

# Estudo de Dicroísmo Circular para investigação da interação entre domínios C-terminais de Septinas humanas.

**Fernanda A. Sala<sup>1</sup> (PG), Julio C. Borges<sup>1</sup> (PQ), Richard C. Garratt<sup>2\*</sup> (PQ).**

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo- Instituto de Química de São Carlos- Av. Trabalhador São Carlense, 400 – Parque Arnold Schmidt, São Carlos-SP, 13566-590

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo- Instituto de Física de São Carlos- Av. João Dagnoni, 1100 – Jd. Santa Angelina, São Carlos-SP, 13568-250. \*[richard@ifsc.usp.br](mailto:richard@ifsc.usp.br)

Palavras Chave: Septinas, Domínios C-terminais,  $K_{d,app}$ , Dicroísmo Circular.

## Introdução

Em termos estruturais septinas possuem uma organização comum dos domínios: um domínio GTPase central, uma região N-terminal e um domínio C-terminal, predito para formar estruturas em *coiled coil*. Atualmente, o heterocomplexo de septinas humanas (SEPT2/SEPT6/SEPT7) mais bem caracterizado revela a importância do domínio GTPase na formação do filamento, todavia a ausência de densidade eletrônica para os domínios C-terminais faz com que sua função permaneça obscura. Assim, o presente projeto visa estudar a afinidade homo/heterotípicas para os domínios C-terminais das septinas humanas dos grupos II (SEPT6C/8C/10C/11C) e IV (SEPT7C), investigando se esse domínio contribui para preferência das septinas em interagir com proteínas de grupos distintos durante a formação do heterofilamento.

## Resultados e Discussão

Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi utilizada para medir a estabilidade térmica de homo/heterodímeros das proteínas do grupo II e IV. Experimentos de desnaturação térmica foram conduzidos à 222nm. A temperatura foi variada de 4°C-80°C. Os heterodímeros foram gerados por uma mistura equimolar das proteínas constituintes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Temperaturas de desnaturação térmica para Homo/heterodímeros. A  $T_m$  é o resultado da mistura da proteína da respectiva linha e coluna.

SEPT	6C	7C	8C	10C	11C
6C <sup>I</sup>	27,5±0,2*	-	-	-	-
7C <sup>II</sup>	39,6±0,2*	33,6±0,2*	-	-	-
8C	29,6±0,2*	41,9±0,2*	33,4±0,2*	-	-
10C	34,7±0,1*	41,9±0,2*	39,2±0,2*	46,0±0,3*	-
11C	26,4±0,2*	38,5±0,2*	27,5±0,2*	33,1±1,1*	22,7±0,1*

\*Unidade: °C ; <sup>I</sup>Proteínas do grupo II; <sup>II</sup>Proteínas do grupo IV

Nota-se que com exceção do complexo SEPT7C/10C, os heterodímeros apresentam uma maior termoestabilidade quando comparado aos domínios individualmente ou aos heterodímeros não canônicos (formados por proteínas do Grupo II).

CD também foi utilizado a fim de medir as constantes de dissociação aparentes ( $K_{d,app}$ ) para homodímeros. Para isso, foi medida a temperatura de desnaturação térmica, a elipicidade molar residual ( $[\Theta]$ ) à 222nm, e a  $[\Theta]_{222nm}/[\Theta]_{208nm}$  das espécies presentes em solução em função da variação da concentração da proteína. Os parâmetros em estudos foram colocados no eixo da ordenada, e a concentração no eixo das abscissas, o ajuste matemático foi feito com a equação de Boltzmann e gerou o  $K_{d,app}$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Medida do  $K_{d,app}$  por dicroísmo circular para homodímeros.

Proteína	$K_{d,app}[\Theta]_{222nm}$	$K_{d,app}T_m$	$Kd[\Theta]_{222nm}/[\Theta]_{208nm}$
SEPT6C	(1,3±0,1)µM	(2,3±0,1)µM	(1,0±0,1)µM
SEPT7C	(1,2±0,1)µM	(1,8±0,1)µM	(0,8±0,1)µM
SEPT8C	(2,1±0,1)µM	(2,0±0,1)µM	(1,4±0,1)µM
SEPT10C	(1,9±0,1)µM	(1,7±0,1)µM	(0,9±0,1)µM
SEPT11C	(6,7±0,1)µM	-	(4,2±0,1)µM

Observa-se que o  $K_{d,app}$  para homodímeros está na ordem de baixo µM. Para o heterodímero SEPT6C/7C<sup>I</sup>, sabe-se que a constante de dissociação é de 15nM, o que evidencia significativa preferência pela interação heterodimérica.

## Conclusões

Em suma, nota-se que pela ausência de um parceiro mais específico os domínios C-terminais interagem entre si formando um homo *coiled coil*, todavia há uma significativa predileção pela interação entre os grupos II e IV. Isso evidencia o fato de que os domínios C-terminais podem atuar de forma decisiva ou cooperativa na organização preferencial das septinas durante a formação do filamento, especificamente favorecendo uma interface entre septinas dos grupos II e IV em pontos específicos ao longo do filamento.

## Agradecimentos

Ao CNPQ, FAPESP e CAPES pelo apoio Financeiro.

<sup>1</sup> Marques, I. A. et al. Cell Biochem. Biophys. 2002, 62, 317.