- 80 CHOI, P. et al. SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Molecular Brain Research*, v. 117, n. 2, p. 179-189, 2003.
- 81 TATSUMI, K.; TAKI, T.; TANIWAKI, M.; NAKAMURA, H.; TAGUCHI, J.; CHEN, Y. Z.; BESSHO, F.; YANAGISAWA, M.; HAYASHI, Y. The CDCREL1 gene fused to MLL in de novo acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q11.2) and its frequent expression in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 30, n. 3, p. 230-235, 2001.
- 82 XUE, J.; WANG, X.; MALLADI, C. S.; KINOSHITA, M.; MILBURN, P. J.; LENGYEL, I.; ROSTAS, J. A.; ROBINSON, P. J. Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 14, p. 10047-10056, 2000.
- 83 XUE, J.; TSANG, C. W.; GAI, W. P.; MALLADI, C. S.; TRIMBLE, W. S.; ROSTAS, J. A.; ROBINSON, P. J. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, v. 91, n. 3, p. 579-590, 2004.
- 84 SMILLIE, K. J.; COUSIN, M. A. Dynamin I phosphorylation and the control of synaptic vesicle endocytosis. *Biochemical Society Symposia*, n. 72, p. 87-97, 2005.
- 85 XUE, J.; MILBURN, P. J.; HANNA, B. T.; GRAHAM, M. E.; ROSTAS, J. A.; ROBINSON, P. J. Phosphorylation of septin 3 on Ser-91 by cGMP-dependent protein kinase-I in nerve terminals. *Biochemical Journal*, v. 381, p. 753-760, 2004. doi:10.1042/BJ20040455
- 86 TAKEHASHI, M.; ALIOTO, T.; STEDEFORD, T.; PERSAD, A. S.; BANASIK, M.; MASLIAH, E.; TANAKA, S.; UEDA, K. Septin 3 gene polymorphism in Alzheimer's disease. *Gene Expression*, v. 11, n. 5-6, p. 263-270, 2004.
- 87 XIE, Y.; VESSEY, J. P.; KONECNA, A.; DAHM, R.; MACCHI, P.; KIEBLER, M. A. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.
- 88 SUGINO, Y.; ICHIOKA, K.; SODA, T.; IHARA, M.; KINOSHITA, M.; OGAWA, O.; NISHIYAMA, H. Septins as diagnostic markers for a subset of human asthenozoospermia. *The Journal of Urology*, v. 180, n. 6, p. 2706-2709, 2008.
- 89 CAUSIER, B.; DAVIES, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 6, p. 855-870, 2002.

- 90 BARTEL, P. L.; FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods in Enzymology*, v. 254, p. 241-263, 1995. doi: 10.1016/0076-6879(95)54018-0.
- 91 SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 92 ASSMANN, E. M.; ALBORGHETTI, M. R.; CAMARGO, M. E. R.; KOBARG, J. FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 15, p. 9869-9881, 2006.
- 93 ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact yeast-cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, v. 153, n. 1, p. 163-168, 1983.
- 94 LING, M.; MERANTE, F.; ROBINSON, B. H. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, v. 23, n. 23, p. 4924-4925, 1995.
- 95 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- 96 BATEMAN, A.; COIN, L.; DURBIN, R.; FINN, R. D.; HOLLICH, V.; GRIFFITHS-JONES, S.; KHANNA, A.; MARSHALL, M.; MOXON, S.; SONNHAMMER, E. L.; STUDHOLME, D. J.; YEATS, C.; EDDY, S. R. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. D138-D141, 2004. doi: 10.1093/nar/gkh121.
- 97 MARTINEZ, C.; SANJUAN, M. A.; DENT, J. A.; KARLSSON, L.; WARE, J. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochemical Journal*, v. 382, p. 783-791, 2004. doi: 10.1042/BJ20040372.
- 98 GASTEIGER, E.; C., H.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the expasy server. In: WALKER, John M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. New Jersey: Humana Press, 2005.
- 99 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

- 100 COMPTON, L. A.; JOHNSON JUNIOR, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry*, v. 155, n. 1, p. 155-167, 1986.
- 101 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science*, v. 8, n. 2, p. 370-380, 1999.
- 102 YANG, J. T.; WU, C. S.; MARTINEZ, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods in Enzymology*, v. 130, p. 208-269, 1986.
- 103 KELLERMANN, G.; VICENTIN, F.; TAMURA, E.; ROCHA, M.; TOLENTINO, H.; BARBOSA, A.; CRAIEVICH, A.; TORRIANI, I. The small-angle x-ray scattering beamline of the brazilian synchrotron light laboratory. *Journal of Applied Crystallography*, v. 30, p. 880 - 883, 1997. doi:10.1107/S0021889897001829.
- 104 HAMMERSLEY, A. P. *FIT2D: an introduction and overview*. Grenoble: ESRF Internal Report, ESRF97HA02T, 1997.
- 105 HAMMERSLEY, A. P. *FIT2D V9.129 reference manual V3.1*. Grenoble: ESRF Internal Report, ESRF98HA01T, 1998.
- 106 KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M. V.; VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. ATASAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, v. 39, n.2, p. 277-286, 2006.
- 107 FISCHER, H.; OLIVEIRA NETO, M.; NAPOLITANO, H. B.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. F. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *Journal of Applied Crystallography*, v. 43, p. 101-109 2010. doi:10.1107/S0021889809043076.
- 108 SECKLER, R.; WU, G. M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate. formation and assembly of a stoichiometric complex. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 13, p. 7655-7661, 1990.
- 109 BRANDEN, C.; TOOZE, J. *Introduction to protein structure: prediction, engineering and design of protein structure*. New York: Garland Publishing, 1991. p. 247 - 266.
- 110 GARCIA, W.; DE ARAUJO, A. P.; LARA, F.; FOGUEL, D.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase

domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro. *Biochemistry*, v. 46, n. 39, p. 11101-11109, 2007.

111 FASHENA, S. J.; SEREBRIISKII, I.; GOLEMIS, E. A. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene*, v. 250, n. 1-2, p. 1-14, 2000.

112 SILVA, N. C. *Estudos das interações da septina 4 humana*. 2009. 113p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

113 CRIEKINGE, W.van; BEYAERT, R. Yeast two-hybrid: state of the art. *Biological Procedures Online*, v. 2, n. 1, p. 1-38, 1999.

114 PENG, X. R.; JIA, Z.; ZHANG, Y.; WARE, J.; TRIMBLE, W. S. The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, n. 1, p. 378-387, 2002.

115 DING, X.; YU, W.; LIU, M.; SHEN, S.; CHEN, F.; CAO, L.; WAN, B.; YU, L. GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. *Molecules and Cells*, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2008.

116 BLASER, S.; JERSCH, K.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; BUSSE, A.; ZIEGER, B. The human platelet septin CDCrel-1 interacts with KIAA0202, another human platelet septin. *Blood*, v. 100, n. 11, p. 478a-478a, 2002.

117 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. *The Journal of Pathology*, v. 210, n. 1, p. 103-110, 2006.

118 DING, X.; YU, W.; LIU, M.; SHEN, S.; CHEN, F.; WAN, B.; YU, L. SEPT12 interacts with SEPT6 and this interaction alters the filament structure of SEPT6 in Hela cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 6, p. 973-978, 2007.

119 DOXSEY, S. Re-evaluating centrosome function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 9, p. 688-698, 2001.

120 COMPTON, D. A. Spindle assembly in animal cells. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, p. 95-114, 2000. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.95.

- 121 GUASCH, G.; MACK, G. J.; POPOVICI, C.; DASTUGUE, N.; BIRNBAUM, D.; RATTNER, J. B.; PEBUSQUE, M. J. FGFR1 is fused to the centrosome-associated protein CEP110 in the 8p12 stem cell myeloproliferative disorder with t(8;9)(p12;q33). *Blood*, v. 95, n. 5, p. 1788-1796, 2000.
- 122 OU, Y. Y.; MACK, G. J.; ZHANG, M. F.; RATTNER, J. B. CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation. *Journal of Cell Science*, v. 115, n. 9, p. 1825-1835, 2002.
- 123 HANISCH, A.; SILLJE, H. H. W.; NIGG, E. A. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. *The Embo Journal*, v. 25, n. 23, p. 5504-5515, 2006.
- 124 WELBURN, J. P. I.; GRISHCHUK, E. L.; BACKER, C. B.; WILSON-KUBALEK, E. M.; YATES, J. R.; CHEESEMAN, I. M. The human kinetochore ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility. *Developmental Cell*, v. 16, n. 3, p. 374-385, 2009.
- 125 SURKA, M. C.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 10, p. 3532-3545, 2002.
- 126 WEAVER, B. A. A.; BONDAY, Z. Q.; PUTKEY, F. R.; KOPS, G. J. P. L.; SILK, A. D.; CLEVELAND, D. W. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *Journal of Cell Biology*, v. 162, n. 4, p. 551-563, 2003.
- 127 THEIS, M. et al. Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *The Embo Journal*, v. 28, n. 10, p. 1453-1465, 2009.
- 128 GAITANOS, T. N.; SANTAMARIA, A.; JEYAPRAKASH, A. A.; WANG, B.; CONTI, E.; NIGG, E. A. Stable kinetochore-microtubule interactions depend on the Ska complex and its new component Ska3/C13Orf3. *The Embo Journal*, v. 28, n. 10, p. 1442-1452, 2009.
- 129 KERSCHER, O.; FELBERBAUM, R.; HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 22, p. 159-180, 2006. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503

- 130 DENISON, C.; RUDNER, A. D.; GERBER, S. A.; BAKALARSKI, C. E.; MOAZED, D.; GYGI, S. P. A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 4, n. 3, p. 246-254, 2005.
- 131 JOHNSON, E. S. Protein modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, v. 73, p. 355-382, 2004. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118.
- 132 JOHNSON, E. S.; BLOBEL, G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *The Journal of Cell Biology*, v. 147, n. 5, p. 981-994, 1999.
- 133 JOHNSON, E. S.; GUPTA, A. A. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, v. 106, n. 6, p. 735-744, 2001.
- 134 TEASDALE, R. D.; LOCI, D.; HOUGHTON, F.; KARLSSON, L.; GLEESON, P. A. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochemical Journal*, v. 358, n. 1, p. 7-16, 2001.
- 135 CULLEN, P. J. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 7, p. 574-582, 2008.
- 136 YOON, T.; LEE, K. Translationally controlled tumor protein interacts with sorting nexin 6. *Febs Journal*, v. 272, n. 5, p. 205-205, 2005.
- 137 WASSMER, T.; ATTAR, N.; BUJNY, M. V.; OAKLEY, J.; TRAER, C. J.; CULLEN, P. J. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *Journal of Cell Science*, v. 120, n. 1, p. 45-54, 2007.
- 138 AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S.; SRIVASTAVA, S. K.; ZIMNIAK, P.; BAJPAI, K. K.; SAXENA, M.; SHARMA, R.; ZILLER, S. A.; FRENKEL, E. P.; SINGH, S. V.; HE, N. G.; AWASTHI, Y. C. Adenosine triphosphate-dependent transport of doxorubicin, daunomycin, and vinblastine in human tissues by a mechanism distinct from the p-glycoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, v. 93, n. 3, p. 958-965, 1994.
- 139 JULLIENFLORES, V.; DORSEUIL, O.; ROMERO, F.; LETOURNEUR, F.; SARAGOSTI, S.; BERGER, R.; TAVITIAN, A.; GACON, G.; CAMONIS, J. H. Bridging ral gtpase to rho-pathways - rlip76, a ral effector with cdc42/rac gtpase-activating protein activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 38, p. 22473-22477, 1995.

- 140 CANTOR, S. B.; URANO, T.; FEIG, L. A. Identification and characterization of ral-binding protein-1, a potential downstream target of ral gtpases. *Molecular and Cellular Biology*, v. 15, n. 8, p. 4578-4584, 1995.
- 141 MORINAKA, K.; KOYAMA, S.; NAKASHIMA, S.; HINOI, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KIKUCHI, A. Epsin binds to the EH domain of POB1 and regulates receptor-mediated endocytosis. *Oncogene*, v. 18, n. 43, p. 5915-5922, 1999.
- 142 CHENG, J. Z.; SHARMA, R.; YANG, Y. S.; SINGHAL, S. S.; SHARMA, A.; SAINI, M. K.; SINGH, S. V.; ZIMNIAK, P.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C. Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 44, p. 41213-41223, 2001.
- 143 DAM, E. M.van ; ROBINSON, P. J. Ral: mediator of membrane trafficking. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 38, n. 11, p. 1841-1847, 2006.
- 144 VATSYAYAN, R.; LELSANI, P. C. R.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S. RLIP76: a versatile transporter and an emerging target for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 12, p. 1699-1705, 2010.
- 145 SINGHAL, S. S.; YADAV, S.; ROTH, C.; SINGHAL, J. RLIP76: a novel glutathione-conjugate and multi-drug transporter. *Biochemical Pharmacology*, v. 77, n. 5, p. 761-769, 2009.
- 146 CAVISTON, J. P.; LONGTINE, M.; PRINGLE, J. R.; BI, E. The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, n. 10, p. 4051-4066, 2003.
- 147 HUANG, Y. W.; SURKA, M. C.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAK, C.; TRIMBLE, W. S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS Journal*, v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.
- 148 LI, B.; FIELDS, S. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal*, v. 7, n. 10, p. 957-963, 1993.
- 149 ZHANG, B. L.; ZHANG, Y. Q.; WANG, Z. X.; ZHENG, Y. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 33, p. 25299-25307, 2000.

- 150 JOHN, J.; RENSLAND, H.; SCHLICHTING, I.; VETTER, I.; BORASIO, G. D.; GOODY, R. S.; WITTINGHOFER, A. Kinetic and Structural-Analysis of the Mg²⁺-Binding Site of the Guanine Nucleotide-Binding Protein P21(H-Ras). *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 2, p. 923-929, 1993.
- 151 PAN, J. Y.; SANFORD, J. C.; WESSLINGRESNICK, M. Influence of Mg²⁺ on the structure and function of Rab5. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 3, p. 1322-1328, 1996.
- 152 VRABIOIU, A. M.; GERBER, S. A.; GYGI, S. P.; FIELD, C. M.; MITCHISON, T. J. The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 4, p. 3111-3118, 2004.
- 153 MENDOZA, M.; HYMAN, A. A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Current Biology*, v. 12, n. 21, p. 1858-1863, 2002.
- 154 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, v. 75, p. 333-366, 2006. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- 155 SUNDE, M.; BLAKE, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in Protein Chemistry*, v. 50, p. 123-159, 1997. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60320-4.
- 156 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. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 26, p. 24095-24102, 2003

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](#)